

V. DISCUSSIÓ

V. DISCUSSIÓ

1. Caracterització de PBF com activador transcripcional del gen γZ

Els factors de transcripció són proteïnes de tipus modular que solen tenir, com a mínim 2 dominis diferenciats: el domini d'unió al DNA, en base al qual els factors de transcripció es classifiquen en diferents famílies (Luscombe i col., 2000), i el domini regulador de l'activitat transcripcional. En els reguladors positius, aquest domini és l'encarregat d'activar, d'alguna manera, la iniciació de la transcripció a través del complex de la RNA polimerasa II. S'ha descrit el reclutament d'aquest complex proteic com a possible mecanisme activador d'alguns factors de transcripció (Ptashne i Gann, 1997), però els mecanismes concrets responsables de l'activació transcripcional mediada per factors de transcripció de plantes són encara poc coneguts (Singh, 1998). En les proteïnes de tipus DOF, el domini Dof, que es troba a l'extrem N-terminal de la proteïna, és l'encarregat de la interacció amb el DNA. Tot i que aquest domini es troba altament conservat entre els factors de tipus Dof, fora d'aquest domini, el nivell de similitud entre els diferents factors que el contenen disminueix considerablement (Yanagisawa, 2002). Aquesta divergència entre els diferents factors d'aquesta família justifica l'especialització funcional dels seus membres, però dificulta la identificació de seqüències implicades en l'activació transcripcional. Tot i així, en tots els factors Dof en els que s'ha caracteritzat el domini activador, aquest s'ha trobat a l'extrem C-terminal de la proteïna (OBP d'arabidopsis, Dof1 de blat de moro). I, en aquests, s'ha demostrat que el domini d'activació actua de forma independent del domini Dof encarregat d'interaccionar amb el DNA (Kang i Singh, 2000; Yanagisawa, 2001).

El domini activador de PBF es localitza a l'extrem C-terminal

Els resultats obtinguts en el nostre grup, caracteritzaven PBF com un potent activador transcripcional del gen γZ (Marzábal, 2002). En aquest treball hem observat que la regió N-terminal de PBF (bdPBF, que conté el domini Dof) era capaç d'interaccionar de forma específica amb la caixa Pb situada a -430 bp (Pb3) del promotor γZ (veure figura **59**, pàgina 121); en canvi, bdPBF era incapaç d'activar l'expressió sobre la construcció 527 γZ :GUS en assaigs d'expressió transitòria sobre endospermes de blat de moro (veure figura **39**, pàgina 94). Així, doncs, el domini activador de PBF s'havia de localitzar a la regió C-terminal de la proteïna. De fet, l'addició de quantitat creixents de bdPBF produeixen una lleugera inhibició de l'expressió del promotor γZ , indicant potser que la bdPBF exògena competeix amb el factor endogen per la unió a les caixes Pb.

Aquest resultat fa que calgui tenir en compte que, en el nostre sistema d'expressió transitòria, tenim tant els factors introduïts com els factors endògens; i que aquests són capaços d'actuar sobre el promotor γZ endogen i sobre la construcció 527 γZ :GUS, alterant lleugerament els resultats esperats.

L'activitat de PBF depèn de la presència d'un domini Dof intacte

Aquests resultats i la identificació del domini activador d'altres factors tipus Dof en les seves regions C-terminals, apuntaven a que la pròpia PBF activaria el promotor γZ a través del seu domini C-terminal. En canvi, al realitzar l'experiment complementari al realitzat amb bdPBF i expressar transitòriament el domini C-terminal de PBF (CtPBF) en endospermes de blat moro, aquesta regió de la proteïna no era capaç d'activar l'expressió GUS sota control del promotor γZ . Aquest resultat ens indicava que probablement PBF ha d'unir-se al promotor per poder activar-ne l'expressió. Aquesta dependència dels dos dominis de la proteïna a l'hora d'activar la transcripció indica que probablement la conformació global de la proteïna així com la seva unió al DNA són necessàries per la funcionalitat del factor, com ja s'havia descrit prèviament per altres factors (Lefstin i Yamamoto, 1998).

Resultats previs del grup també donaven suport a que l'activitat de PBF sobre el promotor γZ depengués dels seus dos dominis (N i C-terminal). Així, una versió mutada de PBF en els residus de cisteïna (aquesta mutació no permet la formació del dit de Zn, impedit, per tant, la interacció amb el DNA) tampoc no era capaç d'activar el promotor del gen γZ (Marzábal, 2002). Així, doncs, l'activitat de PBF només s'observa en les següents situacions: a) utilitzant el factor sencer o b) afegint un domini Dof heteròleg (de bPBF) al domini C-terminal de mPBF (figura 41, pàgina 96). En ambdós casos l'activació del promotor γZ és comparable, confirmant que PBF necessita tant el domini N-terminal (d'unió al DNA) com el domini C-terminal (activador) per activar el gen γZ .

Una regió rica en asparagina podria ser el domini activador de PBF

L'anàlisi del C-terminal de mPBF (aminoàcids 145 a 328) no posa de manifest la presència de cap seqüència de les que habitualment són responsables de l'activació mediada per factors de transcripció, com poden ser les regions riques en aminoàcids àcids o les seqüències amb repeticions de prolina o glutamina (Mitchell i Tjian, 1989; Frankel i Kim, 1991; Liu i col., 1999). De fet, malgrat la baixa identitat de la mPBF amb bPBF i wPBF a nivell del C-terminal (figura 40, pàgina 95), tampoc no s'han trobat en aquestes proteïnes seqüències normalment presents en dominis activadors i susceptibles de mediar interaccions proteïna-proteïna (Mena i col., 1998). Tot i així, s'ha establert la capacitat activadora del domini C-terminal de bPBF en experiments de

doble híbrid (Díaz i col., 2002). La única característica que comparteixen les 3 proteïnes és el gran nombre d'asparagines localitzades en els últims 20-30 aminoàcids de la proteïna (Vicente-Carbajosa i col., 1997; Mena i col., 1998). En el cas de la mPBF, es troben 16 Asn seguides, l'enfilall més llarg de les 3 PBFs. Donat que les característiques fisicoquímiques de l'Asn són molt similars a les de la Gln, es podria considerar aquest el domini activador de la transcripció. De fet, recentment, una anàlisi exhaustiva d'activadors transcripcionals de llevat ha evidenciat que aquests contenen regions amb una densitat d'Asn significativament superior respecte a factors proteics sense capacitat activadora (Titz i col., 2006). Aquesta evidència reforça la implicació de les Asn C-terminals de les PBFs en el seu paper activador.

PBF podria ser el coordinador de l'expressió del gen de la γ -zeïna amb el desenvolupament de l'endosperma de blat de moro

Que l'activitat de PBF depengui de la presència d'un dit de Zn intacte (inclòs en el domini Dof) suggereix a) que la interacció amb el DNA és imprescindible per a l'activitat sobre el promotor i/o b) que es requereix el domini Dof perquè PBF pugui interaccionar amb altres factors que formen el complex transcripcionalment actiu responsable de l'expressió del gen de la γ -zeïna. De fet, PBF produïda a *E.coli* és capaç d'unir-se a les seves caixes en el promotor γZ però no de forma totalment específica (Marzábal, 2002): bdPBF no és capaç d'unir-se específicament a un oligo que conté només el motiu Pb. En canvi, s'uneix de forma específica a un oligo que conté la seqüència completa del *bifactorial-box* (figura 93). Així, aquests resultats suggereixen que PBF depèn d'altres seqüències reguladores i, en definitiva, d'altres factors de transcripció per interaccionar de forma específica amb les caixes Pb i activar l'expressió del gen de la γ -zeïna a través d'elles.

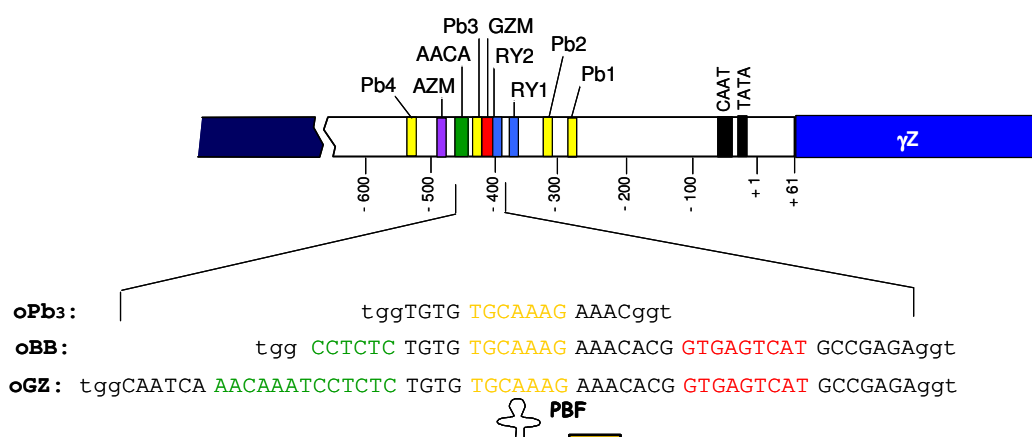


Figura 93. Esquema dels oligos utilitzats en els assaigs d'unió (tipus EMSA) de PBF al promotor γZ . Seqüència dels oligos Pb3, BB i GZ, utilitzats per testar l'especificitat d'unió de PBF a la caixa Pb3 del promotor del gen de la γ -zeïna. S'indiquen les seqüències de les caixes en colors: AACA en verd, Pb en groc i GZM en vermell. Només quan utilitzem oligos que s'estenen més enllà de la caixa Pb (oBB i oGZ) aconseguim una unió *in vitro* específica.

Tenint en compte el patró d'expressió de PBF (el seu mRNA es detecta específicament a endosperma des de 10 fins a 20 DAP), podem suggerir un model d'activació de l'expressió de γZ lligat al desenvolupament, on PBF seria responsable de l'inici de l'expressió de les zeïnes a 15 DAP. La resta de factors ajudarien a proporcionar-li l'especificitat d'unió al DNA requerida per a l'activació transcripcional i col·laborarien a l'expressió quantitativa de la γ -zeïna.

