



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria Agroalimentària  
i de Biosistemes de Barcelona



# **GENERACIÓ DE VECTORS DE CLONACIÓ I TRANSFORMACIÓ TRANSITÒRIA DE *Nicotiana benthamiana* PER A L'ESTUDI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA MITJANÇANT LA TÈCNICA TURBOID**

Treball Final de Grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Biel Benaiges Cros

Tutor UAB: Jordi Moreno Romero

Tutora UPC: Irma Roig Villanova

26 / setembre / 2023

## Resum

En condicions d'alta densitat vegetal, les plantes detecten canvis en la qualitat de la llum que reben i activen un sistema anomenat "síndrome de fugida de l'ombra", un conjunt de canvis en el desenvolupament per competir per la llum amb les plantes veïnes i evitar que aquestes projectin ombra sobre seu.

Aquest mecanisme està regulat per un gran nombre i varietat de proteïnes, com per exemple el factor de transcripció PIF7 i la proteïna remodeladora de la cromatina LHP1, les quals s'ha demostrat que tenen un paper crucial en la regulació de la síndrome de fugida de l'ombra.

Aquest treball se centra en la preparació de la tècnica TurboID, que permet analitzar les interaccions proteïna-proteïna per tal d'entendre millor els mecanismes pels quals aquestes proteïnes regulen l'expressió gènica durant la resposta a ombra. Per fer-ho, és necessari fusionar la proteïna TurboID (una biotina lligasa) a les proteïnes LHP1 i PIF7 mitjançant una clonació.

A partir de les fusions proteiques LHP1-TurboID i PIF7-TurboID (a les que anomenem construccions), s'ha realitzat una transformació transitòria de la planta de tabac *Nicotiana benthamiana*. Posteriorment, s'ha analitzat *in vivo* l'expressió gènica mitjançant anàlisi de RNA, així com i la presència de les proteïnes fusionades a través de *Western Blot* i mitjançant microscòpia confocal.

Finalment, s'ha analitzat l'activitat biotina lligasa de les proteïnes de fusió a través de detecció de biotina. Aquests experiments han permès comprovar el correcte funcionament de les construccions generades, el que dona llum verda a posteriors anàlisis de transformació estable i de detecció de proteïnes biotinilades per la TurboID.

## Resumen

En condiciones de alta densidad vegetal, las plantas detectan cambios en la calidad de la luz que reciben y activan un sistema llamado "síndrome de huida de la sombra", que implica una serie de cambios en su desarrollo para competir por la luz con las plantas vecinas y evitar que estas proyecten sombra sobre ellas.

Este mecanismo está regulado por un gran número y variedad de proteínas, como el factor de transcripción PIF7 y la proteína remodeladora de la cromatina LHP1, las cuales se ha demostrado que desempeñan un papel crucial en la regulación del síndrome de huida de la sombra.

Este trabajo se enfoca en la preparación de la técnica TurboID, que permite analizar las interacciones proteína-proteína para comprender mejor los mecanismos a través de los cuales estas proteínas regulan la expresión génica durante la respuesta a la sombra. Para llevar a esto cabo, es necesario fusionar la proteína TurboID (una biotina ligasa) con las proteínas LHP1 y PIF7 mediante clonación.

A partir de las fusiones proteicas LHP1-TurboID y PIF7-TurboID a las que llamamos construcciones, se realizó una transformación transitoria de la planta de tabaco *Nicotiana benthamiana*. Posteriormente, se analizó *in vivo* la expresión génica mediante el análisis de RNA y la presencia de las proteínas fusionadas mediante *Western Blot* y microscopía confocal.

Finalmente, se evaluó la actividad de la biotina ligasa de las proteínas fusionadas mediante la detección de la biotina. Estos experimentos permitieron confirmar el correcto funcionamiento de las construcciones generadas, lo que dio luz verde al posterior análisis de transformación estable y a la detección de proteínas biotiniladas por la TurboID.

## Abstract

In high plant density conditions, plants detect changes in the quality of the light they receive and activate a system called the "shade avoidance syndrome", which involves a series of changes in their development to compete with neighbouring plants for light and prevent neighbouring plants shading them.

This mechanism is regulated by a large number and variety of proteins, such as the transcription factor PIF7 and the chromatin remodelling protein LHP1, which have been shown to play a crucial role in the regulation of the shade avoidance syndrome.

This work focuses on the preparation of the TurboID technique, which allows the analysis of protein-protein interactions to better understand the mechanisms through which these proteins regulate gene expression during response to shade. To carry this out, it is necessary to fuse the TurboID protein (a biotin ligase) with the LHP1 and PIF7 proteins through cloning.

Starting from the LHP1-TurboID and PIF7-TurboID protein fusions (called constructs), a transient transformation was performed in the *Nicotiana benthamiana* tobacco plants. Subsequently, the genetic expression of RNA and the presence of the fused proteins were analysed *in vivo* through *Western Blot* and confocal microscopy.

Finally, the activity of the biotin ligase of the fused proteins was evaluated through biotin detection. These experiments confirmed the proper functioning of the generated constructs, which gave the green light to the stable transformation phase and the subsequent detection of biotinylated proteins by TurboID.

## Sumari

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>9</b>
1.1 La proximitat vegetal.....	10
1.1.1 Definició de proximitat vegetal i síndrome de fugida de l'ombra.....	10
1.1.2 Percepció i senyalització de la proximitat vegetal.....	11
1.1.3 Mecanisme de resposta a l'ombra.....	12
1.1.4 Paper de l'estructura de la cromatina en les respostes a l'ombra.....	12
1.2 Antecedents del treball.....	16
1.2.1 Generació de les construccions no funcionals de PIF7 i LHP1.....	17
1.2.2 Comprovació del funcionament de les construccions a través de transformació transitòria.....	18
1.2.3 Assaig estudi proteïnes en proximitat: TurboID.....	19
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>21</b>
2.1 Objectiu general.....	21
2.2 Objectius específics.....	21
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>22</b>
3.1 Materials.....	22
3.1.1 Soques bacterianes.....	22
3.1.2 Vectors i plasmidis.....	22
3.1.3 Encebadors o <i>Primers</i> .....	23
3.1.4 Medi de cultiu i antibiòtics.....	25
3.2 Mètodes per a la clonació.....	26
3.2.1 Mutagènesi dirigida.....	26
3.2.2 Digestió de DNA no mutat.....	31
3.2.3 Transformació d' <i>Escherichia coli</i> mitjançant xoc tèrmic.....	32
3.2.4 Plaqueig de les cèl·lules d' <i>E. coli</i> transformades amb plasmidis digerits.....	32
3.2.5 Extracció de DNA plasmídic a través de miniprep.....	33
3.2.6 Reacció LR (clonació Gateway).....	35
Plasmidis amb el gen <i>TurboID</i> .....	36
3.2.7 Transformació TOP10.....	38
3.2.8 Purificació i quantificació dels plasmidis.....	38
3.2.9 Digestió per enzim de restricció.....	39
3.2.10 Transformació d' <i>A. tumefaciens</i> .....	39
3.2.11 Plaqueig de les mostres d' <i>A. tumefaciens</i> transformades amb pBB3-6.....	40
3.2.12 Purificació i PCR de plasmidi pBB3-6 obtingut d' <i>A. tumefaciens</i> .....	40
3.3 Mètodes per a la transformació transitòria.....	41
3.3.1 Precultius per a agroinfiltració.....	42
3.3.2 Agroinfiltració dels plasmidis d'interès.....	42
3.3.3 Extracció RNA.....	43
3.3.4 Síntesi de cDNA (protocol <i>iScript</i> ).....	44

3.3.5	PCR quantitativa .....	45
3.3.6	Extracció proteïna .....	47
3.3.7	Preparació gel de poliacrilamida.....	48
3.3.8	Electroforesi .....	49
3.3.9	Transferència de proteïna.....	50
3.3.10	Hibridació i detecció de senyal de la membrana.....	52
<b>4.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>54</b>
4.1	La mutagènesi dirigida ens permet obtenir les construccions control per a la tècnica del TurboID.....	54
4.1.1	L'ampliació per PCR no dona en totes les reaccions fragments de la mida esperada al analitzar-los per electroforesi en gel d'agarosa.....	56
4.1.2	La transformació d' <i>E. coli</i> presenta colònies en totes les reaccions de PCR realitzades .....	58
4.1.3	La seqüenciació dels plasmidis pBB1 ( <i>LHP1</i> ) i pBB2 ( <i>PIF7</i> ) mostra que els gens estan mutats a la posició que esperàvem .....	60
4.2	Mitjançant clonació Gateway es van obtenir els vectors d'expressió amb LHP1 i PIF7 mutats combinats amb TurboID .....	62
4.2.1	Els plasmidis pBB3, pBB4, pBB5 i pBB6 tenen un patró de digestió amb enzims de restricció esperat.....	63
4.2.2	La transformació d' <i>A. tumefaciens</i> amb els plasmidis pBB3, pBB4, pBB5 i pBB6 permet aïllar colònies positives .....	64
4.2.3	La PCR dels plasmidis de les soques positives d' <i>A. tumefaciens</i> confirma que s'ha incorporat el plasmidi i que per tant es poden utilitzar per transformar cèl·lules vegetals.....	66
4.3	Mitjançant transformació transitòria, es determina que els vectors per a la tècnica TurboID s'expressen en cèl·lules vegetals i tenen activitat biotina lligasa.....	68
4.3.1	Fent servir els vectors amb la proteïna fluorescent Neon, s'observa que la transformació transitòria funciona.....	68
4.3.2	Les plantes de tabac de tres setmanes d'edat mostren una major eficiència en l'expressió dels vectors .....	70
4.3.3	Podem detectar activitat biotina lligasa als construccions amb TurboID .....	72
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>76</b>
6.1	Referències bibliogràfiques.....	76
6.2	Bibliografia complementària.....	78

## Índex de figures

<i>Figura 1.1: variació de creixement en funció de la densitat vegetal</i>	11
<i>Figura 1.2: mecanisme de resposta a l'ombra</i>	12
<i>Figura 1.3: estructura de la cromatina</i>	13
<i>Figura 1.4: unió de PIF7 al DNA a través del l'estructura bHLH</i>	14
<i>Figura 1.5: unió de LHP1 a la cromatina a través de la marca H3K27me3</i>	15
<i>Figura 1.6: allargament d'hipocòtil en presència/absència del gen LHP1 [11]</i>	16
<i>Figura 1.7: funcionament de la tècnica TurboID</i>	20
<i>Figura 3.1: vectors de la clonació Gateway</i>	35
<i>Figura 3.2: destination vectors IF3 i IF4</i>	37
<i>Figura 3.3: distribució del panell sandwich</i>	51
<i>Figura 4.1: esquema de la mutagènesi dirigida</i>	55
<i>Figura 4.2: resultats de l'electroforesi double-primer i single-primer PCR</i>	57
<i>Figura 4.3: plaques amb el plasmidi pBB1</i>	59
<i>Figura 4.4: plaques amb el plasmidi pBB2</i>	59
<i>Figura 4.5: mismatch del plasmidi pBB1 respecte pML1</i>	61
<i>Figura 4.6: mismatch del plasmidi pML2</i>	61
<i>Figura 4.7: esquema de la clonació Gateway</i>	62
<i>Figura 4.8: electroforesi dels plasmidis pBB3-pBB6</i>	64
<i>Figura 4.9: plaques dels plasmidis pBB3-pBB6</i>	65
<i>Figura 4.10: electroforesi en gel d'agarosa de plasmidis obtinguts d'A. tumefaciens</i>	67
<i>Figura 4.11: fulles de tabac transformades amb pML5-8 i observades al microscopi confocal</i>	69
<i>Figura 4.12: Anàlisi d'expressió de pML5 i pML7 en plantes de 3 i 4 setmanes</i>	71
<i>Figura 4.13: resultats de la tècnica Western Blot</i>	72
<i>Figura 4.14: detecció de l'activitat biotina lligasa aportada per el gen TurboID</i>	74

## Índex de taules

<b>Taula 3.1: seqüències dels primers utilitzats</b>	23
<b>Taula 3.2: concentracions dels antibiòtics utilitzats</b>	26
<b>Taula 3.3: components de la PCR per a la mutagènesi dirigida</b>	28
<b>Taula 3.4: primers afegits en cada barreja (Mix) per a la mutagènesi dirigida</b>	29
<b>Taula 3.5: condicions del termociclador per a la mutagènesi dirigida</b>	30
<b>Taula 3.6: condicions del termociclador per a la desnaturalització</b>	31
<b>Taula 3.7: volums per a la digestió del DNA metilat (plasmidi no mutat)</b>	32
<b>Taula 3.8: plasmidis utilitzats per a la seqüenciació capil·lar post-mutagènesi dirigida</b>	34
<b>Taula 3.9: vectors de la clonació Gateway</b>	38
<b>Taula 3.10: components de la digestió per enzim de restricció</b>	39
<b>Taula 3.11: components per a la síntesi de cDNA</b>	45
<b>Taula 3.12: paràmetres del termociclador per a la PCR de síntesi de cDNA</b>	45
<b>Taula 3.13: components de la PCR quantitativa</b>	46
<b>Taula 3.14: ordre placa de tubs per a qPCR</b>	47
<b>Taula 3.15: components de la solució EXTRACTION BUFFER</b>	48
<b>Taula 3.16: components del tampó d'electroforesi RUNNING BUFFER</b>	49
<b>Taula 3.17: components de la solució BLOKING SOLUTION</b>	52
<b>Taula 3.18: components de la solució HYBRIDIZATION SOLUTION</b>	52



## Agraïments

Vull aprofitar aquest punt per agrair profundament a les persones que m'han acompanyat durant la realització d'aquest Treball de Fi de Grau.

Primerament, vull agrair a Jordi Moreno Romero que m'hagi convidat al seu laboratori per formar part del seu treball d'investigació, i pel seu assessorament i ajuda durant tot el projecte. La seva orientació i paciència amb mi han sigut claus per a poder realitzar aquest treball.

Vull agrair també a Irma Roig Villanova per l'oportunitat de fer aquest treball, i, sobretot, per l'incalculable valor de tot el que ens ha ensenyat i transmès durant aquests anys de carrera universitària.

## 1. Introducció

La investigació genètica en plantes és un àmbit científic crucial per a comprendre el funcionament dels processos biològics que controlen el creixement, el desenvolupament, la resistència a malalties i l'adaptació de les plantes al seu entorn. El coneixement d'aquests aspectes, juntament amb l'ús de tècniques avançades de seqüenciació i edició genètica, permet que sigui possible la identificació dels gens responsables de característiques d'interès, facilitant d'aquesta forma l'estudi dels mecanismes i factors que controlen l'expressió gènica de l'individu.

Un factor de gran importància que afecta la regulació de l'expressió gènica és l'ambient, ja que les condicions ambientals sota les quals creix un individu poden actuar com a activadores o repressores de gens que en regulen el creixement i la resposta adaptativa. És a dir, les condicions ambientals tenen efectes a nivell epigenètic, ja que poden alterar com es llegeix i es regula el material genètic de l'organisme sense alterar-ne la seva seqüència de DNA.

En l'àmbit de l'agricultura, per exemple, els factors ambientals i el seu efecte sobre l'expressió gènica d'un individu són de gran rellevància, ja que el creixement d'un cultiu està constantment afectat per una ampla varietat de canvis ambientals, com podrien ser variacions en el clima o la disponibilitat d'aigua i nutrients. Aquestes variacions poden suposar canvis en la productivitat i la riquesa del cultiu, fins al punt que una mateixa varietat presenta creixements dispars en funció de la regió i de les condicions de creixement a les que està sotmesa.

