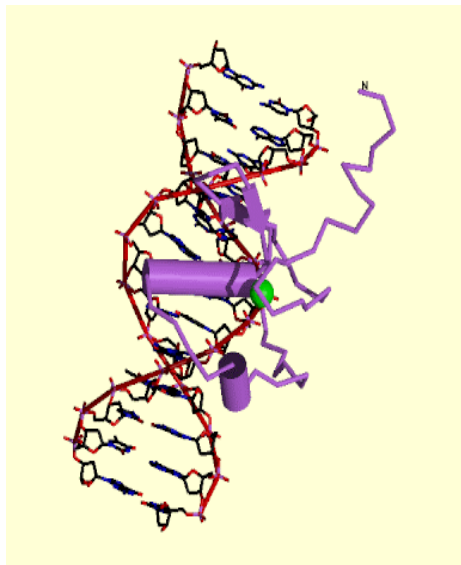


### 3.3 Caracterització de 912h, un factor de transcripció del tipus GATA /dit de zinc

#### 3.3.1 Característiques generals

El cDNA 912h és de 1880 pb i codifica per una proteïna de 253 aminoàcids amb un pes molecular teòric de 26.7 kDa i un punt isoelèctric 9.1. La proteïna 912h presenta un domini

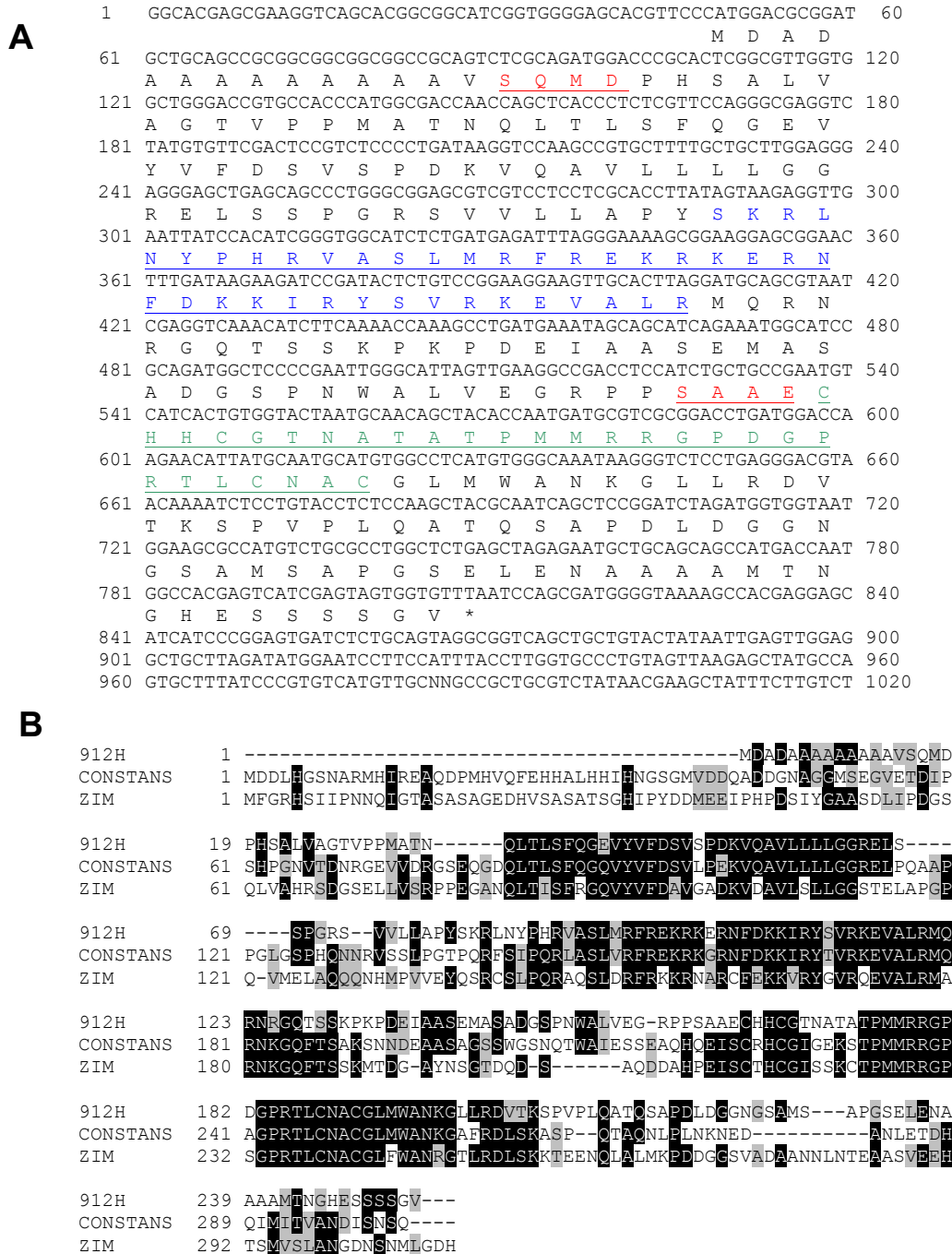


d'unió al DNA del tipus GATA /dit de zinc. La figura 30 (esquerra) mostra l'estructura 3D d'aquest domini. Està format per quatre cisteïnes coordinant un ió de zinc que s'uneix específicament a la seqüència de DNA (A/T)**GATA**(A/G) de la regió reguladora de determinats gens. Els motius GATA són del tipus LRE (Light Responsive Elements) i es troben en molts promotors de gens regulats per llum. S'ha demostrat que aquests motius són necessaris per l'activitat transcripcional regulada per llum (Millar and Kay, 1996). La majoria dels factors del tipus GATA/dit de zinc presenten dos dominis de dit de zinc encara

**Fig. 30: Domini GATA/dit de zinc** que també n'hi han de descrits només amb un. A la proteïna 912h, el domini GATA/dit de zinc es troba localitzat a l'extrem C-terminal de la proteïna a on també trobem tres llocs consens de fosforilació CK2. Un quart consens es localitza a l'extrem amino terminal de la proteïna També presenta una zona central bàsica rica en lisines i arginines que podria estar implicada en el transport a nucli. (veure seqüència proteica a la figura 31A).