Els importants nivells d'activació de PBF sobre el promotor γZ ens suggereixen que probablement PBF sigui el factor limitant en l'expressió quantitativa del gen de la γ -zeïna al gra de blat de moro en desenvolupament. Aquest resultat, junt amb la presència de caixes Pb en tots els promotors de prolamines, reforça el paper de PBF com a coordinador de l'expressió de proteïnes de reserva a l'endosperma de blat de moro i justifica la correlació de la seva expressió amb el desenvolupament de l'endosperma.

Un punt en contra d'aquesta hipòtesi és el fet que PBF no ha estat capaç de regular l'expressió de l' α -zeïna de 22 kDa (Marzábal, 2002), tot i que les caixes Pb també es troben presents a la regió promotora d'aquestes prolamines (veure introducció, figura **8**, pàgina 14) i que s'ha demostrat la seva unió específica a aquestes caixes (Vicente-Carbajosa i col., 1997). Aquest fet podria ser degut a que només γ -zeïna està present en baix nombre de còpies; la resta de zeïnes són codificades per famílies multigèniques i pot ser que això faci que els seus promotors responguin a reguladors diferents. I, a més, el missatger de la γ -zeïna és molt estable (Plotnikov i Bakaldina, 1996), el que fa que tot i l'estreta finestra de resposta del promotor γZ a PBF, l'expressió de la γ -zeïna sigui sostinguda fins a 30-35 DAP, acabant d'assemblar la resta de zeïnes dins del cos proteic. És també interessant remarcar, que a més de ser codificada per un gen monocòpia, el seu promotor conté una caixa reconeguda per bZips de tipus GLM i no de tipus o2. Tot i que el factor O2 sigui capaç d'activar l'expressió de la γ -zeïna a partir de la caixa GZM, sembla probable que *in vivo* existeixi un altre factor de tipus bZip responsable de l'activació a través d'aquest element. Tot i els esforços realitzats, encara no s'ha trobat aquest hipotètic factor, el que fa pensar que potser no sigui una bZip específica d'endosperma, sinó que sigui una proteïna ubiqua a la que PBF doni especificitat de localització, mentre aquesta li dóna a PBF especificitat d'interacció amb el DNA.

Recentment s'ha clonat i caracteritzat a ordi el gen *Sad* (Isabel-LaMoneda i col., 2003), que codifica per un nou factor de tipus Dof (SAD) que s'expressa a endosperma en desenvolupament i també a aleurona i embrió en germinació i que regula l'expressió de proteases a aleurona d'ordi en germinació. En el mateix grup, Díaz i col (2005) han demostrat que SAD és capaç d'activar el promotor del gen de la B-hordeïna i s'ha vist

que és capaç d'interaccionar amb bGAMYB al nucli de cèl·lules vegetals. Han demostrat, a més, que SAD, bPBF i bGAMYB no interaccionen amb ells mateixos i que els dos factors Dof tampoc no interaccionen entre ells. SAD d'ordi, a més, s'agrupa filogenèticament amb dos factors Dof d'arròs, OsDof1 i OsDof2 (Isabel-LaMoneda i col., 2003), obrint la possibilitat a que existeixi també a blat de moro una altra DOF, a més de PBF. Aquest nou factor podria activar l'expressió dels gens de les α -zeïnes, ja que sembla que PBF no és capaç d'activar-los. Així, PBF seria el factor central en la regulació gènica de la γ -zeïna, mentre que en el cas de les α -zeïnes ho seria O2. A la figura 94 es mostra un model que explicaria la regulació diferencial dels gens que codifiquen per l' α -Zeïna de 22 kDa i la γ -Zeïna a través de les interaccions entre factors tipus Dof i tipus bZip.

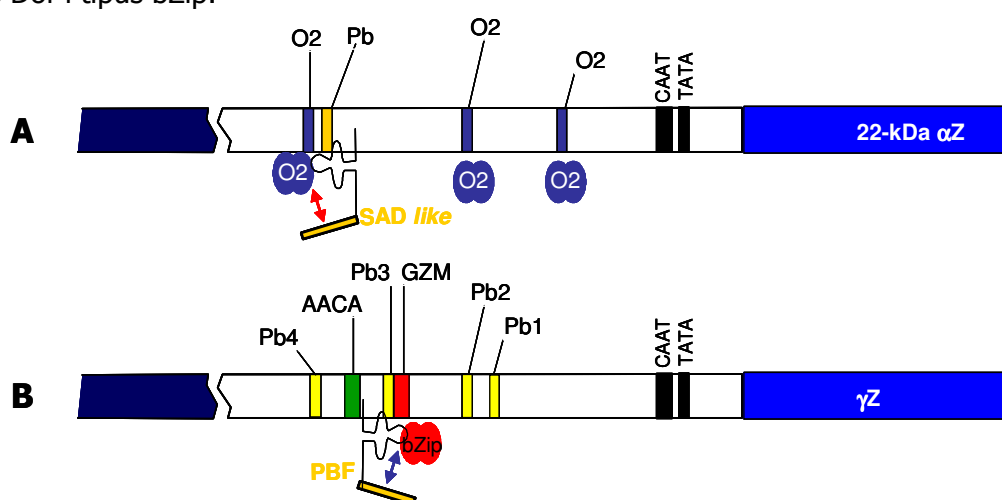


Figura 94. Model d'activació dels gens de l' α -zeïna i la γ -zeïna per factors tipus Dof i tipus bZip. A. Model d'activació per l' α -zeïna de 22 kDa, on O2 és el factor que governa l'inici de la transcripció del gen i un factor tipus Dof (putativament *SAD-like*) afavoreix l'expressió a nivell quantitatiu. **B.** Model d'activació per la γ -zeïna de 27kDa, on PBF és ara el factor que governa l'inici de la transcripció del gen i un factor tipus bzip afavoreix l'expressió a nivell quantitatiu.

2. GAMYB, un nou regulador transcripcional del promotor γZ

***ZmGAMYB* codifica per un factor de tipus Myb R2R3 de blat de moro**

El gen *GAMYB* de blat de moro (*ZmGAMYB*) que hem clonat per homologia de seqüència a gens *GAMYB* descrits a altres cereals codifica per un factor de transcripció de la família Myb R2R3 de 560 aminoàcids i 59 kDa. La seqüència aminoacídica deduïda pel factor presenta, efectivament, una elevada homologia amb tots els gens *GAMYB* descrits, no només a nivell del domini Myb sinó també a nivell de proteïna sencera (figura **48**, pàgina 105). La similitud entre tots els factors *GAMYB* de cereals es troba per sobre del 98% a nivell de proteïna sencera i presenten una identitat propera al 70%, mentre que el nivell de similitud general entre tots els factors propers a *GAMYB* tant de monocotiledònies com de dicotiledònies se situa al voltant del 88%. De fet, estudis filogenètics previs ja havien agrupat en la mateixa subfamília tots els factors de tipus *GAMYB* descrits fins aquell moment a cereals (ordi i arròs) i els seus 2 homòlegs *AtMYB33* i *AtMYB65* d'*Arabidopsis*, tal i com es mostra a la figura **8** de la introducció (Stracke i col., 2001) i com s'evidencia en l'arbre filogenètic que es mostra a continuació (figura **95**). En aquest alineament filogenètic s'han inclòs altres factors que reconeixen seqüències de DNA que inclouen motius de tipus AACA (com els presents en les regions promotores dels gens que codifiquen per prolamines de cereals) com són *OsMYB5* d'arròs o *PhMYB3* de *Petunia hybrida* (Solano i col., 1995; Suzuki i col., 1998). També s'inclouen els factors *AtMYBR1* i *AtMYBR2*, l'acumulació dels quals està alterada en les llavors del mutant *fus3* d'*Arabidopsis thaliana* (Kirik i col., 1998) i els factors *OsMYB 1 a 4*, factors específics de llavor d'arròs, aïllats en el mateix cribratge que *OsMYB5* però per unir dianes similars a les reconegudes pel factor *ZmC1*. En aquesta representació s'evidencia com tots els factors *GAMYB* de monocotiledònies s'agrupen junts (agrupats en verd), mentre els homòlegs d'*Arabidopsis* *AtMYB33* i *AtMYB65* es poden agrupar també amb el factor *OsMYB5*, teòricament més llunyà. En canvi, els factors *AtMYBR1* i *AtMYBR2* per una banda i els factors *OsMYB1-4* per l'altra s'agrupen en dos subgrups diferents i allunyats del subgrup format pels factors relacionats amb *GAMYB*.