Dintre de l'ampli ventall de factors ambientals que poden condicionar un cultiu, aquest treball s'emmarca en l'estudi dels efectes de la proximitat vegetal, és a dir, en l'impacte que té la distància i disposició entre plantes individuals en l'expressió gènica, causant canvis morfològics en les plantes que influeixen profundament el seu creixement i desenvolupament.

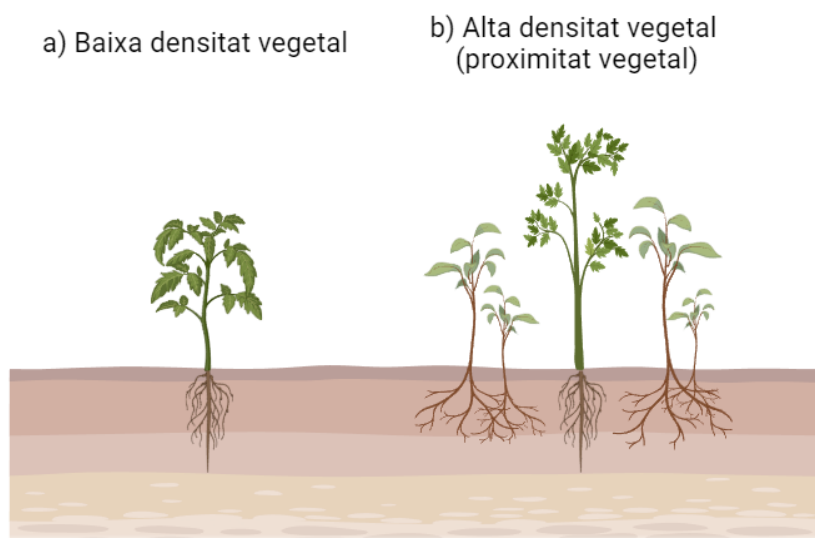
## 1.1 La proximitat vegetal

### 1.1.1 Definició de proximitat vegetal i síndrome de fugida de l'ombra

La proximitat vegetal pot suposar, tant en condicions naturals com en cultius agrícoles, que les plantes rebin ombra projectada per les plantes veïnes. Davant d'aquesta situació, disposen de diversos mecanismes per assegurar la seva supervivència, que són, en essència, evitar l'ombra o bé ser capaces de tolerar-la [1]

Les plantes capaces de tolerar l'ombra solen ser plantes de sotabosc, mentre que les plantes que creixen en espais assolellats estableixen un mecanisme de fugida de l'ombra, i, per tant, de competició per la llum, anomenat síndrome de fugida de l'ombra o SAS (de l'anglès *Shade Avoidance Syndrome*). Aquesta síndrome produeix diversos canvis morfològics en l'individu, com poden ser l'allargament de l'hipocòtil, tija, i pecíols, o la reducció del temps de floració [2]. Aquests canvis afavoreixen l'allargament de la planta per intentar captar la llum, mentre que disminueixen l'àrea foliar i la producció de fruits i llavors, la qual cosa minva la collita en el cas dels cultius.

Aquest mecanisme s'activa quan la planta detecta altres individus al seu voltant que poden, potencialment, suposar una adversitat a l'hora de captar l'energia solar necessària per al seu correcte desenvolupament a través de les rutes fotosintètiques (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1: variació de creixement en funció de la densitat vegetal**

a) Creixement en baixa densitat vegetal o de “no proximitat vegetal”; b) Creixement accelerat com a conseqüència de la síndrome de fugida de l'ombra en situacions de proximitat vegetal; Imatge generada a través de la web <https://www.biorender.com/>

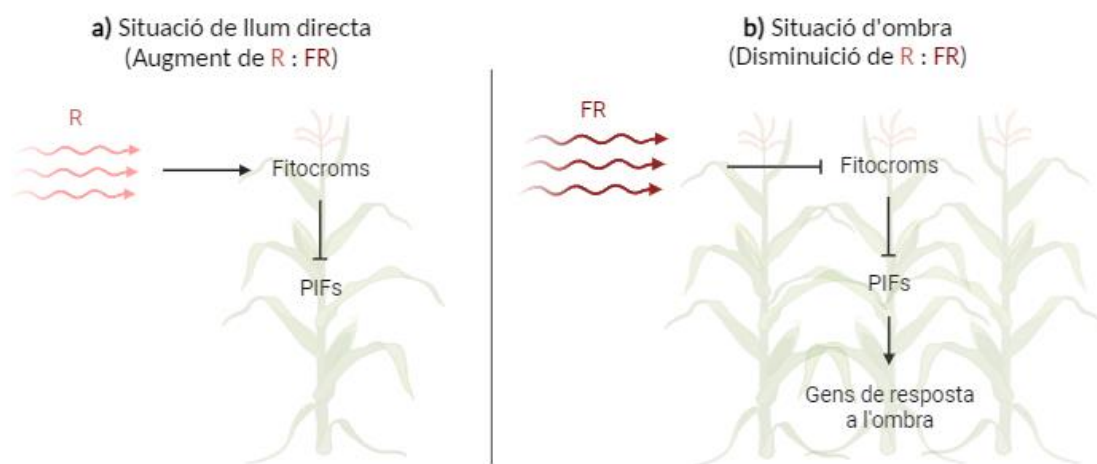
### 1.1.2 Percepció i senyalització de la proximitat vegetal

Els fitocroms són un element clau en els mecanismes de resposta a l'ombra, ja que realitzen la funció de fotoreceptors. Aquestes proteïnes presenten un component anomenat cromòfor, que té la capacitat d'absorbir fotons de llum d'una determinada longitud d'ona, i transmetre aquesta energia al fotoreceptor. Específicament, els fitocroms tenen la capacitat d'absorbir rangs de longitud d'ona que es troben entre els 600 i 750 nanòmetres, equivalents al roig (R, de l'anglès *Red*) i al roig llunyà (FR, de l'anglès *Far Red*), respectivament [3]

D'altra banda, un altre component important en aquest mecanisme són els factors de transcripció, proteïnes que tenen la funció d'unir-se a una seqüència específica de DNA, i induir la transcripció i l'expressió de determinats gens. Existeixen diversos factors de transcripció que formen part del mecanisme de resposta a l'ombra, anomenats factors d'interacció amb fitocrom o PIFs (de l'anglès *Phytochrom Interaction Factors*), molts dels quals s'han estudiat en la planta model *Arabidopsis*, sent el més rellevant en la regulació de la resposta a ombra l'anomenat PIF7 [4].

### 1.1.3 Mecanisme de resposta a l'ombra

En situacions de llum on predominen els rangs de longitud d'ona R, com pot ser quan les plantes reben directament la llum solar, la proporció R:FR és alta, causant que els fitocroms promoguin la inhibició dels PIFs a través de fosforització, ubiquitinació i altres reaccions químiques [5]. D'altra banda, en situació d'ombra, quan la planta rep el FR reflectit per les plantes adjacents, la proporció R:FR disminueix, causant la inhibició de fitocroms. Això causa una disminució de la repressió del PIFs, afavorint d'aquesta forma la seva activitat, promovent l'expressió dels gens de resposta a l'ombra (**Figura 1.2**).



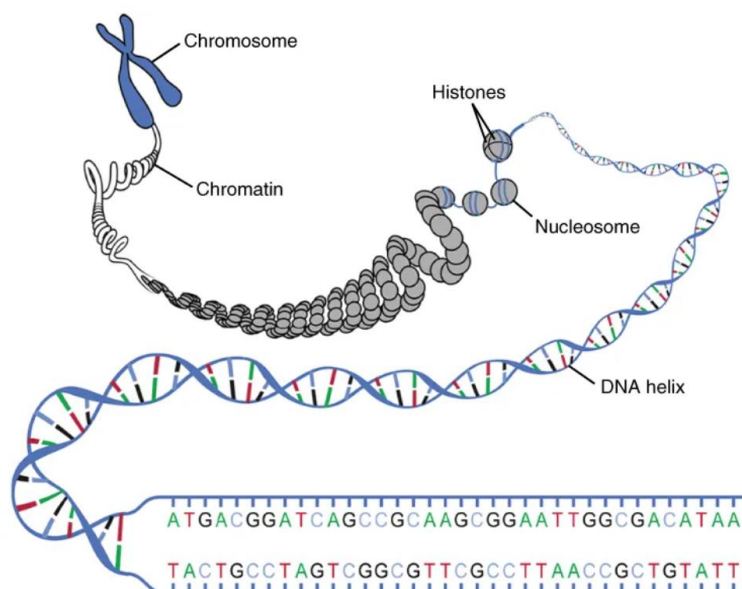
**Figura 1.2: mecanisme de resposta a l'ombra**

*a) En situacions de llum directa, els fitocroms promouen la inhibició dels PIF; b) En situacions d'ombra (alta densitat vegetal), els rangs d'ona FR inhibeixen l'activitat dels fitocroms, afavorint l'activitat dels PIFs i promovent l'expressió dels gens de resposta a l'ombra; Imatge generada a través de la web <https://www.biorender.com/>*

### 1.1.4 Paper de l'estructura de la cromatina en les respostes a l'ombra

El material genètic, que pren forma de doble cadena de DNA, s'organitza de forma compacta a l'interior del nucli formant l'estructura que coneixem com a cromatina. Aquesta estructura té com a unitats bàsiques unes subestructures anomenades nucleosomes, regions de DNA enrotllat al voltant d'un octàmer de quatre proteïnes histones (H2A, H2B, H3 i H4) (**Figura 1.3**).

L'activitat dels factors de transcripció es troba estretament lligada a l'estructura de la cromatina, ja que el seu nivell de compactació pot influenciar la seva accessibilitat, permetent o implicant la unió dels factors de transcripció o altres proteïnes.



**Figura 1.3: estructura de la cromatina**

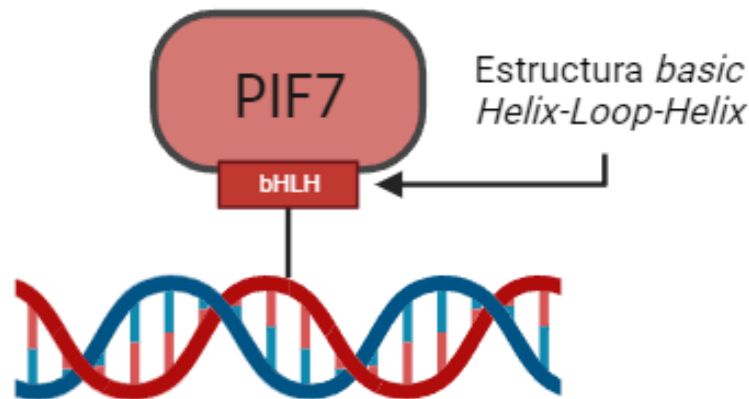
Adaptat de la web [www.differencebetween.com](http://www.differencebetween.com)

#### PIF 7, un factor de transcripció pioner:

Davant d'una estructura de cromatina altament condensada (heterocromatina), els factors de transcripció pioners tenen la capacitat d'unir-se a zones de la cromatina inaccessibles per a altres proteïnes. Aquests factors de transcripció pioners poden atraure proteïnes remodeladores de la cromatina, capaces de reestructurar la compactació d'aquesta i permetre l'accés d'altres factors de transcripció i de proteïnes necessàries per a la transcripció del DNA.

Un exemple de factor de transcripció pioner és PIF7, un factor d'interacció amb fitocrom el qual s'ha demostrat que presenta un rol dominant en la regulació de l'allargament de l'hipocòtil en les respostes a l'ombra [6]. Aquesta proteïna presenta un domini anomenat bHLH, de l'anglès *basic*

*Helix-Loop-Helix*, amb una estructura tridimensional altament específica que li permet unir-se a l'estructura del DNA. (Figura 1.4)



**Figura 1.4: unió de PIF7 al DNA a través de l'estructura bHLH**

Imatge generada a través de la web <https://www.biorender.com/>

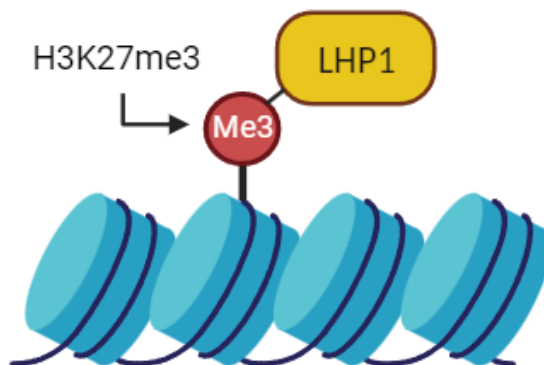
Entre els diversos mecanismes remodeladors de cromatina descrits [7][8][9], se sospita que PIF7 pot tenir un paper important en el reclutament de proteïnes capaces de regular l'expressió genètica i l'estructura de la cromatina, actuant principalment en la repressió de gens específics relacionats amb el creixement.

Totes aquestes evidències assenyalen PIF7 com un element clau per a entendre els mecanismes que regulen l'expressió genètica i les respostes de les plantes a l'ombra, per la qual cosa aquesta proteïna és un dels objectes d'estudi d'aquest treball.

#### PROTEINES REMODELADORES DE LA CROMATINA I LHP1

Les proteïnes remodeladores de la cromatina són proteïnes amb la capacitat de modificar l'estructura de la cromatina, facilitant o obstaculitzant l'accés a certes regions del DNA i afectant d'aquesta manera a l'expressió gènica d'un individu.

Un exemple d'aquest tipus de proteïna és la LHP1 (de l'anglès *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*), encarregada de mantenir l'estructura de l'heterocromatina, és a dir, de mantenir el DNA en la seva forma altament condensada. La proteïna LHP1 té la capacitat d'unir-se a la cromatina a través del reconeixement d'una trimetilació de la cua N-terminal present en la histona H3 (marca H3K27me3) (**Figura 1.5**). Sense aquest domini, LHP1 no pot unir-se a la cromatina i perd la seva funció [10].



**Figura 1.5:** unió de LHP1 a la cromatina a través de la marca H3K27me3

*Imatge generada a través de la web <https://www.biorender.com/>*

Un experiment ha demostrat que l'activitat de LHP1 forma part del mecanisme de regulació de la senyalització en ombra. Aquest experiment s'ha realitzat simulant condicions d'ombra al laboratori (situació sense ombra simulada amb llum blanca, W de l'anglès *white*; situació d'ombra simulada enriquint la llum W amb FR, W+FR). En aquestes condicions, la varietat silvestre Columbia-0 (Col-0), capaç de sintetitzar la proteïna LHP1, mostra un allargament de l'hipocòtil en condicions d'ombra simulada, i, per tant, presenta mecanismes de resposta a l'ombra. En canvi, la línia mutant d'*Arabidopsis thaliana* anomenada *tf12*, incapaç de sintetitzar la proteïna LHP1, presenta defectes en l'allargament de l'hipocòtil i perd la capacitat de resposta a l'ombra (**Figura 1.6**) [11].





**Figura 1.6: allargament d'hipocòtil en presència/absència del gen *LHP1* [11]**

*D'esquerra a dreta, creixement de les varietats d'Arabidopsis Col-0 (silvestre) i mutant *tf12* en llum blanca (W) i en condicions d'ombra simulada (llum blanca enriquida en roig llunyà, W+FR).*

De la mateixa forma que amb PIF7, encara no es té un coneixement complet sobre quins mecanismes regulen el funcionament de LHP1 i el seu efecte en els mecanismes de resposta a l'ombra. A causa d'això, i de la possibilitat que PIF7 actuï com a pioner en un mecanisme on participa LHP1, en aquest treball es pretén aprofundir en l'estudi de la xarxa d'interaccions d'aquestes proteïnes que podrien regular la síndrome de fugida de l'ombra.