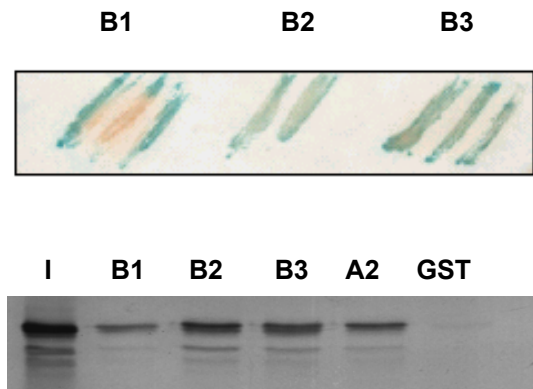
La proteïna 912h presenta homologia amb el factor de transcripció ZIM d'*Arabidopsis thaliana* (Nishii et al., 2000). El factor de transcripció ZIM (**Z**inc-finger protein expressed in **I**nflorescence **M**eristem) presenta un únic dit de zinc i s'expressa durant la fase reproductiva de la planta. Es creu que està implicat en processos de inflorescència i desenvolupament de la floració. Els factors de transcripció CONSTANS presenten dos dominis GATA/dit de zinc i la seva funció està relacionada amb la inducció de la floració durant fotoperíodes llargs (Puterill et al., 1995). A la figura 31B es mostra

l'alineament entre la proteïna 912h i les proteïnes ZIM i CONSTANS d'*Arabidopsis thaliana*.



**Figura 31: Caracterització de la proteïna 912h.** Seqüència nucleotídica i aminoacídica de 912h. En vermell, els llocs consens de fosforilació CK2, en verd el domini GATA/dit de zinc amb i en blau la zona bàsica. B: Alineament entre la proteïna 912h i les proteïnes ZIM (nº d'accés BAA97678) i CONSTANS d'*Arabidopsis thaliana* (nº d'accés NP\_564593)