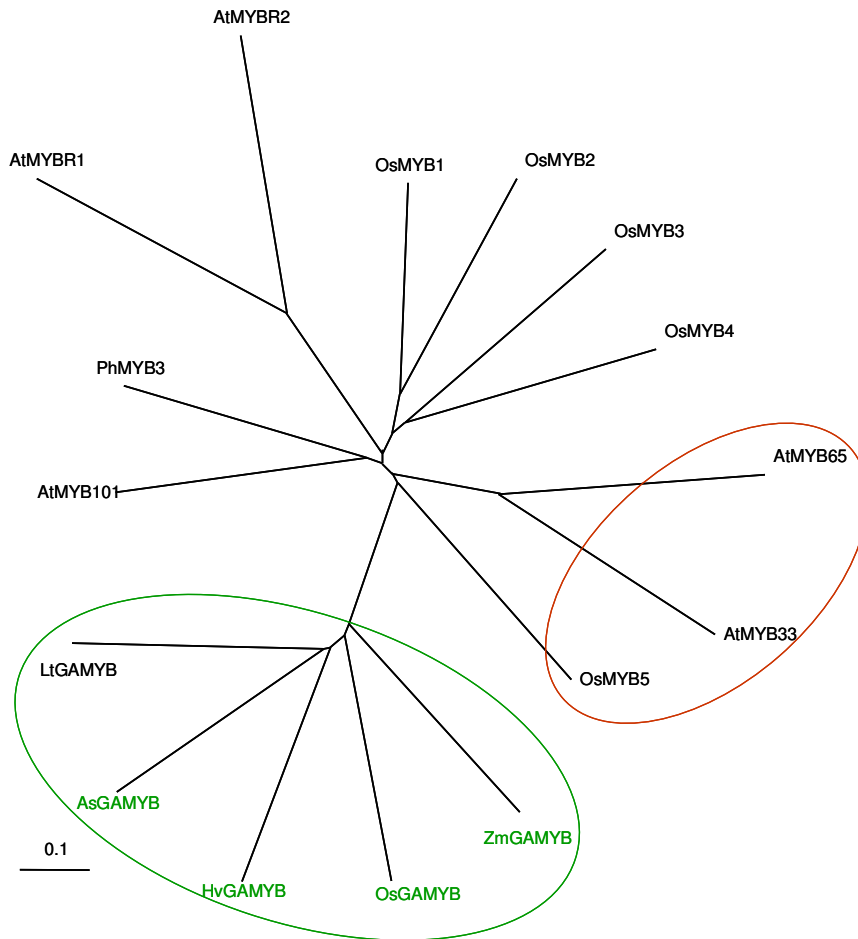


Figura 95. Arbre filogenètic de factors relacionats amb GAMYB d'ordi. Agrupament filogenètic a nivell de proteïna sencera de factors amb dominis MYB R2R3 relacionats amb GAMYB: ZmGAMYB de blat de moro, HvGAMYB d'ordi, OsMYB1-5 i OsGAMYB d'arròs, AsGAMYB d'*Avena sativa*, LtGAMYB de *Lolium temulentum*, PhMYB3 de *Petunia hybrida* i els homòlegs a GAMYB a arabis AtMYB33, AtMYB65 i AtMYB101. En verd es marquen els factors GAMYB de cereals. S'han inclòs els factors PhMYB3 i OsMYB5, que són capaços de reconèixer seqüències de DNA similars a GAMYB. S'inclouen també els factors AtMYBR1 i AtMYBR2, que estan afectats en el mutants *fus3* d'arabidopsis; i els factors OsMYB1-4, que s'expressen a gra d'arròs en desenvolupament. En tots ells, però, s'evidencia que es troben filogenèticament allunyats dels factors GAMYB de cereals. Els alineaments s'han generat amb el programa CLUSTAL X i els arbres filogenètics s'han obtingut amb el programa Tree View.

Es posa de manifest, doncs, com MYBs d'espècies diferents amb funcions relacionades tenen seqüències més properes que MYBs amb funcions diferents en la mateixa espècie i com es pot establir una certa correlació entre seqüència aminoacídica i la conservació a nivell de funció (Kranz i col., 1998). Segons això, sembla que el factor OsMYB5 hauria de tenir una funció relacionada amb els gens GAMYB i, de fet, s'ha demostrat que és capaç de reconèixer seqüències de tipus AACA (Suzuki i col., 1998). Així, sembla que a arròs hi ha 2 factors de tipus Myb candidats a regular l'expressió gènica a partir dels motius AACA: el factor OsGAMYB i el factor OsMYB5. Això està d'acord amb l'existència d'una certa redundància funcional a la família MYB R2R3, com

s'ha descrit pels factors ZmMYBC1 i ZmMYBPL (implicats en la biosíntesi d'antocians) o pels factors homòlegs a GAMYB d'arabidopsis AtMYB33 i AtMYB65 (Jin i Martin, 1999; Millar i Gubler, 2005). Aquesta redundància funcional pot tenir la seva explicació en l'origen de la família de MYBs R2R3 de plantes i la seva important ampliació per events de duplicació successiva, ocorreguts en diferents punt de l'evolució dels genomes de les plantes (Jiang i col., 2004). En aquest moment no es coneix l'existència d'un possible homòleg d'OsMyb5 a blat de moro.

***ZmGAMYB* s'expressa específicament a endosperma en desenvolupament**

El gen *ZmGAMYB* s'expressa de forma específica a endosperma de blat de moro des de 8 fins a 30 DAP. El seu producte gènic es detecta en aquest teixit des de 15 fins a 20 DAP amb l'anticòs policlonal α myb obtingut contra la regió C-terminal de GAMYB. El domini C-terminal dels factors de tipus MYB és la seva regió més variable (Jin i Martin, 1999), mentre el domini N-terminal es troba altament conservat. Tant és així, que anticossos generats contra el domini N-terminal de la proteïna codificada per *v-myb* (un oncogen del virus de la mieloblastosi aviar) reconeixen aquest domini en espècies de metazous altament divergents (Boyle i col., 1986). Així, l'anticòs policlonal per mGAMYB (α myb) es va generar contra la proteïna a la que li manca el domini Myb R2R3, a fi de minimitzar reaccions creuades amb altres factors de tipus Myb presents a gra de blat de moro en desenvolupament, que és on nosaltres hem analitzat la presència del factor mGAMYB.

La presència dels factors mGAMYB i mPBF a endosperma en desenvolupament coincideix temporalment i és coherent amb la presència de la γ -zeïna en aquest mateix teixit, que apareix lleugerament més tard que ells. Tot i així, sembla que la finestra temporal per PBF és més estreta que per GAMYB, suggerint una regulació més fina en el cas de PBF. Aquesta hipòtesi està d'acord amb el fet que els motius AACAA (reconeguts per GAMYB en el promotor del gen γ Z) contribueixen quantitativament a l'expressió de glutelines a arròs, però no sembla que estiguin involucrats en la regulació qualitativa (Wu i col., 2000). De fet, Wu i col. auguren també un paper merament quantitatiu a les caixes Pb (reconegudes per PBF). Cal tenir en compte però que l'homòleg més proper a PBF a arròs és el factor OsDof3, que no és específic d'endosperma ni presenta elevada homologia amb mPBF. Així, aquestes observacions també apunten a que PBF sigui el coordinador general de l'expressió del gen de la γ -zeïna a endosperma de blat de moro.

GAMYB es localitza al nucli en les cèl·lules de les capes més externes de l'endosperma de blat de moro en desenvolupament

Els resultats dels experiments d'immunohistoquímica ens diuen que *ZmGAMYB* s'expressa sobretot a les capes més externes de l'endosperma de blat de moro (aleurona i capes adjacents) a 15 i 20 DAP i es localitza, principalment, als nuclis. Tot i que a 10 DAP detectem expressió del factor per *Northern-blot*, la presència de la proteïna a 10 DAP no és detectable ni per *Western-blot* ni per immunohistoquímica. Això és degut al lleuger retard entre l'aparició de l'mRNA i l'inici en l'acumulació de la proteïna i als baixos nivells d'expressió en aquest moment del desenvolupament. No hem detectat la presència de mGAMYB en cap altre teixit del gra en desenvolupament, recolzant el patró d'expressió que havíem trobat per *Northern-blot*.

No obstant, Díaz i col. (2002) són capaços de detectar expressió de HvGAMYB a embrió d'ordi en desenvolupament per hibridació *in situ* (amb un marcatge localitzat a escutel i eixos vasculars), mentre que per detectar expressió en aquests teixits per *Northern-blot* es requereixen llargs temps d'exposició. Aquesta evidència a ordi concorda amb els nostres propis resultats, ja que, per RT-PCR hem estat capaços de detectar el transcrit de *ZmGAMYB* a embrió de blat de moro a 20 DAP (veure figura **46**, pàgina 104), però per *Northern-blot* no hem estat capaços de detectar expressió en aquest teixit en cap moment del desenvolupament. Aquests resultats ens indiquen, en qualsevol cas, una expressió majoritària del factor GAMYB a endosperma i de forma lligada al desenvolupament. Sembla que l'expressió en altres teixits de la llavor, si hi fos, seria molt baixa i molt localitzada i, en qualsevol cas, desapareix del tot en el gra madur.

Recentment, s'ha vist en els gens homòlegs a GAMYB a *Arabidopsis thaliana* AtMYB33 i AtMYB65 que l'expressió d'aquests factors MYB podria ser més estesa del que som capaços de detectar, però que els seus nivells d'expressió estan regulats per l'acció de microRNAs (Achard i col., 2004). A *Arabidopsis*, el microRNA miR159 actua com a regulador post-transcripcional dels gens *AtMYB33* i *AtMYB65*, desencadenant la degradació dels seus transcrits fora dels teixits en que es requereix la seva funció (Millar i Gubler, 2005). S'ha identificat la seqüència diana per aquest microRNA, que es localitza a 3' de la regió que codifica per les repeticions R2R3 (a uns 900 pb de l'ATG) i es troba conservada en els 5 gens de la família d'*Arabidopsis* amb més homologia a HvGAMYB: AtMYB33, AtMYB65, AtMYB97, AtMYB101 i AtMYB120 (veure figura **8**, introducció), tal i com es mostra a la figura **95**. De fet, aquesta seqüència també es troba altament conservada en tots els gens GAMYB clonats fins al moment, inclòs el de blat de moro (figura **96**), suggerint-ne la importància funcional.

```

AtMYB104 TCC TCCTATGCCT---CTCATTCACGAGGTGAGAACTTGGAGCTCCCTTCATTCCAAAGG-CTTTGATTTTCATGAAGA
AtMYB81 TCCTCCTGGACCT---CTTGTTCCCGGGGTGAGAATTTCCAGTTCCTTCATTCCAA-----TATCATGAAGA
AtMYB33 TGTTCCTTATTCCTAAGCCCTTATATGGGGCAGTGAAGCTGGAGCTCCCTTCATTCCAAAT---ATTCAGAAACAA---CA
AtMYB65 GCATCCTACTTCTAAGCCCTTGTGTTGGGGCAGTGAAGCTGGAGCTCCCTTCATTCCAAAT---ATTCAGAAACATAGTCCA
ZmGAMYB TTTCTCTGCTTCTAGGCCCAAAATGGTCCCTTTGAAGATGGAGCTCCCTTCACTCCAAAG---ATACTGAATCTGATCCA
AsGAMYB CTTCTCTGCTTCTAGSTCCACAAATGGTCCCTTTGAAGATGGAGCTCCCTTCACTCCAAAG---ATACCGAATCTGACCCA
HvGAMYB CTTCTCTACTTCTAGGACCATCAATGGTCCCTTTGAAGATGGAGCTCCCTTCACTCCAAAG---ATACCGAATCTGATCCG
OsGAMYB TTTCTCTGCTTCTAGGCCCAAAATGGTCCCTTTGAAGATGGAGCTCCCTTCACTCCAAAG---ATACTGAATCTGATCCA
AtMYB120 CAACC---GGTCTCAACCGCACCATTTTCCCTGTTTCAAGAGACTCCTACACTTCTTT-CTTACATTGCCCTTA---CC
AtMYB97 CTTTCGTGCTCCTAAGCGGAGACA-----AATCATGGCTGCGCTTGAGGACAAACA-ACAACAACAACAACCTTTT
AtMYB101 TTTCTT-TCCCTTAGGACTAGACAATAGC-----GTCCTAGAGCTTCCTTCAAACCAAAGACCGACCCATTGTTTCAGT
TTTTCCTGCTTCTA GCCCA A ATGG CCT TGAAG TGGAGCTCCCTTCA TCCAA ATAC GAATCT CA
    
```

Figura 96. Seqüència diana per miR159 present als gens GAMYB. La seqüència està altament conservada en tots els gens GAMYB descrits fins al moment: ZmGAMYB, AsGAMYB, HvGAMYB, OsGAMYB, AtMYB33 i AtMYB65, així com als factors més propers a GAMYB d'arabidopsis (AtMYB81, AtMYB97, AtMYB101, AtMYB104 i AtMYB120) i es mostra emmarcada en vermell.