## 1.2 Antecedents del treball

Aquest treball forma part d'una investigació duta a terme pel grup Plant Environmental Epigenetics de la Universitat Autònoma de Barcelona, que té l'objectiu d'estudiar els mecanismes que regulen la síndrome de fugida de l'ombra. Aquests coneixements es podrien traslladar en un futur de la planta model *Arabidopsis thaliana* a plantes d'interès agronòmic i explorar la possibilitat d'aplicar aquests coneixements a programes de millora de cultius, seleccionant cultius més tolerants a l'ombra.

En concret, aquest treball se centra en la preparació de les construccions necessàries per a la realització de la tècnica TurboID, que es durà a terme posteriorment. Aquesta tècnica permetrà l'estudi de les interaccions proteïna-proteïna de les ja mencionades PIF7 i LHP1, el que ajudarà a entendre millor el seu paper i el mecanisme pel qual regulen les respostes a l'ombra.

### 1.2.1 Generació de les construccions no funcionals de PIF7 i LHP1

En aquest treball es portarà a terme la generació de construccions que contenen el gen *TurboID* (la funció del qual s'explicarà més endavant en aquest treball) juntament amb els gens *PIF7* i *LHP1*, i, en alguns casos, amb el gen *Neon*, que permetrà observar fluorescència sota microscopi per a comprovar el funcionament de la construcció.

Els gens *PIF7* i *LHP1* seran sotmesos a una mutació per a convertir-los en "no funcionals", és a dir, per inhibir la seva capacitat d'unió. En el cas de *PIF7*, es mutarà el domini bHLH perquè no es pugui unir al DNA, mentre que en *LHP1* es mutarà la regió que permet la unió a la cromatina. Aquestes mutacions s'indueixen amb l'objectiu de descobrir les interaccions proteïna-proteïna que es produeixen quan *PIF7* i *LHP1* no es troben unides al DNA i a la cromatina, respectivament. És a dir, quan no tenen la capacitat de participar en el mecanisme de resposta a l'ombra. Per tant, aquelles proteïnes que interaccionin amb aquestes versions mutades ho estaran fent independentment dels mecanismes de regulació de resposta a l'ombra.

D'altra banda, quan es realitzi la tècnica TurboID, també s'estudiarà quines són les proteïnes que interaccionen amb les varietats funcionals (no mutades) de *PIF7* i *LHP1*. En aquest experiment s'esperen obtenir les mateixes proteïnes que interaccionen amb les varietats mutades (que ho fan independentment dels mecanismes de regulació de resposta a l'ombra) i, a més a més, les proteïnes que interaccionen amb *PIF7* i *LHP1* durant la resposta a l'ombra (i que, per tant, poden formar part dels mecanismes que regulen aquesta resposta).

Així doncs, comparant les interaccions de les variants funcionals i no funcionals, utilitzades com a control, es podrà determinar quines de les proteïnes interaccionen amb *PIF7* i *LHP1* durant els mecanismes de resposta a l'ombra, i quines ho fan per altres motius amb independència de la resposta a ombra.

### 1.2.2 Comprovació del funcionament de les construccions a través de transformació transitòria

D'altra banda, es portarà a terme una transformació transitòria de la planta *Nicotiana benthamiana* amb l'objectiu de comprovar el correcte funcionament de les construccions que contenen el gen *TurboID*, juntament amb les versions funcionals (no mutades) de *PIF7* i *LHP1*. Aquestes construccions estaven disponibles al laboratori de forma prèvia a aquest treball.

La transformació transitòria té com a objectiu introduir temporalment gens d'interès a les cèl·lules vegetals. És una tècnica que es pot realitzar en un curt període de temps, el que la fa idònia per a verificar si les construccions s'expressen correctament a l'individu. No obstant això, la seva limitació temporal la fa menys útil per a estudis a llarg termini, com és el cas, ja que aquest tipus de transformació no es pot utilitzar per a realitzar la tècnica TurboID.

Per dur a terme aquesta transformació, s'utilitzaran varietats de *N. Benthamiana* que no són capaces de sintetitzar constitutivament PIF7 i LHP1. Això es fa per tal d'assegurar que la presència d'aquestes proteïnes en la planta correspon únicament a les sintetitzades a partir de les construccions que els introduïm, i no a les que estarien presents de forma endògena en la planta.

Un cop verificat el correcte funcionament de les construccions, es podrà dur a terme una transformació estable que permetrà introduir els gens d'interès de forma permanent a l'individu, i que aquests s'heretin de generació en generació. La transformació estable requereix una major inversió de temps i recursos; és per això que és imperatiu comprovar que les construccions s'expressen degudament mitjançant la transformació transitòria. A partir d'aquesta transformació estable, que es farà de forma posterior a aquest treball, es podrà portar a cap l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna a través de TurboID.

### 1.2.3 Assaig estudi proteïnes en proximitat: TurboID

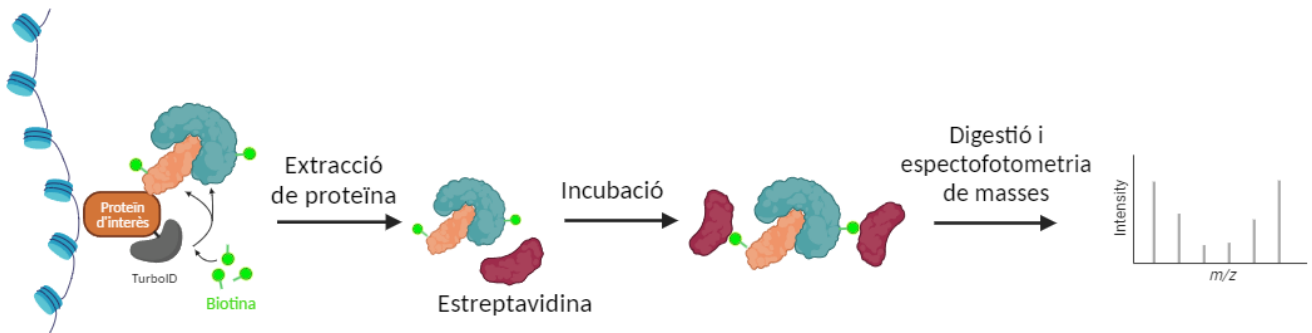
La tècnica TurboID, base d'estudi d'aquest treball, és una innovadora tècnica de detecció d'interaccions proteïna-proteïna basada la tècnica BioID (de l'anglès *Proximity-dependent Biotin Identification*), que utilitza un enzim anomenat biotina lligasa per a estudiar i identificar interaccions proteïna-proteïna *in vivo* (en un organisme viu). La biotina lligasa té la capacitat de dur a terme la biotinilació de proteïnes properes, és a dir, fa ús de les molècules de biotina que detecta en el seu medi i les uneix a proteïnes properes.

Per a dur a terme aquesta tècnica, el primer pas és la creació d'una construcció a l'interior d'un vector, el qual conté les seqüències del gen que codifica la proteïna d'estudi (anomenada proteïna d'interès) seguida del gen anomenat *TurboID*, que codifica l'enzim biotina lligasa. Per tant, aquesta construcció codificarà una proteïna quimèrica (proteïna d'interès-TurboID) amb activitat biotina lligasa. A més a més, aquest vector té les seqüències necessàries per a introduir i expressar la construcció amb els gens d'interès a un organisme (planta).

Aquest vector és un plasmidi bacterià, una molècula de DNA de doble cadena i forma circular que generalment conté un nombre reduït de gens (alguns dels quals estan associats a la resistència a antibiòtics) juntament amb seqüències reguladores de l'expressió gènica, com promotors i terminadors. El que diferencia el vector generat per nosaltres d'aquest plasmidi bacterià és principalment el fet que conté un gen d'interès que es vol introduir en un individu.

Per a realitzar aquesta tècnica, inicialment s'introdueix la construcció a les cèl·lules de l'organisme (generació de cèl·lules transgèniques), el que produirà que s'activi l'expressió del gen d'interès. Per tant, quan la proteïna quimèrica (la construcció) s'expressa degudament a l'interior de la cèl·lula, s'inicia l'activitat de la biotina lligasa, que biotinilarà totes aquelles proteïnes properes a la proteïna d'interès, amb les quals la proteïna d'interès pot estar interaccionant de forma directa o indirecta.

Un cop biotinitalades, aquestes proteïnes es podran purificar amb l'ús d'estreptavidina, una proteïna que s'uneix fortament a la biotina. Per tant seguidament se seleccionen únicament les proteïnes biotinitalades, i es porta a terme una digestió per a generar pèptids (fragments de proteïna) que podran ser identificats a través d'una espectrometria de masses. Els pèptids aportaran informació sobre quines proteïnes es trobaven pròximes a la proteïna d'estudi (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7: funcionament de la tècnica TurboID**

## 2. Objectius

### 2.1 Objectiu general

L'objectiu principal d'aquest treball és la preparació dels materials i la realització de les comprovacions necessàries per al correcte desenvolupament de l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna dutes a terme per LHP1 i PIF7 durant la resposta a l'ombra.

### 2.2 Objectius específics

Per abordar aquest objectiu general s'han establert els següents objectius específics:

- Obtenir versions no funcionals de les proteïnes LHP1 i PIF7 mitjançant la introducció d'una mutació en la seqüència dels gens d'interès *LHP1* i *PIF7* (que provoca la pèrdua de la capacitat d'unió a la cromatina i al DNA, respectivament).
- Generació de les construccions que contenen *LHP1* i *PIF7* mutats fusionats al gen *TurboID*, i amb *Neon* en alguns casos.
- Comprovació, a través de transformació transitòria en *Nicotiana benthamiana*, del correcte funcionament de les construccions que contenen les versions funcionals de LHP1 i PIF7 juntament amb TurboID. Aquesta comprovació es farà tant a nivell d'expressió gènica (presència de RNA i proteïna) com a nivell d'activitat biotina lligasa (deguda a la fusió amb TurboID).

## 3. Materials i mètodes

### 3.1 Materials

#### 3.1.1 Soques bacterianes

- TOP10: soca competent d'*Escherichia coli* utilitzada per la clonació de vectors degut a la seva capacitat d'incorporar material genètic exogen i generar-ne múltiples còpies.
- GV3101: soca competent d'*Agrobacterium tumefaciens*, comercialitzada per Gold Biotechnology®, que permet introduir construccions en planta.

#### 3.1.2 Vectors i plasmidis

Els plasmidis disponibles de forma prèvia a aquest treball són els enllistats a continuació:

- pML1: vector que conté el gen *LHP1* en la seva versió funcional.
- pML2: vector que conté el gen *PIF7* en la seva versió funcional.
- pML5: vector que conté la fusió *LHP1* (funcional) – *TurboID*.
- pML6: vector que conté la fusió *LHP1* (funcional) – *TurboID* – *Neon*.
- pML7: vector que conté la fusió *PIF7* (funcional) – *TurboID*.
- pML8: vector que conté la fusió *PIF7* (funcional) – *TurboID* – *Neon*.
- IF3: vector que conté un gen de resistència a l'espectinomicina, el gen *ccdB* entre dues regions "attR", i el gen *TurboID*.
- IF4: vector que conté un gen de resistència a l'espectinomicina, el gen *ccdB* entre dues regions "attR", el gen *Neon*, i el gen *TurboID*.

Els plasmidis obtinguts en aquest treball van ser:

- pBB1.1.: vector que conté el gen *LHP1* en la seva versió no funcional, obtingut a través de PCR convencional.
- pBB1.5: vector que conté el gen *LHP1* en la seva versió no funcional, obtingut a través de *single-primer* PCR.
- pBB2.3: vector que conté el gen *PIF7* en la seva versió no funcional, obtingut a través de PCR convencional.

- pBB2.7: vector que conté el gen *PIF7* en la seva versió no funcional, obtingut a través de *single-primer* PCR.
- pBB3: vector que conté la fusió *LHP1* (mutat) – *TurboID*
- pBB4: vector que conté la fusió *LHP1* (mutat) – *Neon* – *TurboID*
- pBB5: vector que conté la fusió *PIF7* (mutat) – *TurboID*
- pBB6: vector que conté la fusió *PIF7* (mutat) – *Neon* – *TurboID*

En algunes ocasions, la nomenclatura d'aquests plasmidis canvia per tal de simplificar i fer més entenedor el treball. Tot i així, quan és rellevant, aquests plasmidis poden incloure una numeració més extensa, sovint relacionada amb les rèpliques utilitzades en cada experiment. Per exemple, els plasmidis pBB1.1 i pBB1.5 reben aquesta numeració quan és rellevant saber que han provingut de diferents tipus de reaccions PCR, però en el moment en que aquesta informació ja no és d'interès, el plasmidi que es fa servir passa a dir-se simplement pBB1 en comptes de pBB1.1.

### 3.1.3 Encebadors o *Primers*

Els encebadors o *primers* que es van utilitzar durant els experiments realitzats es poden observar en la **Taula 3.1**.

**Taula 3.1: seqüències dels primers utilitzats**

Primer	Seqüència 5'-3'	Ús del plasmidi
oML01	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGTCGAATTATGGAGTTAAAGAGC	Utilitzats al grup control del plasmidi pML2 ( <i>PIF7</i> ) en la mutagènesi dirigida
oML02	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCATCTCTTTTCTCATGATTCG	
oML03	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCATGAAAGGGGCAAGTGGTGC	Utilitzats al grup control del plasmidi pML1 ( <i>LHP1</i> ) en la mutagènesi dirigida
oML04	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTCAGGCGTTCGATTGTAATTGAG	



oML05 (pDONR FW)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Utilitzat per a la seqüenciació capil·lar dels plasmidis pBB1 (LHP1) i pBB2 (PIF7)
oML07	TGAGGAGTTGGACATCACGA	Utilitzats per a la PCR quantitativa dels plasmidis pML5 i pML6 (LHP1)
oML08	TCCACCAATGCTTCCTTCC	
oML09	ATGGGAATGGGAGGTGGTG	Utilitzat per a la PCR quantitativa dels plasmidis pML7 i pML8 (PIF7).
oML10	GCTGCTGCCATTTTATTGTAGAG	Utilitzat per a la PCR quantitativa dels plasmidis pML7 i pML8 (PIF7), i en la seqüenciació capil·lar del plasmidi pBB2
oML11	GATTCACAACGAGTCCGATAGGAGACGGCGTG	Utilitzats durant la mutagènesi dirigida per a induir la mutació al plasmidi pML2 (PIF7)
oML12	CCTATCACGCCGTCTCCTATCGGACTCGTTGTG	
oML13	AGGTTTCAGTATCTAATTAATGCCGCGGATGGC	Utilitzats durant la mutagènesi dirigida per a induir la mutació al plasmidi pML1 (LHP1)
oML14	AGTTTCAGGCCATCCGCGGCATTTAATTAGATAC	
JRO12	CATATTTGCGCTCCGTTTC	Utilitzat en la seqüenciació capil·lar del plasmidi pBB1
JRO118	CATCCTCTGGTTTATCCTATCACGCCG	Utilitzats en la PCR dels plasmidis pBB5 i pBB6 (PIF7)
JRO119	CCGTTTCATGGTCTAGGCCG	

### 3.1.4 Medi de cultiu i antibiòtics

Per al cultiu de *E. coli* i *A. tumefaciens* es van utilitzar els medis de cultiu LB (Luria-Bertani) i YEB, respectivament.