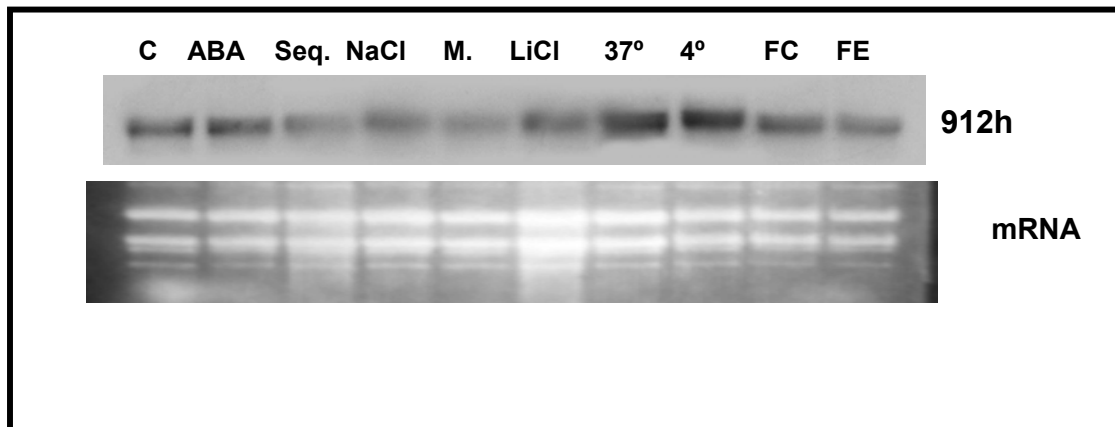
Experiments de mating i re-transformació en la soca AH109 mostren que 912h interacciona amb CK2- $\beta$ 1 i amb les altres subunitats reguladores CK2- $\beta$ 2 i CK2- $\beta$ 3. Mitjançant l'assaig "pull-down" es detecta també interacció amb la subunitat catalítica CK2- $\alpha$ -2 (Figura 32).



**Figura 32: Interacció entre la proteïna 912h i la proteïna quinasa CK2.** Assaig  $\beta$ -galactosidasa en filtre d'interacció entre 912h i CK2- $\beta$ -1, CK2- $\beta$ -2 i CK2- $\beta$ -3 realitzat a la soca AH109. Assaig "pull-down" d'interacció entre 912h i les proteïnes CK2- $\beta$ -1, CK2- $\beta$ -2, CK2- $\beta$ -3 i CK2- $\alpha$ -2 fusionades a GST i GST sola (control). L'input (I) representa el 10% de les proteïnes marcades.