D'acord amb els resultats d'immunohistoquímica, la distribució espacial de mGAMYB a endosperma de blat de moro a 15 i 20 DAP és coincident amb la de mPBF en el mateix moment del desenvolupament i concorda amb la regió on s'expressa majoritàriament el gen de la γ -zeïna (Marzábal, 2002). Aquest patró de distribució s'explica per l'origen clonal de l'endosperma i pel fet que la γ -zeïna, així com les altres zeïnes, s'acumulen principalment a les capes més joves de l'endosperma (les més externes), tot i que sembla que el seu missatger perdura en les cèl·lules més velles (les més internes) de l'endosperma ric en midó (Woo i col., 2001). De fet, el missatger de la γ -zeïna apareix a l'endosperma abans que el de les α i β -zeïnes i s'acumula cap a les capes més internes de l'endosperma ric en midó (Woo i col., 2001). És a l'interior del teixit on de fet té lloc la síntesi proteica co-traducciona de totes les zeïnes en el reticle endoplasmàtic i que permet el seu correcte assemblatge per formar els cossos proteics (Lending i Larkins, 1989). Tenint en compte aquest fet, sembla lògic pensar que els reguladors transcripcionals de les zeïnes, i especialment, de la γ -zeïna, s'expressin, sobretot, a les capes més superficials de l'endosperma (la capa aleurona i les 2 primeres capes cel·lulars de la subaleurona). En ser aquesta la zona on es dispara l'expressió del gen γZ i donat que el missatger de les zeïnes perdura en el temps, sembla coherent que els factors com PBF i GAMYB no siguin necessaris a les capes més internes de l'endosperma ric en midó, on, a més, l'activitat transcripcional és més baixa. Així, doncs, la localització de GAMYB a l'endosperma de blat de moro concorda espacial i temporalment amb l'inici de l'expressió del gen γZ .

mGAMYB és un activador del promotor γZ

Els resultats obtinguts en experiments d'expressió transitòria de mGAMYB en endospermes de blat de moro indiquen que és capaç d'activar el promotor γZ (apartat 2.4, resultats). La funció de mGAMYB sobre el promotor γZ ha estat sempre similar a la

de mPBF (potent activador del gen γZ), però causant nivells d'activació menors. Malgrat mGAMYB no proporciona nivells d'activació gaire elevats, el que s'ha constatat és que en tots els assaigs funcionals realitzats, l'expressió transitòria de *ZmGAMYB* a endosperma sempre ha activat el promotor γZ . Aquest resultat està d'acord amb resultats obtinguts per Díaz i col. (2002) en el sistema format per bPBF, bGAMYB i el promotor de la B-hordeïna d'ordi. Tant bPBF com bGAMYB són capaços d'activar el promotor de la B-hordeïna en assaigs d'expressió transitòria sobre endospermes d'ordi en desenvolupament. Aquests resultats ens permeten afirmar que mGAMYB és un activador del promotor γZ a blat de moro.

Molts factors de tipus MYB se suposen activadors transcripcionals, amb dominis activadors localitzats en la seva regió C-terminal. Això és degut en part a la localització C-terminal d'un domini acídic responsable de l'activació mediada per c-Myb, el primer gen *myb* descrit (Weston, 1998). Pel que fa als Mybs de plantes, s'ha testat la capacitat d'activació d'alguns d'ells i s'ha predit un domini activador C-terminal, putativament estructurat com a α -helix amfipàtica (Jin i Martin, 1999). L'anàlisi de les regions C-terminal dels membres de la família MYBs R2R3 d'arabidopsis va permetre establir fins a 22 subgrups amb una certa conservació a nivell de seqüència en el domini C-terminal (Kranz i col., 1998). En aquest mateix estudi filogenètic i en altres posteriors, tots els gens relacionats amb GAMYB s'agrupen junts en el mateix subgrup (Stracke i col., 2001), suggerint una localització conservada del domini activador en tots ells.

Tot i que la funcionalitat del factor HvGAMYB com a activador transcripcional ha estat establerta (Gubler i col., 1999), encara no s'han determinat els residus responsables de l'activitat de cap factor GAMYB. Estudis d'activació per doble híbrid de bGAMYB van revelar la presència de dos dominis activadors independents i funcionals a llevat situats a la regió C-terminal de la proteïna, però no s'han pogut relacionar amb dominis activadors clàssics (dominis acídics o regions riques en Pro o Gln). Fins aquest moment no s'ha testat la funcionalitat del domini C-terminal de cap altre factor GAMYB de cereal, però l'elevada conservació a nivell de seqüència entre tots els factors GAMYB descrits fa pensar que el(s) domini(s) activador(s) de mGAMYB es localitzin també a la seva regió C-terminal.

Donada la coincidència en la localització de PBF i GAMYB a endosperma de blat de moro i sabent que tots dos són capaços d'activar el promotor γZ , varem intentar estudiar si existia sinèrgia entre PBF i GAMYB per l'activació del promotor γZ , però els resultats dels assaigs de co-transformació amb la construcció 527 γZ p:GUS i 1 μ g dels activadors GAMYB i PBF, per separat i en combinació no permeten concloure que hi hagi sinèrgia entre els factors. Cal tenir en compte, però, que 1 μ g de GAMYB ja

sembla que es troba a concentració saturant (veure figura **52**, pàgina 110). En aquestes condicions, resultaria difícil veure un increment en l'activació del promotor γZ proporcional a les activacions causades per PBF i GAMYB per separat. Així doncs, l'existència de sinèrgia s'hauria de provar amb quantitats inferiors de GAMYB i, preferentment, també de PBF.

L'elevada capacitat activadora dels factors GAMYB i PBF limita l'aplicació de la tècnica de doble híbrid per establir la possible existència d'interaccions entre ells. Els fenòmens d'autoactivació es poden minimitzar per aplicació de 3-AT; i és així com Díaz i col. (2002) han pogut determinar que el domini C-terminal de bPBF interacciona amb bGAMYB. Aquest resultat anima a pensar que aquesta interacció també pugui existir a blat de moro i justifica els resultats d'interacció d'ambdós factors amb la regió -456/-404 del promotor de la γ -zeïna, tal i com es discuteix més endavant.

Diversitat funcional dels gens GAMYB

Fins al moment, s'han descrit funcions múltiples pels factors GAMYB a cereals i a *Arabidopsis*. Inicialment, els factors GAMYB d'ordi i arròs es van relacionar funcionalment amb l'expressió dels gens d' α -amilases en germinació (Gubler i col., 1995; Gubler i col., 1997). Posteriorment, factors homòlegs a proteïnes GAMYB d'ordi i arròs s'han relacionat amb la regulació de la floració a *Lolium temulentum* i a *Arabidopsis thaliana* (Gocal i col., 1999; Gocal i col., 2001) i en l'allargament del primer internode a blat (Chen i col., 2001). Posteriorment, bGAMYB s'ha relacionat amb l'acumulació de proteïnes de reserva a ordi (Díaz i col., 2002), de forma similar a com actua mGAMYB a blat de moro. L'obtenció de mutants d'arròs que tenen bloquejada la funció GAMYB ha permès caracteritzar amb més detall la funció d'aquest factor: s'ha vist que la manca de GAMYB no afecta la fase vegetativa de la planta, però s'observen defectes en la formació de les anteres de la flor i, com ja s'esperava, una incapacitat per activar l'expressió dels gens de les α -amilases en resposta a gibberel·lines a aleurona en germinació (Kaneko i col., 2004). No s'han observat defectes en l'acumulació de glutelines a l'endosperma dels mutants d'arròs, tot i que el motiu AACA al que s'uneix GAMYB per regular l'expressió dels gens de proteïnes de reserva a cereals es troba àmpliament distribuït en els promotors de les glutelines d'arròs. Aquest resultat pot significar dues coses a) que realment les caixes AACA juguen un paper només quantitatiu en la regulació gènica de les prolamines de cereals (Wu i col., 2000) i la manca del factor que regula l'expressió a partir d'aquest motiu es pot compensar amb la resta de reguladors gènics de les glutelines o b) que existeix una certa redundància funcional per l'existència de, com a mínim, dos factors (OsMYB5 i OsGAMYB) que interaccionen amb les caixes AACA presents en els promotors de les

glutelines (Gubler i col., 1997; Suzuki i col., 1998) i putativament capaços d'activar-ne l'expressió.

mGAMYB s'uneix de forma específica a la caixa AACCA del promotor γZ

La capacitat d'unió de mGAMYB recombinant a la caixa AACCA present a la regió proximal del promotor de la γ -zeïna s'ha determinat per assaigs de retard en gel (EMSA). Aquest tipus d'assaig ha posat de manifest com el factor GST-GAMYB és capaç d'unir-se de forma específica a la caixa AACCA. Aquesta unió és dependent de l'estat d'oxidació del factor GAMYB. Es troba àmpliament descrit a la literatura que els factors Myb han d'estar en forma reduïda per interaccionar amb el DNA (Williams i Grotewold, 1997) i s'han identificat els residus de Cys putativament implicats com a sensors *in vivo* de l'estat *redox* tant del c-Myb humà (Guehmann i col., 1992) com de P1 de blat de moro (Heine i col., 2004), tot i que els mecanismes de regulació dels Mybs d'origen animal i els Mybs de plantes són lleugerament diferents. És per això que la proteïna GST-GAMYB purificada per a la realització d'assaigs tipus EMSA es guarda en presència de DTT. Així, quan la proteïna GST-GAMYB ha estat conservada en un ambient no reductor, no és capaç d'unir-se al DNA en els assaigs de retard en gel (resultats no mostrats).