Protocol per a preparar 1L de cultiu LB:

1. Barrejar 10 g de triptona, 10 g de NaCl i 5 g d'extracte de llevat en 950 mL d'aigua destil·lada
2. Ajustar el pH del medi fins a 7, i afegir aigua fins a 1L de volum total
3. En cas de voler obtenir LB sòlid, afegir 15 g d'agar/L. En cas que no, ometre aquest pas.
4. Autoclavar el medi

Protocol per a preparar 1L de cultiu YEB:

1. Mesclar 5 g de peptona, 5 g de NaCl, 5 g d'extracte de llevat i 1 g d'extracte de carn en 950 mL d'aigua destil·lada
2. Ajustar el pH del medi fins a 7, i afegir aigua fins a 1L de volum total
3. En cas de voler obtenir LB sòlid, afegir 15 g d'agar/L. En cas que no, ometre aquest pas.
4. Autoclavar el medi

Els antibiòtics utilitzats van variar en funció del bacteri que hi havia de créixer i el plasmidi o vector que es volia seleccionar, però les concentracions utilitzades es van mantenir iguals en tots els experiments (**Taula 3.2**)

**Taula 3.2: concentracions dels antibiòtics utilitzats**

Antibiòtic	Concentració d'estoc (mg/ml)	Concentració de treball (µg/ml)
Rifampicina	50	100
Gentamicina	100	25
Kanamicina	25	25
Espectinomicina	50	100

## 3.2 Mètodes per a la clonació

### 3.2.1 Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida o *site directed mutagenesis* és un mètode utilitzat per a introduir mutacions específiques en una seqüència de DNA, utilitzant com a base el mateix procediment dut a terme durant una Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR). La tècnica PCR permet l'amplificació exponencial d'una seqüència específica de DNA a través de l'ús de petites seqüències anomenades encebadors o *primers*, que inicien la síntesi de noves cadenes complementàries a partir d'una cadena de DNA motlle, i que poden ser *forward* (FW) o *reverse* (RV) en funció de a quina cadena complementària s'uneixen i amplifiquen.

La primera fase de la PCR, anomenada desnaturalització, es realitza a temperatura alta (94-98 °C) i comporta la separació de la doble cadena de DNA, és a dir, dels ponts d'hidrogen que mantenen unides les bases nitrogenades de les dues seqüències de DNA complementàries. Seguidament, durant la fase d'anellament, la mostra és refredada, el que permet la unió dels *primers*, curtes seqüències de DNA que s'utilitzen com a punt d'inici per a l'amplificació, gràcies a la capacitat d'unir-se a les regions complementàries del DNA motlle. Un cop s'ha dut a terme aquesta unió, la temperatura s'augmenta novament per a optimitzar el funcionament del DNA polimerasa, que començarà a sintetitzar una nova cadena de DNA complementària a partir de la posició d'unió dels *primers*. Finalment, aquestes fases són repetides en bucle per a obtenir una alta concentració de còpies idèntiques a la seqüència inicial.

A diferència de la PCR, l'objectiu de la qual és l'amplificació d'una mostra de DNA, la mutagènesi dirigida té l'objectiu d'introduir una mutació específica en la seqüència. En aquesta tècnica, es porta a terme una PCR a través de dos *primers* complementaris que presenten una mutació en nucleòtids que afectaran el codó d'un o diversos aminoàcids. La mutagènesi dirigida ens permet generar una mutació específica en una seqüència de DNA per tal de modificar l'activitat d'un determinat gen, a través de l'ús d'encebadors o *primers* que presenten aquesta mutació. En aquest treball s'ha introduït una mutació d'un únic nucleòtid que afecta el codó d'un aminoàcid essencial per a unió a la cromatina de LHP1 i la unió al DNA de PIF7.

Per a facilitar l'eficiència i la precisió en la preparació de les mescles, durant tot el treball es van fer barreges mare o *Master Mix*, solucions que contenen tots els components necessaris en les proporcions adequades, a excepció d'aquells que varien per a cada mostra. Aquestes s'utilitzen per accelerar el procés de pipeteig i minimitzar els errors que es podrien produir en mesclar individualment cada component a cada mostra. Els volums que es van utilitzar per a fer les *Master Mix* de la PCR queden especificades en la **Taula 3.3**.

Taula 3.3: components de la PCR per a la mutagènesi dirigida

Component	Volum ( $\mu$ l /tub)	Master Mix ( $\mu$ l) (Mix 1 i 3)	Master Mix ( $\mu$ l) (Mix 5 a 8)	Concentració de treball
Aigua lliure de nucleases	16.25	26	41.6	-
5X Q5 <i>Tampó de reacció</i>	5	8	8	1x
10 mM dNTPs	0.5	0.8	0.8	200 $\mu$ M
10 $\mu$ M FW <i>primer</i>	1.25	2	2	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M RV <i>primer</i>	1.25	2	-	0.2 $\mu$ M
Q5 <i>High-Fidelity DNA Polymerasa</i>	0.25	0.4	0.4	20 U/ $\mu$ L
Master Mix Total	24.5	39.2	52.8	-
DNA motlle (pML1 i pML2)	0.5	-	-	2 ng/ $\mu$ L
Reacció total	25	-	-	-

A la **Taula 3.4** es poden veure els *primers* que es van utilitzar en cada mix.

**Taula 3.4:** *primers* afegits en cada barreja (*Mix*) per a la mutagènesi dirigida

Nom de la mescla	<i>Primers</i> afegits
Mix 1	oML13 i oML14
Mix 3	oML11 i oML12
Mix 5	oML13
Mix 6	oML14
Mix 7	oML11
Mix 8	oML12

Els passos que es van seguir són els següents:

- 1) Amplificar el plasmidi motlle en sis PCR paral·leles, cadascuna de les quals conté un *primer* directe (*FORWARD*) o complementari (*REVERSE*) (*single-primer*) o una combinació d'ambdós (*double-primer*).

Les condicions del termociclador es mostren en la **Taula 3.5**.

**Taula 3.5: condicions del termociclador per a la mutagènesi dirigida**

Fase		Temperatura	Temps
	Desnaturalització inicial	98°C	2 min
38 cicles	Desnaturalització Anellament Extensió	98°C *72°C 72°C	10 segons 30 segons 2 min 30 segons
	Extensió final	72°C	5 min
	manteniment	4–10°C	-

\* La temperatura d'anellament es va calcular en funció del tipus de polimerasa utilitzada, de la concentració del primer, i de la seva llargària.

- 2) En el cas del *single-primer*, combinar els productes de cadascuna de les reaccions en un sol tub i desnaturalitzar per separar el nou material sintetitzat de la cadena motlle (que no presenta la mutació).

Les mostres resultants d'aquesta mescla van ser:

- P1: obtinguda a través de la *double-primer* PCR del plasmidi pML1 (Mix 1)
- P5+6: obtinguda a través de les *single-primer* PCR del plasmidi pML1 (mescla de les Mix 5 i 6)
- P3: obtinguda a través de la *double-primer* PCR del plasmidi pML2 (Mix 1)
- P7+8: obtinguda a través de les *single-primer* PCR del plasmidi pML2 (mescla de les Mix 7 i 8)

Les condicions del termociclador per a la desnaturalització es mostren en la **Taula 3.6**.

**Taula 3.6: condicions del termociclador per a la desnaturalització**

Fase	Temperatura	Temps (min)
1	95°C	5
2	90°C	1
3	80°C	1
4	70°C	0.5
5	60°C	0.5
6	50°C	0.5
7	40°C	0.5
8 (Hold)	37°C	-

3) Refredar la mostra per a permetre la recombinació de les cadenes complementàries.

### 3.2.2 Digestió de DNA no mutat

L'objectiu d'aquesta fase va ser eliminar els plasmidis que s'han fet servir com a cadena motlle després de la reacció de PCR. Per fer-ho, es va utilitzar l'enzim de restricció DpnII, el qual només digereix cadenes de DNA metilat, és a dir, el DNA dels plasmidis (no mutats) utilitzats com a motlle en la reacció de PCR.

A més a més de les quatre mostres, es van afegir dos controls sense digestió (NON-D, de l'anglès *non-digestion control*), corresponents a les mostres P5+6 i P7+8, a les quals no s'afegeix Dnpl, i dos controls de digestió (DC, de l'anglès *digestion control*), usant directament els plasmidis pML1 i pML2 (que son els que es fan servir com a motlle). Per a que aquest últim control tingués rellevància, es van afegir, en les proporcions equivalents a les utilitzades en la **Taula 3.3**, aigua i tampó Q5.



Les proporcions de la digestió estan especificades a la **Taula 3.7**.

**Taula 3.7: volums per a la digestió del DNA metilat (plasmidi no mutat)**

Component	P1, P3, P5+6, P7+8	NON-D 5+6, NON-D 7+8	DC pML1 ,DC pML2
Mostra (µl)	20	20	0.2 0.5
Dnpl (µl)	1	-	1
5X Q5 <i>Tampó de reacció</i> (µl)	-	-	4
Aigua lliure de nucleases (µl)	-	-	16

### 3.2.3 Transformació d'*Escherichia coli* mitjançant xoc tèrmic

Els plasmidis obtinguts de la digestió es van introduir en cèl·lules competents d'*E. coli* a través de la tècnica transformació per xoc tèrmic o *Heat shock transformation*.

- 1) Descongelar les mostres en gel.
- 2) Afegir 6 µl de mostra (P1, P3, P5+6, P7+8, *non-digestion control* i *digestion control*) i incubar durant 30 minuts en gel.
- 3) Realitzar un xoc tèrmic a 42 graus durant 2 minuts.
- 4) Deixar les cèl·lules en gel mentre es prepara el medi líquid.

### 3.2.4 Plaqueig de les cèl·lules d'*E. coli* transformades amb plasmidis digerits

- 1) Afegir 900 µl de medi LB i incubar durant 1 hora a 37 °C.
- 2) Estendre 100 µl de mostra en una placa de medi LB + gentamicina.

- 3) Incubar tota la nit (*overnight*, O/N) a 37 °C.
- 4) A partir del cultiu O/N, extraure una colònia i introduir-la en medi de cultiu LB líquid.

### 3.2.5 Extracció de DNA plasmídic a través de miniprep

A partir de la solució líquida de medi LB on havien crescut les colònies del cultiu O/N, es va realitzar una purificació dels plasmidis seguida per una quantificació. Aquesta quantificació es va fer amb l'objectiu de proporcionar la concentració òptima de DNA per la seqüenciació capil·lar.

1. Recollir 1-5 ml de cultiu bacterià en un tub de microcentrífuga i centrifugar durant 1-2 minuts a màxima velocitat. Descartar el sobrenedant.
2. Resuspendre el *pellet* en 250-500 µl de solució de lisi alcalina (solució I) preescalfada a temperatura ambient.
3. Incubar la suspensió durant 5 minuts a temperatura ambient o en un bany d'aigua a 37°C.
4. Afegir 250-500 µl de solució neutralitzant (solució II) i mesclar.
5. Centrifugar la mostra a màxima velocitat durant 5 minuts.
6. Transferir el sobrenedant a un nou tub de microcentrífuga.
7. Afegir aproximadament 0,6-0,7 volums de solució de rentat (etanol al 70%) i mesclar.
8. Centrifugar a màxima velocitat durant 2-3 minuts per eliminar l'etanol residual.
9. Abocar el sobrenedant sense tocar el *pellet* d'ADN plasmídic.
10. Deixar assecar el *pellet* a l'aire durant uns minuts per eliminar qualsevol residu d'etanol.
11. Resuspendre l'ADN plasmídic en 20-50 µl de solució d'elució (tampó TE o aigua estèril).
12. Emmagatzemar l'ADN plasmídic a -20°C o a -80°C per a ús posterior.

Es van extreure el DNA plasmídic de les mostres pBB1.1.1, pBB1.5.1, pBB1.5.2, pBB2.3.1, pBB2.3.2, pB2.7.1, pB2.7.2, pB2.7.3, pB2.7.4.. El segon número fa referència al tipus de PCR de la que s'ha obtingut el plasmidi (*double primer* o *single primer*) i el tercer número a la replica de cada mostra.

Un cop obtingut el DNA purificat, es va quantificar a través de d'espectrofotometria amb l'aparell *Nanodrop*, una tècnica que permet l'anàlisi de la concentració de DNA en la nostra solució a través, mesurant l'absorbància de llum a 260 nanòmetres. L'objectiu d'aquesta quantificació va ser adaptar la concentració de cada mostra a l'adequada per l'òptim funcionament de la seqüenciació Sanger, que és d'uns 200 a 300 ng/µl de plasmidi.

Un cop realitzada la quantificació, les mostres amb majors concentracions es van diluir per a obtenir el rang de concentració prèviament especificat pel servei de seqüenciació capil·lar del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG). Cada plasmidi purificat es va seqüenciar mitjançant la tecnologia Sanger, fent servir *primers* que flanquegen la regió mutada. Per a poder descartar els possibles errors que es poguessin produir durant la seqüenciació capil·lar, per cada plasmidi es va fer una reacció de seqüenciació *forward* i un altre *reverse* (Taula 3.8.).

**Taula 3.8: plasmidis utilitzats per a la seqüenciació capil·lar post-mutagènesi dirigida**

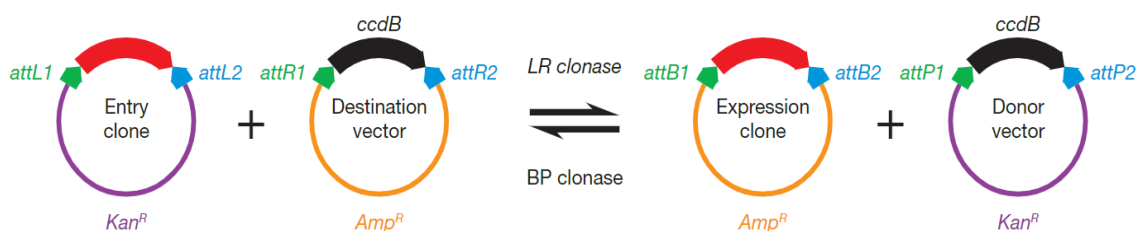
Mostra	Procedència de la mostra	Primer FW	Primer RV
1	pBB1.1.1	pDONR FW	JRO12
2	pBB1.1.2	pDONR FW	JRO12
3	pBB1.5.1	pDONR FW	JRO12
4	pBB1.5.2	pDONR FW	JRO12
5	pBB2.3.1	pDONR FW	oML10
6	pBB2.3.2	pDONR FW	oML10
7	pBB2.7.1	pDONR FW	oML10
8	pBB2.7.2	pDONR FW	oML10
9	pBB2.7.3	pDONR FW	oML10
10	pBB2.7.4	pDONR FW	oML10

### 3.2.6 Reacció LR (clonació Gateway)

La tècnica que es va utilitzar per a realitzar al clonatge és l'anomenada Gateway Cloning. És un sistema de clonació basat en la recombinació genètica, és a dir, en la transferència i l'intercanvi de fragments de DNA. Aquesta reorganització es duu a terme gràcies a l'acció d'enzims especialitzats, que reconeixen seqüències específiques de DNA anomenades posicions att o *att sites*.

#### Recombinació LR

Hi ha diversos tipus d'*att sites*, els quals tenen diverses seqüències que recombinen de manera específica: attL1 i L2, attR1 i R2, attB1 i B2 i attP1 i P2. Per una banda, els attL1 i L2 recombinen amb attR1 i R2 respectivament (recombinació LR); mentre que els attB1 i B2 recombinen amb els attP1 i P2 (recombinació BP) (Figura 3.1).