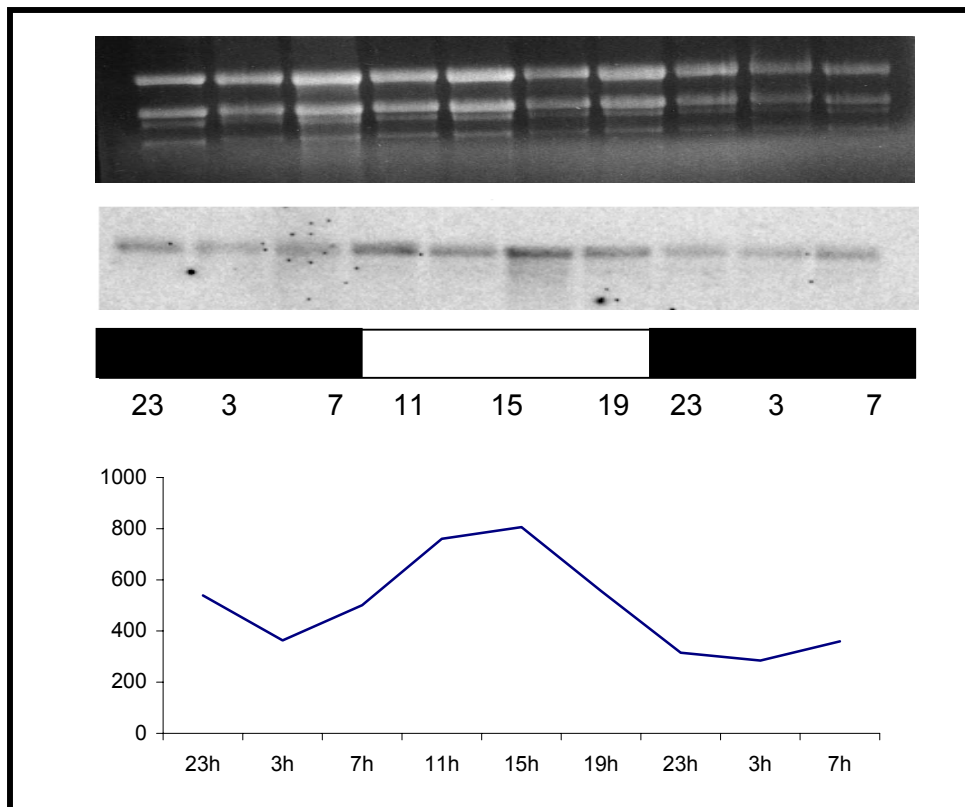
### 2.3 Expressió del transcrit 912h

Tenint en compte que 912h s'havia aïllat d'una llibreria realitzada a partir de fulla de blat de moro estressada per sequera, es va voler estudiar l'expressió gènica de 912h en resposta a diferents tipus d'estrès. Es van utilitzar "seedlings" de blat de moro de 5 dies i es van sotmetre a diferents tractaments: incubació amb 100  $\mu$ M ABA, sequera, 250 mM NaCl, 400 mM manitol, 15 mM LiCl, 37°C, 4°C. L'anàlisi de Northern blot es va dur a terme segons el protocol descrit al treball 1 i es va utilitzar el cDNA complet de 912h com a sonda. Els resultats indiquen que l'expressió del mRNA 912h no s'altera significativament respecte al control en resposta a cap dels diferents tractaments d'estrès realitzats.



**Figura 33: Anàlisi de l'expressió del transcrit 912h en resposta a diferents tipus d'estrès.** Es va extreure RNA de mostres de “seedlings” de blat de moro de 5 dies sotmeses a diferents tractaments: d'esquerra a dreta: C: control, 100  $\mu$ M ABA, sequera, 250 mM NaCl, 400 mM manitol, 15 mM LiCl, 37°C, 4°C, fulla control (FC) i fulla estrès hidric (FE) Cada carril conté 25  $\mu$ g de RNA missatger.

En plantes, l'expressió de alguns gens està regulada per ritme circadià endògen. En *Arabidopsis*, diversos factors de transcripció implicats en ritme circadià com CCA1, o LHY interaccionen amb la subunitat reguladora CK2 $\beta$  i són fosforilats per la proteïna CK2 (Sugano et al., 1998). Per una altra banda, el domini tipus GATA/dit de zinc present a 912h s'ha descrit en factors de transcripció implicats en processos regulats per llum com CONSTANS (Puterill et al., 1995). Amb l'objectiu de comprovar l'expressió de 912h en llum /foscour es van utilitzar “seedlings” de blat de moro de 5 dies i es van recollir mostres cada 4 hores durant un tractament de llum de “Short day” (SD): 16 hores de foscour i 8 hores de llum. Es va fer un anàlisi de Northern blot i la es va quantificar els resultats utilitzant el programa “Quantity one” de Bio-Rad. A la figura 34 es mostren els resultats obtinguts, que indiquen que hi ha una major expressió del mRNA de 912h en llum que en foscour.



**Figura 34: Anàlisi de l'expressió del transcrit 912h en cicle llum/fosc.** Es va extreure RNA de mostres de "seedlings" de blat de moro de 5 dies i es van recollir mostres cada 4 hores durant un tractament de llum de "Short day" (SD): 16 hores de fosc (en negre) i 8 hores de llum (en blanc). Cada carril conté 25 µg de RNA missatger.

### 2.3 Fosforilació de 912h per la proteïna quinasa CK2.

La seqüència aminoacídica de 912h conté quatre llocs consens de fosforilació CK2 (Figura 31). Per tant, era interessant saber si la proteïna 912h, a més d'interaccionar amb CK2, és també substrat d'aquesta quinasa. Amb aquest objectiu, el cDNA de 912h es va clonar al vector d'expressió pET28a i la proteïna 912h es va sobreexpressar en *E.coli* fusionada a una cua d'histidines (Figura 32). Seguidament, es va realitzar un assaig de fosforilació *in vitro* utilitzant la subunitat CK2 $\alpha$  i l'holoenzim CK2 reconstituït amb CK2 $\alpha$ -1 i CK2 $\beta$ -1 GST. Les proteïnes 912h i CK2 $\beta$  tenen una pes molecular molt similars i migren a la mateixa alçada del gel SDS-PAGE, tot i així, es comprova que tant la subunitat catalítica CK2 $\alpha$  sola com l'holoenzim CK2 poden fosforilar la proteïna 912h.