Els assaigs de retard en gel amb extractes nuclears d'endosperma de blat de moro de 12 DAP posen de manifest la presència d'una proteïna que interacciona de forma específica amb la caixa AACCA. Aquesta proteïna coincideix amb GAMYB, ja que al incubar els extractes nuclears amb l'anticòs específic contra GAMYB (α myb) la banda específicament retardada desapareix (*supershift*), reforçant la funcionalitat de GAMYB sobre l'expressió de la γ -zeïna a la planta.

En el cas de la proteïna recombinant GST-GAMYB, en canvi, no vam ser capaços de canviar la mobilitat electroforètica del complex format per GAMYB amb el DNA amb l'anticòs α myb. Això pot ser degut a que estem utilitzant una elevada quantitat de proteïna purificada per a la relativament baixa quantitat d'anticòs amb la que realitzem l'assaig de *supershift*. En aquestes condicions som capaços de veure un *supershift* sobre l'extracte nuclear (que conté, comparativament, menys quantitat de GAMYB que la mostra amb la proteïna purificada), però no sobre la proteïna purificada.

La interacció de GAMYB amb la caixa AACCA, de forma similar a com passava amb PBF, depèn de la presència d'altres seqüències reguladores properes a la caixa AACCA. Tot i que la unió de GAMYB al motiu AACCA no mutat no sembla afectar-se per la mutació de la caixa Pb adjacent, aquesta mutació fa que GAMYB perdi totalment la unió residual a un oligo que conté tots els elements quantitativament importants per l'expressió del gen γZ mutats (figura 97).

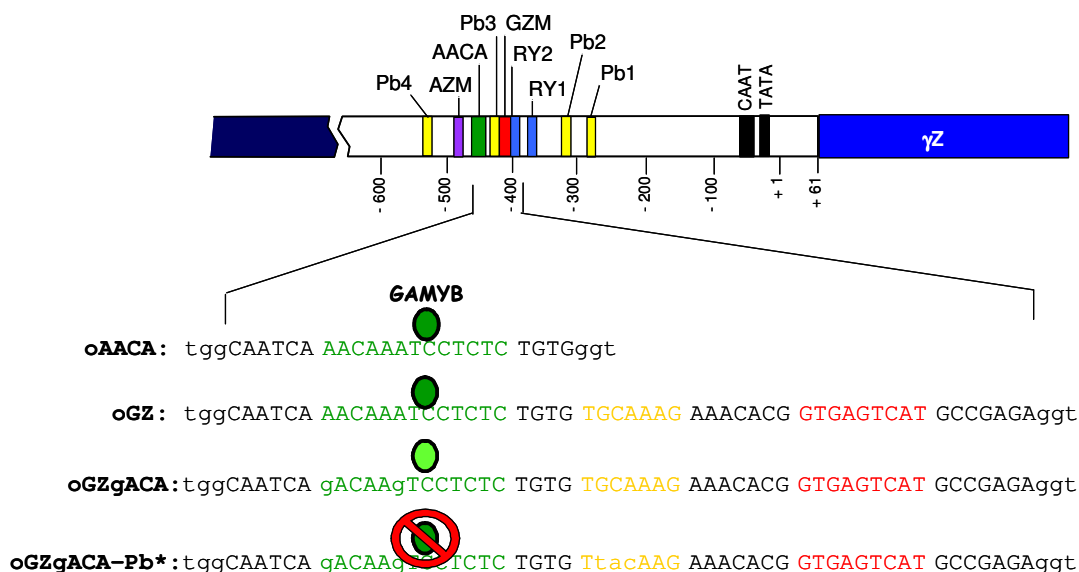


Figura 97. Esquema dels oligos utilitzats en els assaigs d'unió (tipus EMSA) de GAMYB al promotor γZ . Seqüència dels oligos AACA, GZ i les seves corresponents versions mutades en les caixes AACA i Pb, utilitzats per testar l'especificitat d'unió de GAMYB a la caixa AACA del promotor del gen de la γ -zeïna. S'indiquen les seqüències de les caixes en colors: AACA en verd, Pb en groc i GZM en vermell. La unió *in vitro* de GAMYB a l'oligo AACA és específica. Però si ampliem l'oligo més enllà de la caixa AACA, cal mutar tant la caixa AACA com Pb (mutacions en minúscula) per perdre totalment la unió de GAMYB al promotor γZ (veure figura 59, pàgina 121).

Aquest resultat suggereix una interacció i, probablement, una activitat sinèrgica pel que fa a la unió de GAMYB i PBF al promotor γZ . El sinergisme entre aquests dos factors no s'ha pogut demostrar encara mitjançant experiments *in vivo*, però el que sí s'ha demostrat és la interacció entre el domini C-terminal de bPBF i bGAMYB a llevat (Díaz i col., 2002) i en nuclis de cèl·lules vegetals (Díaz i col., 2005), com hem comentat anteriorment. Tot això ens indica que probablement PBF també interaccioni amb GAMYB a blat de moro i anima a intentar demostrar l'existència de sinergisme entre ambdós factors en l'activació de l'expressió del gen de la γ -zeïna.

3. ZmFUSCA3, un nou factor B3 lligat al desenvolupament del gra de blat de moro

ZmFUSCA3 de blat de moro codifica per un factor de tipus B3

Hem clonat un gen de blat de moro amb homologia de seqüència a FUSCA3 d'arabidopsis (AtFUSCA3) i a un gen putatiu d'arròs anomenat com l'homòleg de FUSCA3 a *Oryza sativa*. Aquest gen s'ha denominat, en conseqüència, FUSCA3 de blat de moro (o *ZmFUSCA3*) i codifica per un factor de transcripció de la família B3 de 293 aminoàcids i 32,5 kDa. Fins aquest moment, ZmVP1 era l'únic factor de tipus B3 descrit a blat de moro (McCarty i col., 1991).

El gen *ZmVP1* codifica per un factor de transcripció ortòleg a ABI3 d'arabidopsis (Giraudat i col., 1992), que s'expressa de forma abundant durant l'embriogènesi i que deixa d'expressar-se després de la germinació (Parcy i col., 1994). El fenotip dels mutants *vp1* de blat de moro és similar al dels mutants *abi3*, ja que tots dos produeixen llavors intolerants a dessecació i insensibles a ABA (McCarty i col., 1991). L'anàlisi d'aquests mutants ha permès caracteritzar el factor ZmVP1 com a regulador de la fase de maduració de la llavor i com a repressor d'una activació prematura del programa de germinació (Hoecker i col., 1995). ABI3 i VP1 comparteixen 4 dominis conservats (A, B1, B2 i B3, veure figura **25**, pàgina 33) i d'ells, el domini B3 de VP1 és l'encarregat d'interaccionar amb el DNA a través dels elements RY (Suzuki i col., 1997b).

La seqüència aminoacídica deduïda pel factor ZmFUSCA3 presenta una elevada similitud amb el domini B3 d'altres factors tant d'arabidopsis com d'arròs (figura **98**). Així, el factor ZmFUSCA3 de blat de moro presenta una identitat del 29% i una similitud del 40% amb el factor FUSCA3 d'*Arabidopsis thaliana* i una identitat del 64% i una similitud del 70% amb el factor putatiu FUSCA3 deduït a partir del genoma d'*Oryza sativa* (veure figura **73**, pàgina 140). De fet, ZmFUSCA3 es troba filogenèticament més a prop de AtFUSCA3 del que es troben ZmVP1 i ABI3 (amb una similitud del 29%), tot i considerar-se gens ortòlegs.

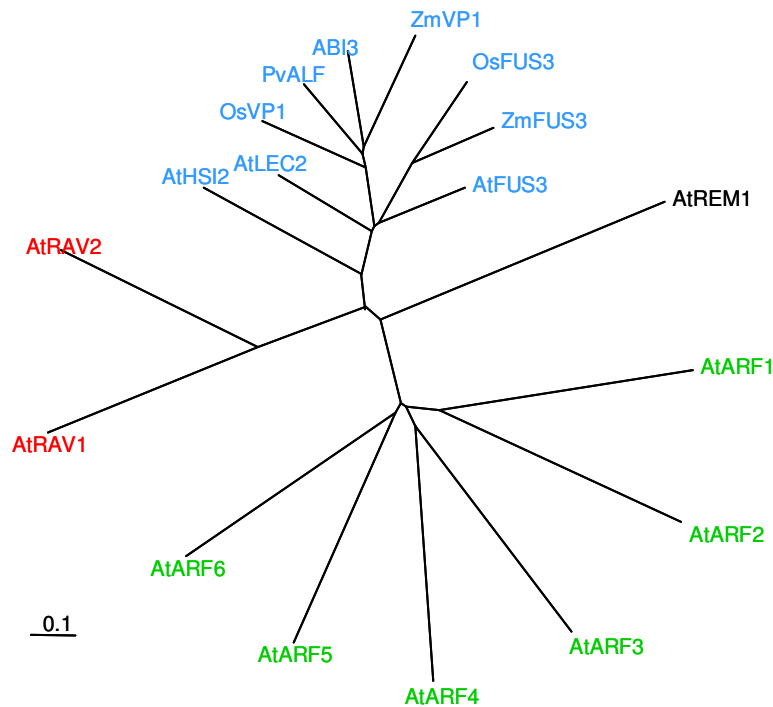


Figura 98. Arbre filogenètic de factors amb dominis B3 conservats. Agrupament filogenètic a nivell de proteïna sencera de factors que contenen dominis B3: factors relacionats amb ABI3 (LEC2, FUS3 i HSI2), ARF, RAV i REM d'*Arabidopsis thaliana*; ZmVP1 i ZmFUS3 de blat de moro; OsVP1 i OsFUS3 d'arròs i PvALF, homòleg a VP1/ABI3 de *Phaseolus vulgaris*. En verd es marquen els factors ARF, en vermell els factors tipus RAV, en blau els factors relacionats amb ABI3 i VP1 i en negre AtREM, que no s'alinea en cap grup. Els alineaments s'han generat amb el programa CLUSTAL X i els arbres filogenètics s'han obtingut amb el programa Tree View.