**Figura 3.1: vectors de la clonació Gateway**

web Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/gateway-cloning/clonase-enzyme.html>)

En funció dels *att sites* que presentaven, els vectors van rebre un nom diferent, explicats a continuació.

- 1) El clon d'entrada o *entry clone*, que contenia els *att sites* L1 i L2 flanquejant el gen d'interès, *LHP1* i *PIF7* en el cas que ocupa (aquests vectors ja es trobaven disponibles en el laboratori de forma prèvia a aquest treball).
- 2) El vector de destí o *destination vector*, el qual contenia els *att sites* R1 i R2 envoltant el gen *ccdB*, que produeix la mort de les cèl·lules que contenen aquest plasmidi i que, per tant, és letal per a la majoria de les soques d'*E. coli* (a excepció de la soca *DB3 survival*). El laboratori

disposava de dos vectors de destí amb TurboID (un amb el gen *Neon* i l'altre sense) que són binaris, ja que es poden replicar tant en *E. coli* com en *A. tumefaciens*). (**Figura 3.2**)

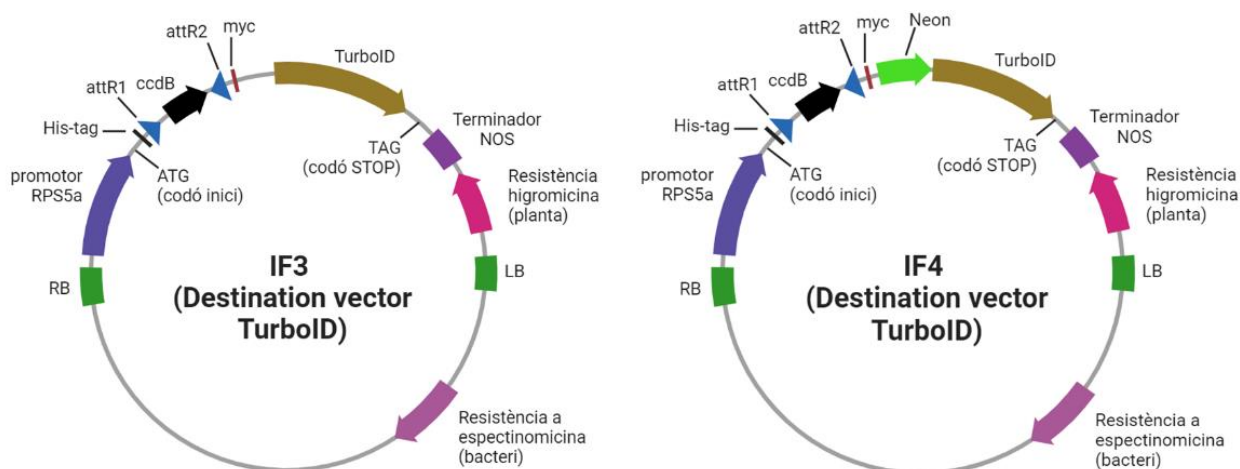
Per realitzar la recombinació LR, a més dels vectors d'entrada i destí, es va utilitzar una mescla que conté un enzim anomenat LR Clonasa, el qual, en presència d'un tampó adequat, té la capacitat de catalitzar la recombinació dels llocs attL i attR, resultant en un intercanvi dels fragments que es troben entre les posicions attL i attR. El resultat d'aquesta reacció va generar el clon d'expressió o *expression clone*, i el vector donador o *donor vector*. El vector d'expressió generat va combinar el gen d'interès amb el *TurboID*, per tant, aquest va ser el vector d'interès per a transformar cèl·lules vegetals en aquest treball.

Com que aquest procés no és una reacció completa, dintre la mostra resultant de la reacció LR, hi havia, a més de l'*expression clone* (el vector d'interès), còpies dels dos plasmidis originals, així com còpies del plasmidi resultant de la recombinació *donor vector*. Per tant, al transformar bacteris competents (és a dir, introduir els vectors a les cèl·lules d'*E. coli*) amb la reacció LR, es va haver de seleccionar només aquells que haguessin incorporat l'*expression clone*. Això va ser possible gràcies al fet que: 1) la soca d'*E. coli* (TOP10) és sensible al gen *ccdB* i per tant aquells bacteris que haguessin incorporat el *destination vector* o el *donor vector* moririen; 2) es va utilitzar un medi suplementat amb l'antibiòtic per al qual només l'*expression clone* i el *destination vector* tenien el gen de resistència (el *destination vector* presentava aquesta resistència, però al tenir el *ccdB*, el bacteri no va proliferar). L'antibiòtic utilitzat va ser aquell a què el plasmidi tenia resistència, és a dir, espectinomicina.

En aquest treball, es van utilitzar com a *entry clone* els vectors anomenats pBB1 i pBB2, que contenen els gens de *PIF7* i *LHP1* mutats, respectivament, flanquejats per les regions attL. A més a més, aquests vectors presentaven un gen de resistència a la gentamicina.

### **Plasmidis amb el gen *TurboID***

D'altra banda, els *destination vector* que es van utilitzar es denominen IF3 i IF4, i en tots dos casos presentaven un gen de resistència a l'espectinomicina, així com i el gen *ccdB* entre les regions attR. A més a més, IF3 contenia en la seva seqüència el gen *TurboID*, mentre que IF4 presentava els gens *TurboID* i *Neon* (**Figura 3.2**)



**Figura 3.2: destination vectors IF3 i IF4**

*Promotor RPS5a (promotor constituït de plantes); His-tag i myc (seqüències proteïques utilitzades per detectar la proteïna quimèrica per Western Blot); attR1 i attR2 (seqüències de recombinació del sistema Gateway); ccdB (gen letal); TurboID (biotina lligasa); Terminador NOS (terminador de plantes); RB i LB (seqüències que flanquegen el DNA que serà transferit a la cèl·lula vegetal a través d'A. tumefaciens); ATG i TAG (codons inici i STOP respectivament per a la proteïna quimèrica); Neon (proteïna fluorescent per poder visualitzar la proteïna quimèrica al microscopi)*

A partir de les mostres purificades dels plasmidis pBB1 i pBB2, es va realitzar una clonació mitjançant el sistema de recombinació Gateway per a incorporar-hi les seqüències corresponents als gens *TurboID* i *Neon*. A la **Taula 3.9** es mostren els vectors generats en la clonació Gateway, així com els *entry clone* i *destination vector* utilitzats en cada cas

Taula 3.9: vectors de la clonació Gateway

COMPONENT	pBB3	pBB4	pBB5	pBB6
<i>Entry clone</i>	pBB1	pBB1	pBB2	pBB2
<i>Destination vector</i>	IF3	IF4	IF3	IF4

Els passos que es van seguir són els següents:

- 1) Barrejar en un microtub a temperatura ambient 1-7 µl del vector *entry clone* corresponent a una concentració 50-150 ng amb 1 µl del *destination vector* corresponent a una concentració de 150 ng/ µl. Afegir tampó TE 1X fins a un volum final de 8 µl.
- 2) Descongelar en gel l'enzim LR Clonasa II i mesclar durant uns 2 minuts. Barrejar amb el vòrtex l'enzim breument dos cops (2 segons cada cop).
- 3) Afegir 2 µl de LR Clonasa II a cada mostra, barrejar amb el vòrtex i centrifugar breument.
- 4) Incubar les mostres O/N a 25 °C.
- 5) Afegir 1 µl de Proteïnasa K a cada mostra per aturar la reacció. Barrejar amb el vòrtex breument i incubar les mostres durant 10 minuts a 37 °C

### 3.2.7 Transformació TOP10

El producte de la reacció LR es va introduir en cèl·lules competents d'*E. coli* a través de la tècnica transformació per xoc tèrmic o *heat shock transformation* seguint el protocol descrit en apartats anteriors. Només els bacteris amb els plasmidis que havien sigut recombinats podrien sobreviure.

### 3.2.8 Purificació i quantificació dels plasmidis

A partir del cultiu O/N de colònies positives, es va purificar els plasmidis i es van quantificar les proteïnes de la mostra. Aquesta quantificació es va fer amb l'objectiu de proporcionar la concentració adequada de DNA per la digestió amb enzims de restricció i per la transformació d'*A. tumefaciens*.

- 1) Extracció del DNA bacterià a través de la tècnica Miniprep
- 2) Quantificació de material genètic a través d'espectrofotometria

### 3.2.9 Digestió per enzim de restricció

Per tal de comprovar que la recombinació LR havia generat els plasmidis adequats, es va fer una digestió amb enzims de restricció que generen patrons de bandes fàcilment reconeixibles en una electroforesi. (Taula 3.10)

Els enzims utilitzats van ser BglII per als plasmidis pBB3 i pBB4, i SphI per als plasmidis pBB5 i pBB6. A més a més, per a cadascun dels plasmidis es va afegir una mostra control (no digerida), on es va afegir aigua en lloc de l'enzim de restricció.

**Taula 3.10: components de la digestió per enzim de restricció**

Reactius	Volum ( $\mu$ l)	Concentració de treball	Non-digestion Control	Concentració de treball
Buffer (10x)	2	1x	2	1x
DNA	4	40-60 ng/ $\mu$ l	4	40-60 ng/ $\mu$ l
Enzim de restricció (BglII o SphI)	1	-	0	0.5 U/ $\mu$ l
Aigua desionitzada	13	-	14	-
Volum final	20	-	20	-

### 3.2.10 Transformació d'*A. tumefaciens*

Un cop comprovat que s'havia obtingut els plasmidis adequats, aquests es van introduir en *A. tumefaciens* utilitzant el mètode de descongelació en gel o *Freeze thaw*.

- 1) Descongelar les cèl·lules competents d'*A. tumefaciens* en gel,
- 2) Afegir un microgram de plasmidi i congelar en nitrogen líquid,
- 3) Descongelar les cèl·lules incubant a 37°C durant 5 minuts,



### 3.2.11 Plaueig de les mostres d'*A. tumefaciens* transformades amb pBB3-6

- 1) Afegir 900 µl de medi LB i incubar durant 2-4 hores a 28 °C.
- 2) Plauejar 100 µl de la transformació en una placa amb medi LB + rifampicina, gentamicina i espectinomicina.
- 3) Centrifugar les cèl·lules restants durant 1 minut a 8000 revolucions per minut (rpm) , descartar el sobrenedant i tornar a suspendre les cèl·lules en el sobrenedant restant. Plauejar la resta de la mostra.
- 4) Incubar les plaques a 28 °C de 2 a 3 dies per a que apareguin colònies.
- 5) A partir de les colònies obtingudes, extraure una colònia i introduir-la en medi de cultiu LB líquid.

### 3.2.12 Purificació i PCR de plasmidi pBB3-6 obtingut d'*A. tumefaciens*

A partir de la solució líquida de medi LB on havien crescut les colònies del cultiu O/N, es va realitzar una purificació de plasmidi (miniprep) seguida d'una PCR per a comprovar que els plasmidis s'havien introduït correctament en els bacteris.

- 1) Extracció del DNA bacterià a través de la tècnica Miniprep
- 2) PCR dels plasmidis purificats

Els *primers* que es van utilitzar són els oML13 i oML08 per als plasmidis pBB3 i pBB4, i els *primers* JRO118 i JRO119 per als plasmidis pBB5 i pBB6. Es van realitzar barreges de PCR similars a les descrites en la **Taula 3.3** i condicions de PCR estàndards similars a la **Taula 3.5**, que permetien amplificar els fragments desitjats.

### 3.3 Mètodes per a la transformació transitòria

En aquest apartat s'explicaran els mètodes realitzats per a la transformació transitòria de fulles del tabac *Nicotiana benthamiana*, així com els posteriors experiments per a comprovar el correcte funcionament de la construcció general. Els experiments realitzats amb aquest objectiu van ser:

- 1) Microscòpia confocal: els plasmidis que contenen el gen *Neon* (pML6 i pML8) van ser observats utilitzant un microscopi confocal *Leica TCS SP5* al Centre de Recerca en Agrigenòmica, per tal de detectar la fluorescència generada. La detecció de fluorescència voldria dir que la proteïna del plasmidi s'expressa correctament.
- 2) Anàlisi de RNA: la presència de RNA permet verificar que els plasmidis introduïts a l'individu es transcriuen correctament. A més a més, al quantificar aquest RNA a través d'una RT-qPCR podem saber l'eficàcia de la transformació realitzada.
- 3) Anàlisi de proteïna: de la mateixa manera que amb el RNA, estudiar la presència de la proteïna sintetitzada a partir dels gens que es troben en el plasmidi d'interès, serveix com una comprovació que la traducció de mRNA a proteïna es realitza correctament. A més a més, la proteïna també pot ser quantificada per a determinar l'expressivitat dels gens d'interès. En aquest procediment, les proteïnes es van separar mitjançant electroforesi desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) seguint el protocol descrit a Sambrook (2001) i fent servir l'aparell vertical Hoefer o BioRad, seguint les instruccions del fabricant.
- 4) Anàlisi de l'activitat TurboID (biotina lligasa): aquest estudi serveix per comprovar si la construcció generat te activitat TurboID.

### 3.3.1 Precultius per a agroinfiltració

*P19* és un gen del virus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), que permet la supressió de la resposta de silenciament gènic de la planta que es produeix al infectar-la. Degut a aquestes propietats, *P19* s'utilitza en processos d'agroinfiltració, juntament amb els gens d'interès, per a millorar l'eficiència en l'expressió dels gens exògens.

El procediment realitzat va ser següent:

- 1) Inocular 3 ml del medi YEB + gentamicina, rifampicina i espectinomicina amb cadascun dels plasmidis (pML5, pML6, pML7, pML8 i P19 en cada tub. Inocular 3 ml de medi YEB + gentamicina, rifampicina i kanamicina amb el plasmidi P19 i un dels plasmidis com a control (pML8)
- 2) Realitzar un cultiu O/N a 28°C.

### 3.3.2 Agroinfiltració dels plasmidis d'interès

- 1) Centrifugar el cultiu a 4000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient.
- 2) Descartar el sobrenedant
- 3) Afegir 3ml de medi d'inducció i re-suspendre el precipitat o *pellet*
- 4) Mesurar la densitat òptica (DO) a l'espectrofotòmetre a  $\lambda=600$  amb una dilució 1:20 medi d'inducció: cultiu.
- 5) Utilitzant la DO de la taula anterior, es calcula la quantitat necessària de cultiu per obtenir 10 ml de cultiu a una OD600 de 0,5. S'utilitza la següent fórmula:

$$10 \text{ ml} * (0.5 \text{ OD} / \text{OD600 mostra}) = \text{ml de mostra per a diluir en 10 ml}$$

- 6) Fer la mescla de bacteries necessària per a co-infiltrar
- 7) Incubar durant 2-3 hores en foscor (sense agitació i a temperatura ambient). El medi d'inducció ha de contenir acetosirigona per tal de millorar l'eficàcia de la transformació
- 8) Introduir 1-2 ml de bacteries a una xeringa sense agulla
- 9) Introduir el contingut en el revers de la fulla
- 10) Deixar durant 2-4 dies per permetre l'expressió dels gens

Es van infiltrar plantes de 4 setmanes de creixement amb els plasmidis pML5, pML7 per a les anàlisis de transcripció i per l'extracció de proteïnes, i els plasmidis pML6 i pML8 per a microscòpia (ja que són les versions del plasmidi amb el gen *Neon* que aporta fluorescència) D'altra banda, també es van infiltrar plantes amb 3 setmanes de creixement amb els plasmidis pML5 i pML7. Això es va dur a terme degut a que es volia saber en quin dels dos casos l'eficiència tant en l'agroinfiltració com en l'expressió del gen era millor.

### 3.3.3 Extracció RNA

A partir de les mostres infiltrades, una part del material vegetal que contenia els vectors introduïts a la planta es va utilitzar per a realitzar una extracció del RNA dels plasmidis d'interès, i, posteriorment, sintetitzar cDNA a partir d'aquest. Aquesta síntesis es va fer ja que el cDNA presenta una major estabilitat que el RNA, i s'amplifica més eficientment mitjançant PCR quantitativa (realitzada com a pas final en aquest apartat), el que va facilitar la detecció de l'expressió dels vectors d'interès.

#### 3.3.3.1 Homogeneïtzació de teixits

- 1) Afegir 200 µl de microesferes de vidre de 1,25-1,16 mm en un microtub
- 2) Afegir el material vegetal i congelar en nitrogen líquid (el material es pot guardar a -80 °C)
- 3) Realitzar un cicle de 20-30 segons per a cada tub amb l'homogeneïtzador Silamat
- 4) Posar les mostres en gel i afegir 450 µl de 1-tioglicerol i fer un cicle extra de 20 segons  
\*Posar les mostres en nitrogen líquid si la solució d'homogeneïtzació no pot ser afegida immediatament
- 5) Posar les mostres en gel
- 6) Centrifugar durant 1 minut

#### 3.3.3.2 Processament de mostres (Tècnica Maxwell)

- 1) Amb una pipeta de diàmetre gran, al·liquotar 400 µl de mostra homogeneïtzada a un microtub de 1,8 ml.
- 2) Poc abans de processar les mostres amb l'instrument *Maxwell® RSC*, afegir 200 µl de *Lysis buffer* a cada 400 µl de mostra homogeneïtzada. Barrejar amb el vòrtex durant 15 minuts.

- 3) Incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. Centrifugar a màxima velocitat durant 2 minuts
- 4) Preparar la safata de coberta i els cartutxos
- 5) Transferir el sobrenedant al pou #1 del *Maxwell® RSC Cartidge (RSCO)*. El pou 1# és el més proper a l'etiqueta del cartutx, i el més llunyà al tub d'elució.
- 6) Afegir 5 µl de *DNase* al pou 4# (reactiu groc). Després d'aquest pas, el reactiu del pou serà verd.
- 7) Col·locar els cartutxos a utilitzar en les safates de coberta amb l'etiqueta apuntant en sentit contrari al tub d'elució.
- 8) Fer pressió al cartutx per encaixar-lo. Cautelosament, retirar el precinte per a que tot el plàstic quedi a dalt dels cartutxos . Cal assegurar-se que tot el precinte o adhesiu residual sigui retirat abans de introduir els cartutxos a l'instrument.
- 9) Col·locar un èmbol a el pou #8 de cada cartutx. Aquest pou és el més proper al tub d'elució.
- 10) Col·locar tubs d'elució de 0,5 ml al davant de la safata de coberta. Afegir 50 µl d'aigua lliure de nucleases al fons de cada tub d'elució. Per a obtenir un eluït més concentrat, es pot afegir 30 µl d'aigua lliure de nucleases (la quantitat de RNA recuperat podria reduir-se).

### 3.3.4 Síntesi de cDNA (protocol *iScript*)

1. En gel, fer la reacció d'anellament afegint els components enllistat en la **Taula 3.11** a un tub de microcentrífuga de 0,2 ml estèril i lliure de nucleases.

Degut a que aquest protocol marca uns volums fixes dels components *5x iScript Reaction Mix* i *iScript Reverse Transcriptase*, no s'han especificat en la taula les concentracions de treball d'aquests components.

**Taula 3.11: components per a la síntesi de cDNA**

Component	Volum de reactius (µl)	Concentració de treball
Aigua lliure de nucleases	En funció de la concentració de RNA de la mostra	-
RNA	En funció de la concentració de RNA de la mostra	100 fg - 1 µg / µl
Transcriptasa inversa <i>iScript</i>	1	-
Tampó 5× <i>iScript Reaction Mix</i>	4	-
Volum total (µl)	20	-

2. Incubar la reacció en un termociclador.

Les condicions del termociclador per a la PCR es mostren en la **Taula 3.12**.

**Taula 3.12: paràmetres del termociclador per a la PCR de síntesi de cDNA**

Fase	Temperatura	Temps
<i>Priming</i> o encebat	25 °C	5 min
Transcripció inversa	46 °C	20 min
Activació RT	95 °C	1 min
Manteniment	4 °C	-

### 3.3.5 PCR quantitativa

Els primers que es van utilitzar són el oML07 i oML08 per als plasmidis amb LHP1 (pML5 i pML6), i el oML09 i oML10 per als plasmidis amb PIF7 (pML7 i pML8)

- 1) Mesclar els components necessaris per a la qPCR en un microtub.

Els volums utilitzats per a fer les *Master Mix* queden especificades en la **Taula 3.13**.

**Taula 3.13: components de la PCR quantitativa**

Component	Volum ( $\mu\text{l}$ /tub)	<i>Master Mix</i> ( $\mu\text{l}$ ) (Mix 1)	<i>Master Mix</i> ( $\mu\text{l}$ ) (Mix 2)	Concentració de treball
Aigua	0.4	20.8	20.8	-
Mescla 2x SYBR	5	260	260	1x
10 $\mu\text{M}$ FW primer	0.3	15.6	15.6	0.3 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ RV primer	0.3	15.6	15.6	0.3 $\mu\text{M}$
<i>Master Mix</i> Total	6	312	312	-
cDNA motlle	4	-	-	-
Volum total	10	-	-	-

A la **Taula 3.14** es pot veure la distribució de les mostres introduïdes a la qPCR, on hi ha, a més a més del cDNA sintetitzat a partir del RNA, dos *non-template control*, mostres que no presentaven cap tipus de cDNA. Per tal de quantificar el cDNA obtingut de la qPCR, es van fer dues rectes patró amb concentracions conegudes amb les quals comparar la mostra i obtenir el número de còpies. Una de les rectes es va fer a partir del plasmidi pML1 i una altra a partir de pML2, que contenen el gen *LHP1* i *PIF7* respectivament.

A partir de les mostres dels plasmidis pML1 i pML2, dels quals es coneixia la concentració inicial, es van realitzar unes dilucions per tal de construir la recta patró, tal i com s'observa en la **Taula 3.14**. Per tant, un cop realitzada la qPCR, es va poder calcular la concentració inicial de cadascuna de les mostres de cDNA utilitzant les rectes patró.

**Taula 3.14: ordre placa de tubs per a qPCR**

cBB01	cBB17	cBB09	cBB18
cBB02	cBB18	cBB10	cBB19
cBB03	NTC	cBB11	NTC
cBB04	1:10 <sup>-9</sup> (pML1)	cBB12	1:10 <sup>-8</sup> (pML2)
cBB05	1:10 <sup>-8</sup> (pML1)	cBB13	1:10 <sup>-7</sup> (pML2)
cBB06	1:10 <sup>-7</sup> (pML1)	cBB14	1:10 <sup>-6</sup> (pML2)
cBB07	1:10 <sup>-6</sup> (pML1)	cBB15	1:10 <sup>-5</sup> (pML2)
cBB08	1:10 <sup>-9</sup> (pML1)	cBB16	1:10 <sup>-4</sup> (pML2)

### 3.3.6 Extracció proteïna

- 1) Recollir les mostres de planta transformades en un paper d'alumini. Si estan humides, assecar-les breument amb un tros de paper.
- 2) Pesar les mostres i anotar el seu pes (en mg).
- 3) Congelar les mostres en nitrogen líquid
- 4) Triturar les mostres amb morter i nitrogen líquid fins a obtenir pols fina.
- 5) Afegir el volum requerit de tampó d'extracció (*extraction buffer*, EB, **Taula 3.15**) a la mostra en un rati 1 µl EB: 1 mg mostra . Incubar a temperatura ambient mentre es processen la resta de mostres.



**Taula 3.15: components de la solució *EXTRACTION BUFFER***

<i>EXTRACTION BUFFER</i> (1x EB-PI, pH 6.8)	Per a fer 1 mL
40 µL Tris - HCl a pH 6.8	40 µL a 1M
4% SDS (w/v)	400 µL a 10M
5% glicerol	50 µL a 100%
miliQ H <sub>2</sub> O	470 µL
1x PI	40 µL a 25X

- 6) Transferir la mostra triturada amb EB a un microtub
- 7) Centrifugar durant 2 minuts a màxima velocitat. Pipetejar el sobrenedant a un nou tub microtub

### 3.3.7 Preparació gel de poliacrilamida

#### 3.3.7.1 Gel inferior

- 1) Afegir primer el tampó inferior, aigua, i finalment la solució d'acrilamida al 40%
- 2) Afegir 50 µL d'APS al 10% (p/v), barrejar, i afegir 10 µL de TEMED dins de la coberta
- 3) Barrejar immediatament la solució i pipetejar amb compte 7 mL de la solució amb una pipeta de 10 mL en una placa de vidre.
- 4) Pipetejar 1 – 1,5 mL d'aigua sobre la solució amb cura, s'observarà la separació de les capes amb diferents densitats.
- 5) Deixar reposar 15 minuts per a la polimerització (la solució d'acrilamida a la proveta ajudarà a determinar si la polimerització funciona; el gel es formarà al fons de la proveta, mentre que la solució líquida superior no es polimeritzarà perquè l'aire inhibeix aquest procés; descartar-la adequadament).

- 6) Eliminar l'aigua de la capa superior i assecat addicionalment amb paper de filtre.

### 3.3.7.2 Gel superior

- 1) Afegir primer 2,5 mL de tampó superior, 6,4 mL d'aigua i 1 mL de la solució d'acrilamida al 40% (gel del 5%).
- 2) Afegir 50 µL d'APS al 10% (p/v), barrejar, i afegir 10 µL de TEMED dins de la coberta.
- 3) Barrejar immediatament la solució i pipetegeu amb compte 3 mL de la solució amb una micropipeta de 1 mL en una placa de vidre amb la pinta verda ja col·locada a mig costat; ajustar bé la pinta a la posició adequada
- 4) Deixar reposar 15 minuts per a la polimerització.
- 5) Retirar el gel del suport

### 3.3.8 Electroforesi

- 1) Muntar el sistema d'electroforesi col·locant el gel entre les plaques de vidre. La placa separadora de vidre ha d'estar orientada cap a fora, i la placa de vidre més petita cap a dins del sistema.
- 2) Preparar la solució 1x *RUNNING BUFFER* i abocar-la al dipòsit central fins que els pous estiguin submergits (el tampó ha d'arribar a la part superior). Omplir el tanc amb *RUNNING BUFFER* cobrint només la part inferior A la **Taula 3.16** es poden veure els components per a fer la solució 10x *RUNNING BUFFER*, que s'haurà de diluir 10 cops per a obtenir-la a concentració 1x.

**Taula 3.16: components del tampó d'electroforesi *RUNNING BUFFER***

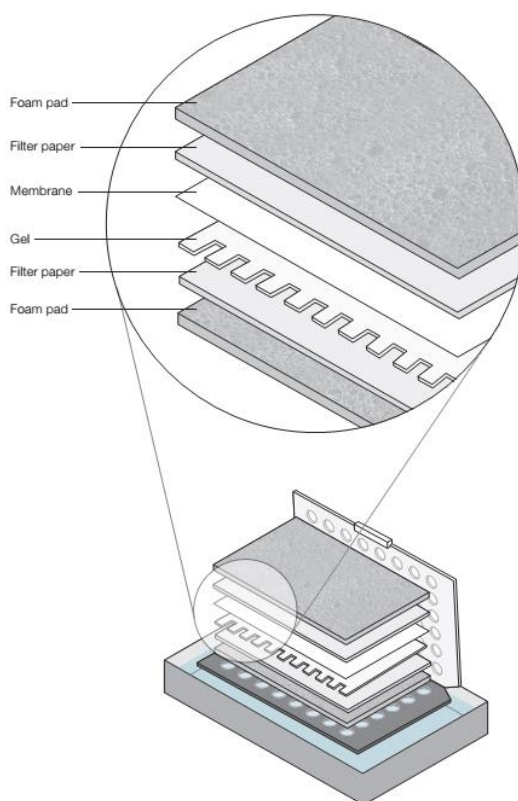
<i>RUNNING BUFFER</i> (10X)	Per a 1000 mL
0.25 M Trizma	15 g
0.96 M glicina	72 g
0.5 % SDS (w/v)	50 mL a 10%
H <sub>2</sub> O	Fins arribar a 1000 mL

- 3) Preparar la solució *4x LOADING BUFFER*, afegint  $\beta$ -Mercaptoethanol fins a un 4% (v/v). Preparar les mostres afegint *4x LOADING BUFFER* + 4% de  $\beta$ -Mercaptoethanol (3 parts de mostra + 1 part *4x LOADING BUFFER*). Les mostres han de contenir un 1% de  $\beta$ -Mercaptoethanol.
- 4) Carregar les mostres als pous. Els pous sense mostres han de ser carregats amb una quantitat igual de *1x LOADING BUFFER* per prevenir distorsions durant l'electroforesi.
- 5) Omplir el tanc amb *RUNNING BUFFER* com a la part central del dipòsit.
- 6) Transferir corrent elèctrica al gel durant 1,5-2 h a una intensitat constant de 20 mA per gel (40 mA per a 2 gels) fins que la línia frontal arribi a l'extrem.
- 7) Apagar la màquina. Retirar l'acoblament d'elèctrodes; abocar el tampó del tanc i de l'acoblament d'elèctrodes a la pica.
- 8) Desmuntar l'acoblament d'elèctrodes, separar la placa de vidre i la placa més petita amb l'eina per retirar gels verds. Mantenir la placa separadora de vidre a la part inferior amb el gel cap amunt.
- 9) Transferir amb compte el gel a una caixa de plàstic

### 3.3.9 Transferència de proteïna

- 1) Afegir immediatament *TRANSFER BUFFER (1x)* al gel, incubar 15 minuts a temperatura ambient movent amb suavitat.
- 2) Afegir metanol a la membrana de PDFV pretallada, incubar 1 minut a temperatura ambient.
- 3) Retirar el metanol i equilibrar la membrana de PDFV en tampó de transferència durant uns minuts a temperatura ambient.
- 4) Muntar el *sandwich* de transferència com s'indica a continuació i es mostra en la **Figura 3.3:**

Obrir un suport per al gel i submergir el costat del càtode (negre) en el tampó de transferència. Mullar un coixinet d'escuma en *TRANSFER BUFFER (1x)* i col·locar-lo al costat submergit del suport. Mullar un tros de paper de filtre en *TRANSFER BUFFER (1x)* i col·locar-lo damunt del coixinet d'escuma. Col·locar el gel sobre el paper de filtre. Eliminar l'aire atrapat. Col·locar la membrana de PDFV sobre el gel. Mullar un segon tros de paper de filtre en *TRANSFER BUFFER (1x)* i col·locar-lo damunt de la membrana. Mullar un coixinet de escuma en *TRANSFER BUFFER (1x)* i col·locar-lo damunt del paper de filtre. Finalment, tancar i fixar el suport del gel.



**Figura 3.3: distribució del panell *sandwich***

(*Tank Blotting Procedure Part I, BioRad webpage*)

- 5) Introduir el *sandwich* a l'acoblament d'elèctrodes corresponent i dins del tanc.
- 6) Afegir una barra magnètica al fons del tanc.
- 7) Omplir el tanc amb *PROTEIN TRANSFER BUFFER* (1x) i col·locar la unitat de refrigeració congelada dins del tanc.
- 8) Transferir corrent elèctrica durant 1 hora a 100 V, a +4°C en una habitació freda, movent amb la velocitat més baixa.