ZmFUSCA3 s'expressa majoritàriament a embrió en desenvolupament i de forma molt limitada a endosperma

D'acord amb els resultats obtinguts en analitzar l'expressió de *ZmFUSCA3* per *Northern-blot*, el transcrit per *ZmFUSCA3* es troba de forma majoritària a embrió de blat de moro en tots els estadis analitzats (des de 15 fins a 30 DAP) i el seu producte gènic es detecta en aquest teixit des de 15 fins a 20 DAP amb l'anticòs policlonal α fus obtingut contra la proteïna FUSCA3 sencera. Aquest anticòs policlonal (α fus) reconeixia una proteïna d'aproximadament 36 kDa a embrió i una altra proteïna de 45 kDa tant a endosperma com a embrió. Al purificar el sèrum α fus per cromatografia d'immunoafinitat, l'anticòs purificat α pfus va ser capaç de reconèixer només la proteïna de 36 kDa a embrió.

El missatger de *ZmFUSCA3* també es detecta a endosperma en desenvolupament (des de 8 fins a 30 DAP), amb un petit pic a 15 DAP. Tot i així, el nivell d'expressió en aquest teixit és molt menor que a embrió (figura 74, pàgina 142). Aquest resultat feia pensar, que en cas que ZmFUSCA3 fos un regulador de l'expressió de proteïnes de

reserva a l'endosperma de blat de moro, la seva contribució als nivells d'expressió de les prolamines seria quantitativament poc important.

ZmFUSCA3 es localitza sobretot a les cèl·lules de l'aleurona i a les capes més externes de l'escutel del gra de blat de moro en desenvolupament

A la vista dels resultats d'expressió de *ZmFUSCA3* al gra de blat de moro, esperàvem que els experiments d'immunohistoquímica ens permetessin hipotetitzar sobre el paper de FUSCA3 en el desenvolupament tant de l'embrió com de l'endosperma.

Aquests experiments indiquen que ZmFUSCA3 es localitza de forma molt aparent a l'aleurona a partir de 15 DAP i, a 20 DAP, es detecta també a les capes adjacents a l'aleurona (subaleurona). A 10 DAP no vam detectar la proteïna i, de fet, l'expressió detectada per *Northern-blot* a l'endosperma en aquest moment del desenvolupament és molt baixa. Així, doncs, és lògic que no puguem detectar la presència de la proteïna en aquest moment del desenvolupament ni per *Western-blot* ni per immunohistoquímica. El patró de localització de la proteïna, de forma tan concentrada a l'aleurona, explica que puguem detectar presència de transcrit entre 12 i 18 DAP a endosperma, ja que els experiments de *Northern-blot* s'han realitzat amb endospermes als que no se'ls ha disseccionat prèviament l'aleurona. De fet, si analitzem els nivells de transcrit per *ZmFUSCA3* sobre RNA total d'endospermes desproveïts d'aleurona no som capaços de detectar expressió (resultats no mostrats).

A més d'expressar-se fortament a l'aleurona, ZmFUSCA3 es localitza també a embrió a partir de 15 DAP, com ja suggerien els resultats de *Northern* i *Western-blot*. A 15 DAP l'expressió és estesa a tot l'escutel (teixit de reserva de l'embrió), mentre que a 20 DAP la presència de proteïna es restringeix més cap als marges del teixit. Aquest patró és conseqüent amb la forma en que es desenvolupa l'escutel, que de manera similar a l'endosperma té origen clonal, amb les cèl·lules més joves i les, lògicament, més actives transcripcionalment situades als marges del teixit. A 20 DAP també es detecta la proteïna a l'eix embrionari, a nivell de la radícula, però el senyal és molt més dèbil que a l'escutel.

Esperàvem que FUSCA3, amb el seu domini B3, es comportés com a factor de transcripció i, en algun moment, es localitzés a nucli. De fet, a la subaleurona, trobem acumulació de la proteïna sobretot al nucli (figures **85** i **86**, pàgines 155 i 156). En canvi, a embrió (figures **89** i **92**, pàgines 159 i 162) i a aleurona (figura **86**, pàgina 156), on s'acumula principalment ZmFUSCA3, hem detectat presència de la proteïna a tot el citoplasma però el marcatge sempre ha quedat exclòs del nucli, en totes les seccions transversals de blat de moro en desenvolupament analitzades. De fet, no és infreqüent que no es detecti presència d'un factor de transcripció a nucli en un moment concret del desenvolupament, ja que com més crítics són els processos

regulats per un determinat factor, més controlada està la seva permanència al nucli. D'aquesta manera, l'expressió dels seus gens diana és limitada a un moment concret del desenvolupament. Aquest és, per exemple, el cas dels factors que regulen el cicle cel·lular (Weis, 2003), que es troben a nucli només en moment molt concrets. Això ens porta a hipotetitzar que FUSCA3 deu regular un procés més crític que l'acumulació de substàncies de reserva a l'aleurona i l'embrió en desenvolupament. Un fet que apunta clarament en aquesta direcció és la distribució perinuclear de FUSCA3 a nivell de l'eix embrionari a 20 DAP.

Així, sembla clar que ZmFUSCA3 està implicat d'alguna manera en la regulació de processos relacionats amb el desenvolupament de l'embrió i l'aleurona i que el procés o processos regulats per ZmFUSCA3 depenen d'estímuls fortament lligats al desenvolupament del gra de blat de moro. En aquest context, adquireix especial rellevància el paper de les hormones GA i ABA, que governen la transició entre les fases de creixement i maduració de la llavor i l'entrada en la dormància (White i col., 2000), com es discuteix més endavant.

El paper del factor ZmFUSCA3 en la regulació gènica de la γ -zeïna

Tal i com suggeria el patró d'expressió de *ZmFUSCA3* a endosperma de blat de moro, l'expressió transitòria d'aquest factor en aquest teixit no va ser capaç d'activar el promotor γ Z (resultats 3.4). A més, en assaigs d'unió *in vitro* a la caixa RY present a la regió proximal del promotor γ Z (EMSA), ZmFUSCA3 recombinant no va ser capaç d'unir-se de forma específica a la seva seqüència diana. Cal considerar però que la caixa del promotor γ Z utilitzada en aquests experiments conté només un element RY incomplet (CATGC) i fora d'aquests 5 nucleòtids es perd el caràcter RY (això és, alternança de purines i pirimidines). Aquest fet ens indica a) que ZmFUSCA3 no està implicat en la regulació de l'expressió del gen de la γ -zeïna a endosperma de blat de moro i b) que el consens pels elements RY, com a mínim en les condicions assajades, s'estén més enllà de l'element central CATGC del *legumin box* descrit per Bobb (1997). Així, hauríem de buscar altres possibles gens diana per ZmFUSCA3, que continguin en la seves regions promotores elements RY que compleixin el consens estès a CATGCATG (Monke i col., 2004).

En conjunt, tant els resultats dels experiments d'activació del promotor γ Z com els assaigs d'unió *in vitro* al mateix promotor estan d'acord amb els resultats d'expressió de *ZmFUSCA3* sobre grans de blat de moro en desenvolupament (figures **74** i **82**, pàgines 142 i 152) i ens permeten concloure que FUSCA3 de blat de moro no és un regulador gènica de la γ -zeïna. De fet, ZmFUSCA3 probablement tampoc no sigui capaç de regular l'expressió d'altres gens que codifiquen per altres proteïnes de reserva d'endosperma.

ZmFUSCA3 en el control del desenvolupament embrionari i de l'acumulació de substàncies de reserva a blat de moro

A *arabidopsis*, AtFUS3 i AtLEC2 s'han descrit com a factors de transcripció reguladors de l'expressió de proteïnes de reserva. Ambdós factors són proteïnes de la família B3, filogenèticament molt properes (figura 98). A dicotiledònies, les proteïnes de reserva s'emmagatzemen principalment als cotilèdons de l'embrió, ja que l'endosperma és consumit en gran part per l'embrió durant el seu desenvolupament (Olsen, 2004). A més, les proteïnes de reserva majoritàries són globulines i albúmines (Fujiwara i col., 2002). A blat de moro, en canvi, les proteïnes de reserva de la llavor s'emmagatzemen principalment a l'endosperma i són de tipus prolamina. Tot i així, l'embrió de blat de moro acumula certa quantitat de proteïnes de reserva de tipus globulina, amb homologia a les presents a dicotiledònies, a més d'una important quantitat de lípids. En conjunt, la proteïna i els lípids que s'acumulen a l'embrió i l'aleurona de blat de moro tenen elevat valor nutritiu (Shewry i Halford, 2002) i, en conseqüència, l'estudi dels mecanismes que regulen la seva acumulació adquireix una certa rellevància. Això ens situa en un context en que sembla que espècies allunyades com *arabidopsis* i blat de moro puguin controlar el desenvolupament de les seves llavors per mecanismes similars (Vicente-Carbajosa i Carbonero, 2005).

Els factors AtLEC1, AtFUS3 i AtLEC2 actuen a *arabidopsis* de forma coordinada amb ABI3 per aconseguir la correcta acumulació de proteïnes de reserva que assegurí la supervivència de la plàntula un cop l'embrió germini. A més, aquests factors regulen també processos relacionats amb la identitat de teixit, ja que els mutants *lec1*, *fus3* i *lec2* es caracteritzen per presentar el fenotip *leafy cotyledons* (d'aquí els noms de AtLEC1 i AtLEC2), que dona als cotilèdons de l'embrió aparença de fulles verdaderes (Meinke i col., 1994). Així, aquestes mutacions heterocròniques (que alteren l'ordre temporal normal del desenvolupament) serien les responsables de que l'embrió immadur obviés la fase de maduració i dormància i entrés prematurament en el programa de germinació. De fet, l'expressió ectòpica de AtLEC1, AtFUS3 i AtLEC2 induïx embriogènesi somàtica en teixits vegetatius (Lotan i col., 1998; Gazzarrini i col., 2004; Santos Mendoza i col., 2005), però sembla que els 3 factors actuen de forma diferent. L'acció de AtLEC1 sembla restringida al control de l'embriogènesi i al manteniment del programa de desenvolupament de la llavor, impedit l'activació prematura del programa de germinació. En canvi, AtLEC2 i AtFUS3 regulen a més l'acumulació de productes de reserva a la llavor; així, la seva expressió ectòpica en teixits vegetatius fa que s'acumulin a fulla proteïnes de reserva específiques de llavor.