### 3.3.10 Hibridació i detecció de senyal de la membrana

- 1) Després de transferir les proteïnes, retirar la membrana de PVDF i col·locar en una caixa de plàstic. Incubar la membrana amb 50 mL de *BLOCKING SOLUTION* durant un mínim de 30 minuts. A la **Taula 3.17** es poden veure els components per a fer la solució *BLOCKING SOLUTION*

**Taula 3.17: components de la solució *BLOCKING SOLUTION***

<i>BLOCKING SOLUTION</i>	Per a fer 50 mL
Llet en pols desengreixada al 5%	2,5 g
TBST (1x)	50 mL

- 2) Treure la solució i afegir 10 mL d'*HYBRIDIZATION SOLUTION*. Afegir l'anticòs primari 6xHis (1:2000) o estreptavidina unida a un fluoròfor (en el cas de la estreptavidina no es farà servir anticòs secundari). Incuba durant la nit a 4°C (o aproximadament 3 hores a temperatura ambient) amb agitació.
- 3) Rentar la membrana amb 25 mL d'*HYBRIDIZATION SOLUTION*. Incubar a temperatura ambient amb agitació durant un mínim de 10 minuts. A la **Taula 3.18** es poden veure els components per a fer la solució *HYBRIDIZATION SOLUTION*

**Taula 3.18: components de la solució *HYBRIDIZATION SOLUTION***

<i>HYBRIDIZATION SOLUTION</i>	Per a fer 200 mL
Llet en pols desengreixada al 5%	1 g
TBST (1x)	200 mL

- 4) Repetir el rentat un total de 3 vegades.

- 5) Afegir 10 mL d'*HYBRIDIZATION SOLUTION*. Afegir l'anticòs secundari, 1  $\mu$ L (anti-mouse-fluoròfor és 1:10000). Incubar a temperatura ambient durant aproximadament 2-3 h amb agitació.
- 6) Rentar la membrana amb 25 mL d'*HYBRIDIZATION SOLUTION*. Incubar a temperatura ambient amb agitació durant > 10 minuts.
- 7) Repetir el rentat un total de 3 vegades.
- 8) Portar la membrana a l'aparell de lectura de fluorescència (Chemidoc, Bio-rad) i captar les imatges a diferents temps d'exposició per evitar saturació de la senyal.

## 4. Resultats

### 4.1 La mutagènesi dirigida ens permet obtenir les construccions control per a la tècnica del TurboID

L'objectiu final del projecte global al que pertany aquest treball és trobar la xarxa de proteïnes que interaccionen amb LHP1 i PIF7 quan aquestes es troben unides al DNA i a la cromatina. Al laboratori estaven disponibles, prèviament a aquest treball, els plasmidis per a transformar cèl·lules vegetals per a desenvolupar la tècnica TurboID amb les proteïnes LHP1 i PIF7 funcionals : plasmidi pML5 (LHP1-TurboID), pML6 (LHP1-Neon-TurboID), pML7 (PIF7-TurboID) i pML8 (PIF7-Neon-TurboID)

Per poder descartar les possibles proteïnes que interaccionen amb LHP1 i PIF7 quan no estan unides a la cromatina o al DNA, en aquest treball hem generat variants mutades d'aquestes proteïnes sense capacitat d'unió a la cromatina o al DNA. Per fer-ho s'han mutat el domini d'unió a la cromatina de LHP1 (cromodomini) i el domini d'unió al DNA de PIF7 (domini bHLH), ja que treballs preliminars han demostrat que una mutació puntual (un únic canvi de nucleòtid que implica un únic canvi d'aminoàcid ) en la seqüència de LHP1 i PIF7 fa que perdin la seva capacitat d'unió a la cromatina i al DNA respectivament [10][13].

En aquest treball es van generar, a partir de plasmidis amb els gens *LHP1* i *PIF7* no mutats, nous plasmidis amb variants mutades d'aquests gens a través de la tècnica de la mutagènesi dirigida. Els resultats d'aquest apartat corresponen als diversos passos per realitzar la mutagènesi i als controls realitzats durant el procediment per a comprovar que certes etapes s'havien dut a terme correctament.

En la **Figura 4.1**, es mostra un esquema del procediment dut a terme, juntament amb els resultats obtinguts en diferents etapes marcats en un asterisc i explicats en els punts següents.

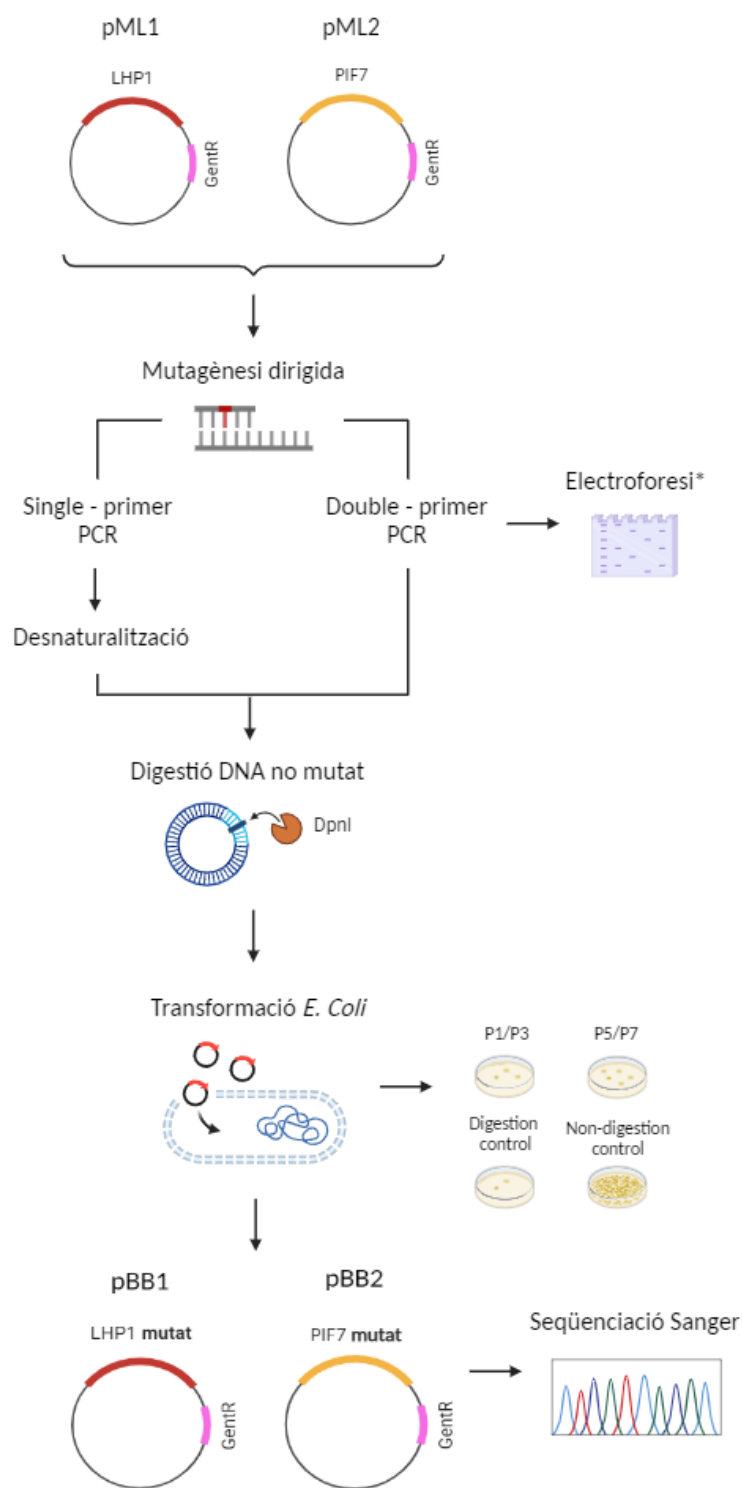


Figura 4.1: esquema de la mutagènesi dirigida



#### 4.1.1 L'ampliació per PCR no dona en totes les reaccions fragments de la mida esperada al analitzar-los per electroforesi en gel d'agarosa

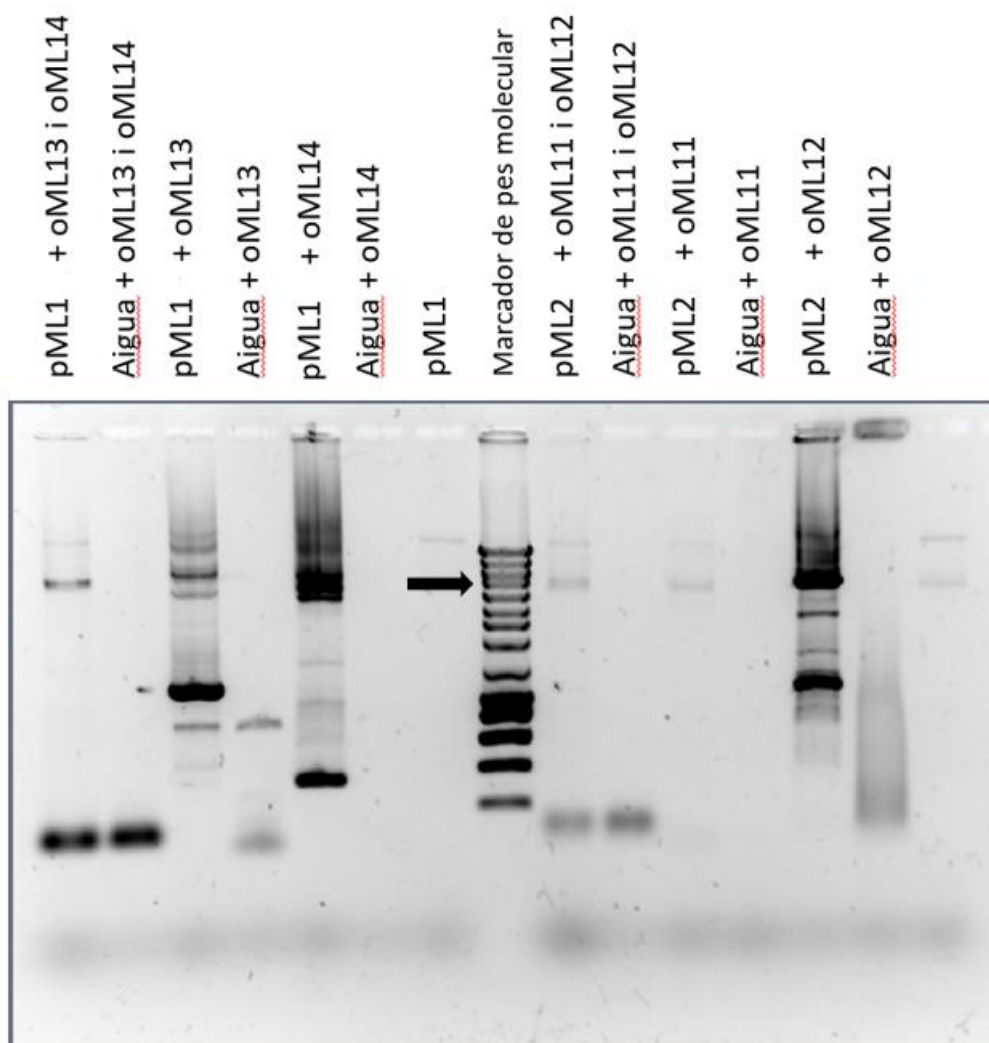
A partir dels plasmidis pML1 (que conté el gen *LHP1*) i el plasmidi pML2 (que conté el gen *PIF7*) es van amplificar cadascun dels gens fent servir dos *primers* mutats per gen. Inicialment el resultat d'aquesta amplificació no va ser satisfactòria, i és per això que es va incorporar una variació (basada en [7]) en el segon intent realitzat, en el qual es va millorar el rendiment i l'eficàcia del procediment.

Per a la millora dels resultats obtinguts d'aquest primer intent, es va fer una mutagènesi dirigida a través d'una PCR amb un sol *primer* [7]. En aquesta versió de PCR, els *primers* directe i complementari (FW i RV de l'anglès *Forward* i *Reverse*, respectivament) no es troben en la mateixa barreja de DNA, sinó que cadascun realitza la duplicació de la seva cadena corresponent [12], i posteriorment aquests dos productes de PCR es barregen. Paral·lelament, es va repetir les reaccions amb dos parells de *primers*. Les mostres que es van fer servir a les diverses PCR són les següents:

- *Mix 1*: vector pML1 amb *primers* oML13 i oML14, per generar la mutació de LHP1
- *Mix 3*: vector pML2 amb *primers* oML11 i oML12, per generar la mutació de PIF7
- *Mix 5*: vector pML1 amb *primer* oML13, per generar la mutació de LHP1 en una de les cadenes complementàries
- *Mix 6*: vector pML1 amb *primer* oML14, per generar la mutació de PIF7 en una de les cadenes complementàries
- *Mix 7*: vector pML2 amb *primer* oML11, per generar la mutació de PIF7 en una de les cadenes complementàries
- *Mix 8*: vector pML2 amb *primer* oML12, per generar la mutació de PIF7 en una de les cadenes complementàries

Després de la PCR es va comprovar si s'havia amplificat el plasmidi mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa (**Figura 4.2**), que tenia l'objectiu de verificar el correcte funcionament dels *primers* utilitzats, i comprovar l'amplificació del plasmidi sencer s'havia realitzat correctament. Les diferents reaccions van donar diferents patrons de bandes. En aquestes reaccions de PCR l'objectiu és amplificar tot el plasmidi, per tant, la mida esperada era de 4708 parells de bases (pb) per al pML1 i de 4742 pb per al pML2. Només en algunes de les reaccions hi ha bandes que podrien correspondre amb aquesta mida, però no en totes.

Tot i que no en totes les reaccions d'amplificació s'observava banda, es va continuar amb el protocol, ja que potser es va produir l'amplificació però no en un nivell suficient per que aquest pogués ser detectat pel gel.



**Figura 4.2:** resultats de l'electroforesi *double-primer* i *single-primer PCR*

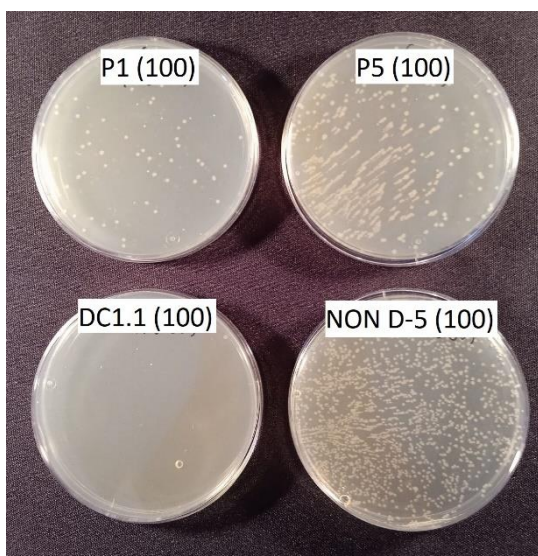
La fletxa de la figura que assenyalava el marcador de pes molecular, indica l'alçada on s'esperaria que aparegués la banda amplificada, corresponent a 4000 parells de bases.