S'havia demostrat també el paper repressor de AtFUS3 i AtLEC2 en la síntesi de GA actives, ja que reprimeixen l'expressió de l'AtGA₃Ox2 a través de la seva interacció

amb motius RY presents en la regió promotora del gen que codifica per aquesta oxidasa (Curaba i col., 2004). Posteriorment, s'ha vist que AtFUS3, a més, regula positivament la síntesi d'ABA i que les auxines, són capaces d'estabilitzar la proteïna i afavorir-ne l'entrada a nucli (Gazzarrini i col., 2004). Així, en una sèrie d'elegants experiments Gazzarrini i col. assenyalen FUSCA3 com un regulador clau en l'acció de les diferents hormones en el desenvolupament seqüencial de l'embrió i en la transició cap a la fase de maduració de la llavor. Si aquesta dualitat funcional (activadora i repressora) té lloc també a blat de moro, aquest model explicaria que, en els estadis analitzats (15 i 20 DAP), no siguem capaços de detectar proteïna als nuclis de les cèl·lules de l'aleurona i l'embrió (apartat 3.7, resultats), ja que l'entrada a nucli vindria marcada pel pic d'ABA matern, que té lloc cap a 20 DAP (White i col., 2000).

A blat de moro, en aquest moment, només coneixem l'existència de 2 factors B3, que són VP1 i ZmFUSCA3, identificat en aquest treball. I, a més, de l'anàlisi dels putatius factors B3 codificats al genoma d'arròs es dedueix que no sembla que hi hagi cap altre factor B3 proper a ABI3/VP1 a part del ja descrit OsVP1 i el putatiu OsFUS3. Això ens podria indicar que el putatiu factor anotat com a FUSCA3 al genoma d'arròs, així com el seu homòleg a blat de moro, tindrien una funció mixta FUS3-LEC2. De fet, sembla que AtFUS3 i AtLEC2 tenen funcions parcialment redundants i que només es diferencien en el patró espacial i temporal d'expressió (Kroj i col., 2003). Així, si hipotetitzem que el factor ZmFUSCA3 és homòleg als factors AtFUS3 i AtLEC2 d'arabidopsis, això ens situa davant d'un nou factor de transcripció amb múltiples rols en el correcte desenvolupament de l'embrió, clau en la coordinació de l'embriogènesi i la maduració del gra en el temps.

Cal tenir en compte que els mutants *vp1* de blat de moro no presenten afectada l'acumulació de proteïnes de reserva a endosperma però sí a embrió (Rivin i Grudt, 1991); i tampoc no presenten pigmentació com els mutants *fus3* d'arabidopsis sinó defectes en la síntesi d'antocians. Això és degut a una manca d'activació de la síntesi d'aquests pigments a través del gen C1, que és alhora un dels gens diana de VP1 (Hattori i col., 1992). Així, sembla que hi ha una diferenciació funcional entre l'agrupació FUSCA3-VP1 de blat de moro i l'agrupació FUS3-LEC2-ABI3 d'arabidopsis. En aquest context, ZmVP1 podria ser el regulador de la fase de maduració de la llavor, mentre ZmFUSCA3 actuaria de forma prèvia, induint la transició cap a la maduració a través del canvi de GA cap a ABA i aturant les últimes etapes de la divisió embrionària; això permetria el posterior creixement cel·lular i l'acumulació de substàncies de reserva (globulines i oleosines) típiques de la fase de maduració. Aquesta hipòtesi està avalada pel fet que VP1 no respon a ABA, sinó que depèn d'ABA i de la interacció amb factors de transcripció que uneixen ABREs per exercir la seva funció reguladora sobre

proteïnes específiques de la fase de maduració de l'embrió (Suzuki i col., 2003). De fet, l'acció de VP1 a través de les caixes RY (la que regula l'acumulació de proteïnes de reserva a l'embrió) s'ha considerat clàssicament un mecanisme de regulació secundari per VP1 i va costar força demostrar la unió específica d'aquest factor al DNA (Suzuki i col., 1997b). Així, tot i que s'expressa amb un pic a 16 DAP a embrió i declina progressivament cap a la maduresa de la llavor, sembla que la funció de VP1 en la regulació de les proteïnes de reserva es desencadena després del pic d'ABA, que té lloc a 20 DAP. D'aquesta manera, la prematura expressió de VP1 a embrió i aleurona estaria reprimint l'expressió dels gens de les α -amilases, prevenint així una prematura mobilització de les reserves de midó de l'endosperma.

ZmFUSCA3, un possible regulador de l'acumulació de substàncies de reserva a embrió de blat de moro a través dels motius RY

S'havia descrit ja la importància de l'associació RY-AtFUS3 en la regulació gènica de proteïnes típiques de la fase de maduració de la llavor a arabidopsis (Reidt i col., 2000). Recentment s'ha descrit que AtLEC2 també regula directament proteïnes específiques de llavor en la fase de maduració, com són albúmines, globulines o oleosines, a través de les caixes RY presents en la seva regió promotora (Braybrook i col., 2006). Si estudiem les regions promotores d'aquests gens de blat de moro, també trobem caixes RY (figura 99), el que suggereix que aquests gens siguin regulats per algun factor de tipus B3.

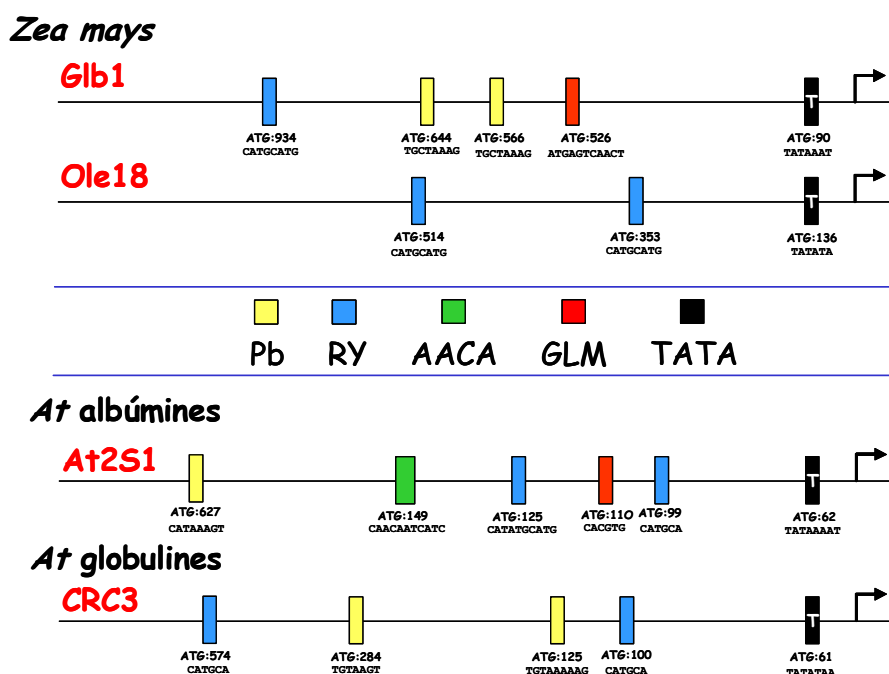


Figura 99. Regions promotores de gens d'embrió amb elements RY. Representació esquemàtica de les seqüències reguladores dels promotors de la globulina1 i l'oleosina de 18 kDa de blat de moro i l'albúmina 2S i la cruciferina C d'arabidopsis, on s'indica la posició dels elements RY respecte l'inici de traducció (ATG). Tots ells són gens d'expressió a embrió.

Si bé és cert que encara no hem estat capaços de demostrar una unió totalment específica de ZmFUSCA3 a la seqüència *RY-like* CATGC, cal tenir en compte, que el domini B3 s'ha descrit com a element amb una unió críptica al DNA. Per poder demostrar una unió específica de VP1 a l'element SphI (que conté una repetició RY) es va haver de testar la capacitat d'unió amb el domini B3 aïllat, ja que no s'havia pogut demostrar unió específica amb el factor VP1 sencer (Suzuki i col., 1997b). A més, s'ha demostrat que l'especificitat d'unió *in vitro* entre el factor PvAlf (homòleg a VP1 de *Phaseolus vulgaris*) i els elements RY depèn de la concentració de proteïna a la que es realitzen els assaigs d'unió. Així, si s'apliquen elevades quantitats de PvAlf, aquest factor és capaç d'unir-se tant a la caixa RY *wt* com a la corresponent versió mutada del promotor de la β -faseolina; no obstant, ajustant de forma acurada la quantitat de proteïna assajada es pot arribar a aconseguir una unió específica (Carranco i col., 2004). Tenint en compte aquests precedents, no és estrany que en les condicions en què hem realitzat els assaigs de retard en gel per estudiar l'especificitat d'unió de ZmFUSCA3 a la seqüència CATGC no siguem capaços de demostrar una unió totalment específica. Així, probablement amb un promotor que contingui elements RY que respectin el consens CATGCATG (Monke i col., 2004), com els que es mostren a la figura **99**, sí que seríem capaços de demostrar una unió específica de ZmFUSCA3 al DNA.

Donat que VP1 s'expressa lleugerament més tard a llavor que FUSCA3 (de forma anàloga a ABI3, que s'expressa lleugerament més tard que FUS3 a arabidopsis), sembla probable que el factor que hem clonat estigui implicat, com a mínim, en la regulació d'algunes d'aquestes proteïnes. Sembla factible, a més, que FUSCA3 sigui el coordinador entre el desenvolupament embrionari i l'acumulació de substàncies de reserva a escutel, però per un mecanisme diferent a l'acció de PBF sobre les proteïnes de reserva a endosperma: FUSCA3 el que faria seria regular la transició de la fase morfogenètica cap a la fase de maduració per regulació del balanç entre GA i ABA.

Tenint en compte tot el que hem comentat fins ara, podem establir una sèrie de paral·lelismes entre el procés de desenvolupament de la llavor a blat de moro i a arabidopsis (figura **100**) i evidenciar com molts dels mecanismes reguladors de l'expressió gènica es troben conservats a ambdues espècies.

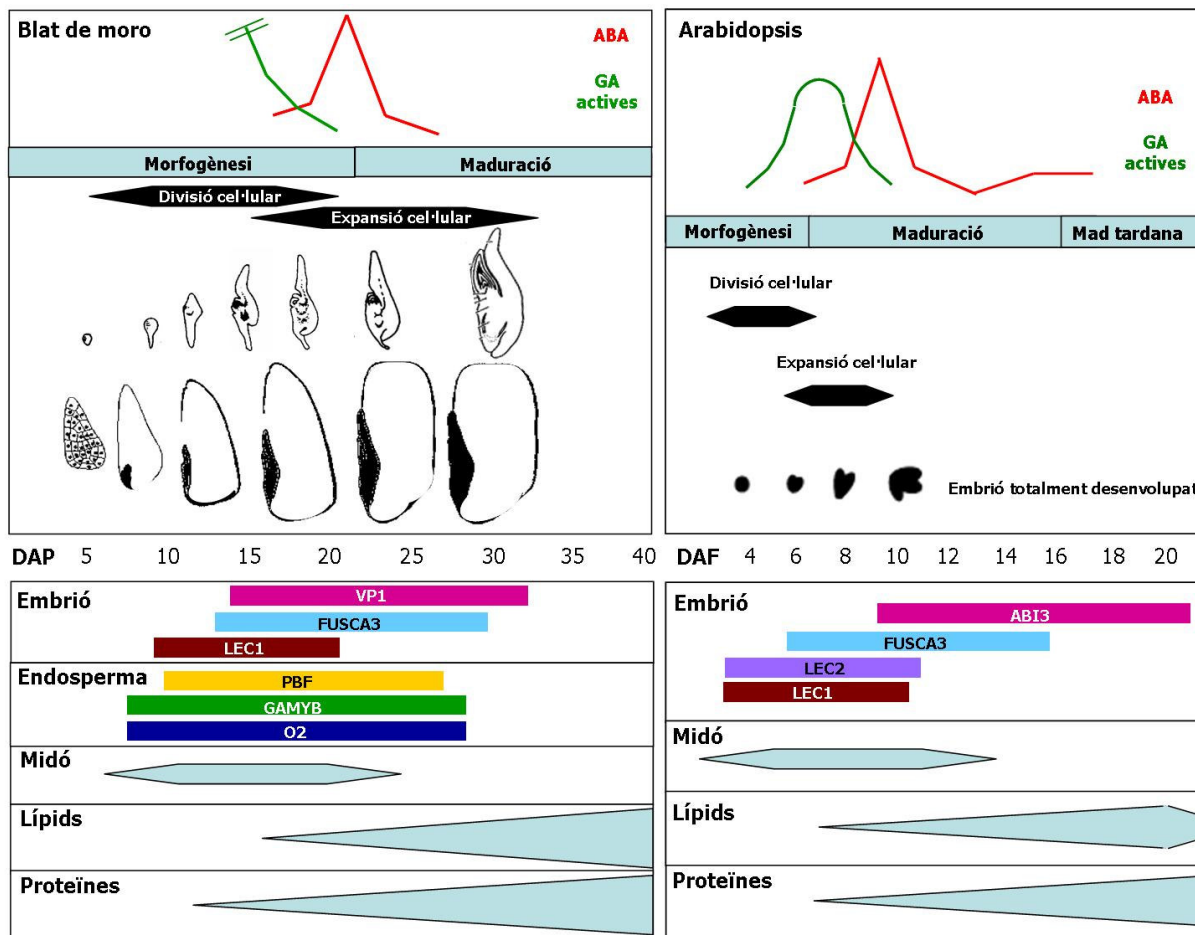


Figura 100. Principals esdeveniments en el desenvolupament de la llavor a *Zea mays* i a *Arabidopsis thaliana*. Representació esquemàtica de les principals etapes del desenvolupament de la llavor a blat de moro (embrions en fases de proembrió, transició, coleoptilar i estadis 1, 2, 3 i 4 segons (Abbe i Stein, 1954)) i a arabidopsis (embrions en fases globular, cor, torpedo i madur), mostrant la relació amb els nivells de GA actives i d'ABA, així com l'acumulació de substàncies de reserva i els factors de transcripció implicats. DAF (dies després de floració). Adaptat a partir de Goldberg (1989) i Vicente-Carbajosa (2005), amb modificacions.

Sincronització de l'expressió gènica de proteïnes de reserva amb el desenvolupament del gra de blat de moro: la importància del control combinatorial

Durant el desenvolupament i diferenciació, les plantes han d'integrar un sèrie de senyals interns i externs (mediambientals) que regulen els complexos patrons d'expressió gènica. La regulació de l'expressió gènica de proteïnes de reserva de la llavor, que combina l'expressió específica de teixit amb l'expressió lligada al desenvolupament, és un bon exemple de la complexitat dels mecanismes de regulació de l'expressió gènica a plantes. En aquest context, adquireix especial importància el control combinatorial front a l'acció de cada factor de transcripció per separat (Singh, 1998). A més, dotant a certs factors de transcripció amb funcions aparentment oposades en diferents moments del desenvolupament o en diferents teixits s'obté un mecanisme addicional de regulació, que no suposa un increment en el nombre de reguladors transcripcionals codificats pels genomes vegetals, que ja és de per si, prou elevat (Riechmann i col., 2000). Així, en el nostre sistema model, estudis recents apunten a un mecanisme de regulació global tant per PBF com per GAMYB i també per FUSCA3, en que els 3 factors s'involucrarien en processos de caràcter més general que la simple regulació de l'expressió de substàncies de reserva de forma lligada al desenvolupament del gra.

Recentment s'ha demostrat a ordi que bPBF presenta funcions antagòniques a l'endosperma en desenvolupament (activador de gens de prolamines) i a l'aleurona en germinació (repressor d'amilases) posant de manifest el paper dual de les seqüències reguladores de tipus AAAG així com dels factors de tipus DOF que els uneixen (Mena i col., 2002). Així, bPBF s'expressa a endosperma de forma lligada al desenvolupament i, posteriorment, s'expressa a aleurona en germinació en resposta a GA. Aquesta inducció per GA és lògicament contrarestada per l'aplicació d'ABA. En aquest sentit, el clonatge i posterior caracterització del factor OsDof3 (Washio, 2001,, 2003) ha identificat aquesta proteïna de tipus DOF com l'homòleg d'arròs més proper a mPBF, bPBF i wPBF. L'estudi de la seva funció ha revelat que es comporta com a repressor de α -amilases a aleurona d'arròs en germinació, de forma similar a bPBF. Assaigs funcionals d'activació per doble híbrid han evidenciat, però, que OsDof3 és un activador molt més dèbil que bPBF (Washio, 2003). Això té força sentit, donat que li manca la regió rica en Asn característica de les PBFs i putativament responsable de la seva capacitat activadora. En canvi, la regió C-terminal d'OsDof3 presenta un domini ric en Gly, que li dóna gran flexibilitat per interaccionar amb altres proteïnes, que li puguin proporcionar capacitat activadora.

Pel que fa a GAMYB, la seva capacitat de resposta a GA justifica la seva activació post-germinació a l'aleurona: la síntesi de GA per part de l'embrió en germinació i posterior transport a l'aleurona fa que GAMYB desencadeni l'activació dels gens d' α -amilases en aquest teixit, com s'ha demostrat a ordi (Gubler i col., 1999). En canvi, a endosperma, GAMYB es comporta com a inductor de l'acumulació de proteïnes de reserva durant el desenvolupament de la llavor (Díaz i col., 2002; i els nostres resultats). Aquesta dualitat funcional obliga a una fina regulació de les transicions entre les fases del desenvolupament en que predomina l'acció de GA (morfogènesi de l'embrió i post-germinació) i aquelles en les que predomina l'ABA (maduració de la llavor). Per això, a endosperma en desenvolupament VP1 s'encarrega de reprimir les α -amilases mentre hi ha nivells elevats de GA procedents de l'embrió i l'aleurona i GAMYB es troba actiu. En canvi, en post-germinació són les GA les que promouen l'activitat hidrolítica de les α -amilases via GAMYB. Aquesta activitat, però, és antagonitzada per ABA mitjançant múltiples reguladors negatius: la fosforilació inhibidora de GAMYB per PKABA, una cinasa tipus SnRK2 (Gomez-Cadenas i col., 2001); la inhibició de la senyalització per GA a través del repressor SLENDER1 (Gubler i col., 2002); o l'acció repressora de VP1 (Hoecker i col., 1999).

En aquest context, una funció de FUSCA3 a blat de moro similar a la que exerceix FUS3 a arabidopsis esdevé crucial, ja que inhibeix la síntesi de GA actives i promou la síntesi d'ABA. I aquesta funció estaria d'acord amb el patró d'expressió de FUSCA3 al gra de blat de moro: s'inicia la síntesi a embrió i a aleurona cap a 15 DAP i s'acumula a citoplasma fins que els nivells de GA actives disminueixen; quan els nivells d'ABA augmenten, la proteïna entra a nucli per desencadenar l'expressió dels seus gens diana, on s'afavoreix la seva permanència fins que ha realitzat la seva funció com a activador transcripcional. Aquest hipòtesi també està avalada pel fet que els factors tipus LEC d'arabidopsis (LEC1, LEC2 i FUS3) regulen l'aturada del creixement que marca la transició d'embriogènesi a fase de maduració (Gazzarrini i col., 2004), ja que l'etapa de maduració no es pot iniciar fins que s'ha aturat la divisió cel·lular (veure figura **100**), i reforçaria el paper de FUSCA3 com a super-regulador d'aquesta transició. Aquest paper coordinador de FUSCA3 durant el desenvolupament de la llavor fa, però, que sigui poc probable que aquest mateix tingui alguna funció durant la fase de germinació. De fet, a arabidopsis no s'ha observat encara expressió de FUSCA3 en la fase de germinació. Aquest resultat no és sorprenent, ja que el paper de FUSCA3 sembla que és, precisament, prevenir una entrada prematura en el programa de germinació de la llavor. La seva expressió en aquest moment, a més, no està afavorida, ja que les hormones que governen la germinació són les GA, i tenen efectes negatius no tant sobre l'expressió del gen com sobre la funció del factor FUSCA3.