#### 4.1.2 La transformació d'*E. coli* presenta colònies en totes les reaccions de PCR realitzades

Un cop tractades les mostres de PCR com s'indica a mètodes (procés de renaturalització i digestió amb l'enzim de restricció DpnI per eliminar el plasmidi utilitzat com a motlle en la reacció, que està metilat) es van transformar cèl·lules competents d'*E. coli*. Es van plaquejar els bacteris en un medi amb presència de gentamicina, amb l'objectiu que només hi creixessin els bacteris que havien incorporat els plasmidis mutats (anomenats pBB1 i pBB2 per *LHP1* mutat i *PIF7* mutat, respectivament). Les colònies que creixessin correspondrien a bacteris que havien incorporat els plasmidis, doncs aquests presentaven el gen de resistència a antibiòtic i no havien estat digerits per DpnI (per ser producte d'amplificació de PCR i en conseqüència, no tenir metilat el seu DNA).

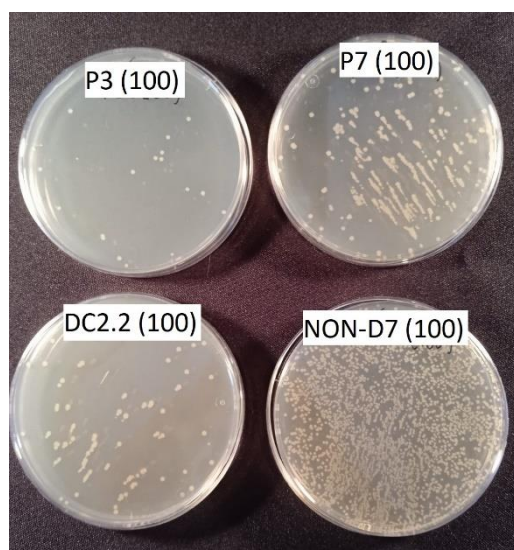
A continuació es mostren les plaques P1 i P5, obtingudes a partir de la transformació del resultat de la *single* i *double primer PCR*, respectivament, i que contenen el plasmidi pBB1 (*LHP1*) (**Figura 4.3**) i les plaques P3 i P7, obtingudes de la transformació a través de *single* i *double primer PCR* respectivament, i que contenen el plasmidi pBB2 (*PIF7*) (**Figura 4.4**)

A més de les colònies amb els plasmidis d'interès, també es va plaquejar un grup de control de digestió per a comprovar el correcte funcionament d'aquesta fase. Com que no presentaven la mutació, tots els plasmidis de la mostra s'haurien d'haver tallat durant la digestió amb DpnI, i, per tant, els bacteris no haurien d'haver incorporat cap plasmidi en el seu material genètic que els aporta resistència a la gentamicina. Aquestes plaques es van anomenar digestion control (DC) 1.1 i DC 2.2 (DC1.1 i DC2.2).



**Figura 4.3: plaques amb el plasmidi pBB1**

*P1 i P5 → resultats de la single i double primer PCR (plasmidi pBB1); DC1.1 → control de digestió (digestion control); NON D-5 → control de “no digestió” (non digestion control)*



**Figura 4.4: plaques amb el plasmidi pBB2**

*P3 i P7 → resultats de la single i double primer PCR (plasmidi pBB2); DC2.2 → control de digestió (digestion control); NON D-7 → control de “no digestió” (non digestion control)*

En la placa DC1.1 de la **Figura 4.3**, observem com aquest control va funcionar correctament degut a la placa no va presentar cap creixement bacterià. D'altra banda, en la placa DC2.2 de la **Figura 4.4**, sí que es va observar creixement, probablement degut a una baixa eficiència de la reacció de digestió en aquest control. Tot i el risc de què les colònies de les transformacions P3 i P7 fossin falsos positius, es va seguir endavant doncs es van dur a terme més controls durant la resta d'etapes.

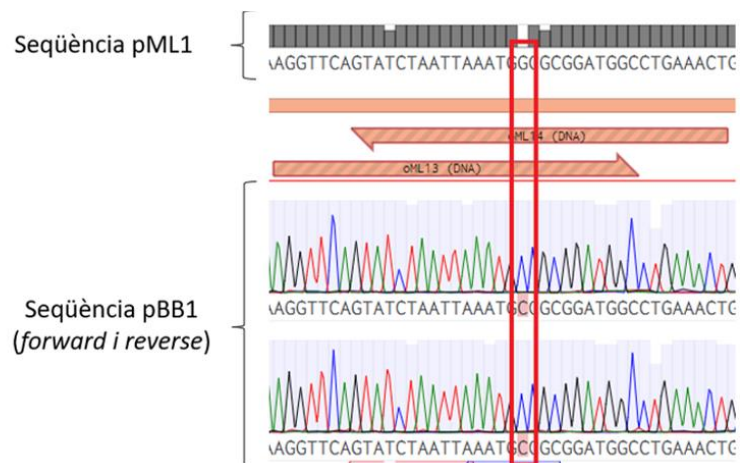
Adicionalment, es va afegir un altre control de “no digestió”, transformant el resultat de la mutagènesi dirigida sense passar per la digestió. Per tant, els bacteris transformats presentaven tant els plasmidis pML1 i pML2 com la seva respectiva versió mutada pBB1 i pBB2. Degut a la presència d'un major número de plasmidis que, a més a més, presenten el gen de resistència a la gentamicina, les plaques de control de no digestió anomenades NON-D5 i NON-D7 i observables en la **Figura 4.3** i **Figura 4.4**, respectivament, presentaven una major densitat de bacteris a la placa.

### 4.1.3 La seqüenciació dels plasmidis pBB1 (*LHP1*) i pBB2 (*PIF7*) mostra que els gens estan mutats a la posició que esperàvem

A partir de les colònies crescudes es van aïllar els plasmidis que contenien i aquests es van enviar a seqüenciar utilitzant *primers* específics al Servei de seqüenciació capil·lar del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) per a comprovar si la mutagènesi dirigida s'havia dut a terme correctament.

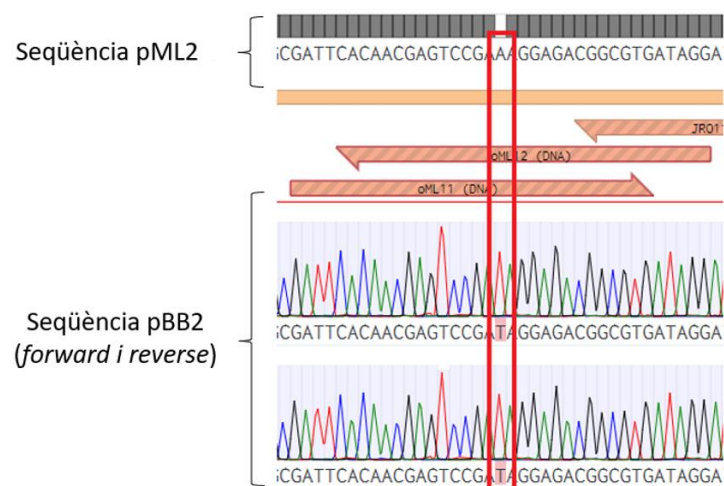
Un cop rebuts els resultats de la seqüenciació i per a fer aquesta comprovació, es van alinear les seqüències dels plasmidis pML1 (*LHP1*) i pML2 (*PIF7*), els quals no presenten la mutació, amb les seqüències dels plasmidis un cop realitzada la mutagènesi dirigida, és a dir, dels plasmidis pBB1 i pBB2 seqüenciats. Com que aquests plasmidis haurien de ser idèntics als primers excepte en un nucleòtid a la posició corresponent als *primers* utilitzats durant la mutagènesi, en aquesta alineació s'esperava observar una discordança entre seqüències o *mismatch*.

En la **Figura 4.5** es mostra aquest *mismatch* per als plasmidis pML1 (*LHP1*) i pBB1 (*LHP1* mutat), on s'ha produït un canvi de base nitrogenada de guanina a citosina en la posició corresponent als primers oML13 i oML14, encarregats d'induir aquesta mutació. De la mateixa manera, en la **Figura 4.6** es mostra l'alineament de seqüències del plasmidi pML2 (*PIF7*) i pBB2 (*PIF7* mutat), on també s'observa un *mismatch* en les posicions corresponents als plasmidis oML11 i oML12, encarregats novament d'induir aquesta mutació. A més a més de les seqüenciacions mostrades en les figures, es van realitzar més rèpliques (no mostrades en el treball) en els que s'observaven les mateixes mutacions.



**Figura 4.5: mismatch del plasmidi pBB1 respecte pML1**

En la part superior de la figura, es pot veure la seqüència del plasmidi pML1 conté el gen LHP1 sense mutació. A la part inferior, s'observa que les seqüències del plasmidi pBB1 són idèntiques a pML1, a excepció del mismatch induït en la mutagènesi dirigida



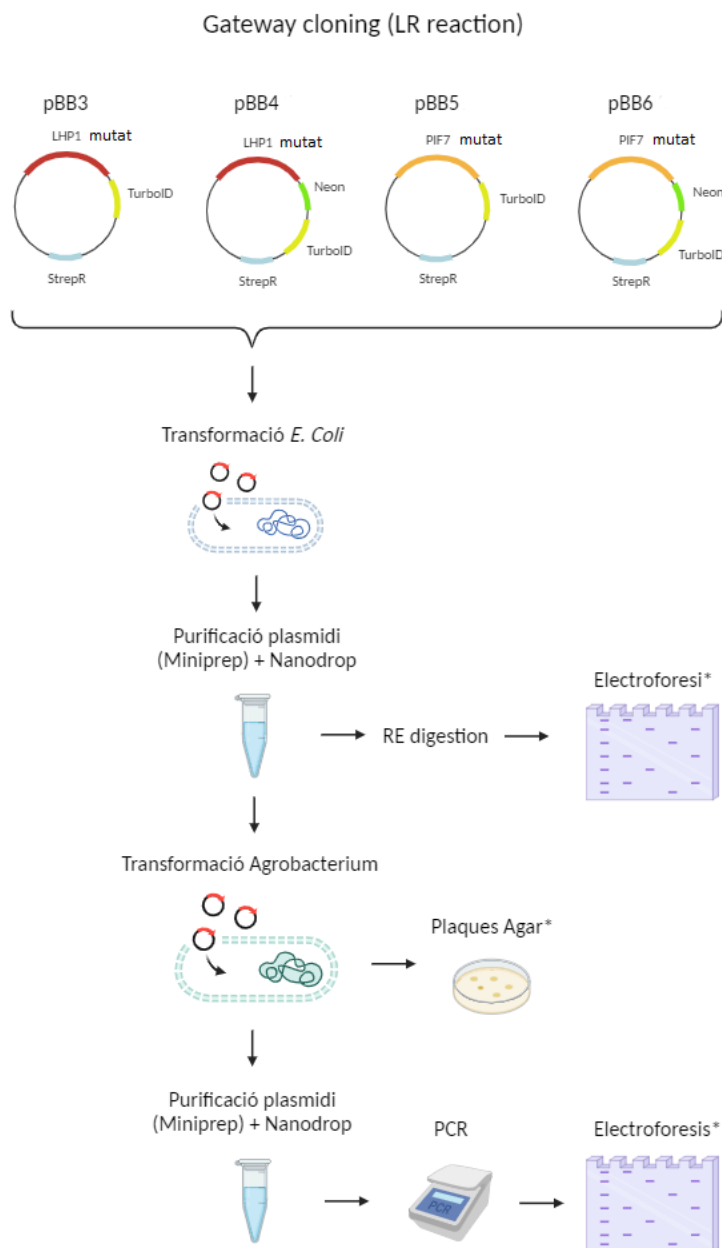
**Figura 4.6: mismatch del plasmidi pML2**

En la part superior de la figura, es pot veure la seqüència del plasmidi pML2 conté el gen PIF7 sense mutació. A la part inferior, s'observa que les seqüències del plasmidi pBB2 són idèntiques a pML2, a excepció del mismatch induït en la mutagènesi dirigida

## 4.2 Mitjançant clonació Gateway es van obtenir els vectors d'expressió amb LHP1 i PIF7 mutats combinats amb TurboID

Un cop obtingudes les variants mutades de *LHP1* i *PIF7* (als plasmidis pBB1 i pBB2 respectivament), es van fusionar a les seqüències dels gens *TurboID* i *Neon-TurboID* (segons el cas) mitjançant el sistema de clonació Gateway. Per fer això, els plasmidis pBB1 i pBB2 que es van generar eren *entry vectors*, que combinats amb els *destination clones* IF3 i IF4 mitjançant una reacció de recombinació LR, van generar els plasmidis pBB3.1 (*LHP1* mutat fusionat a *TurboID*, *LHP1mut-TurboID*), pBB4.2 (*LHP1mut-Neon-TurboID*), pBB5.1 (*PIF7mut-TurboID*) i pBB6.2 (*PIF7mut-Neon-TurboID*).

Després de la reacció LR, es van seguir els passos que es mostren a l'esquema de la **Figura 4.7**.



**Figura 4.7:** esquema de la clonació Gateway

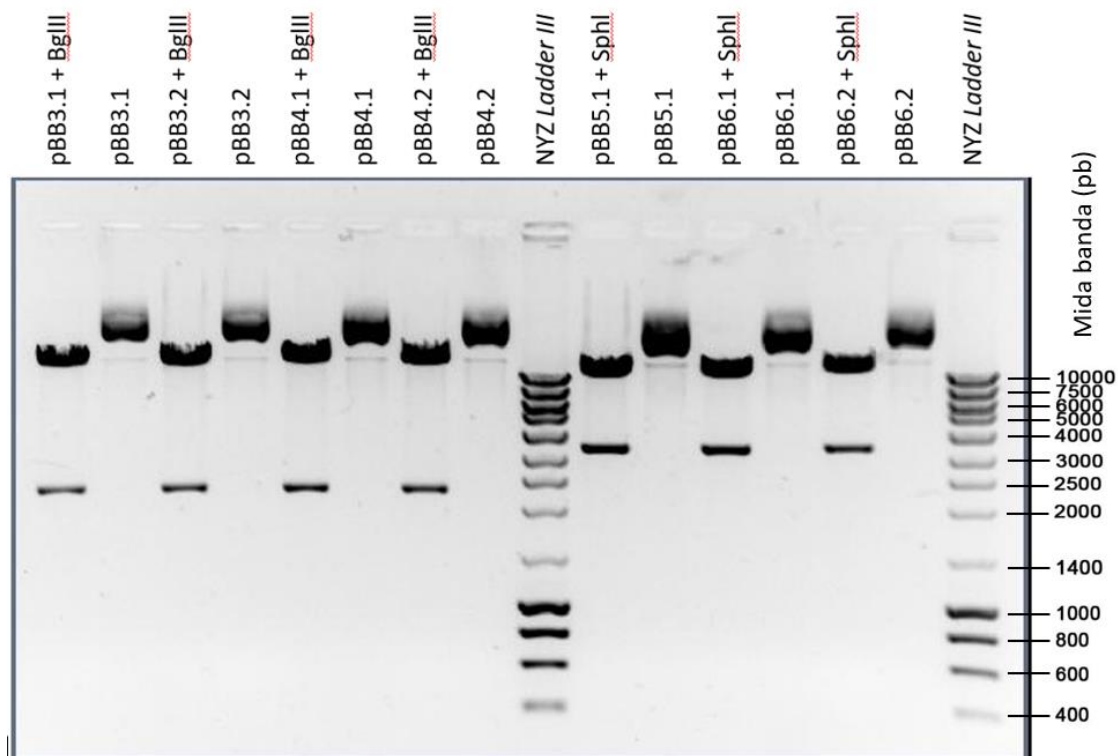
#### 4.2.1 Els plasmidis pBB3, pBB4, pBB5 i pBB6 tenen un patró de digestió amb enzims de restricció esperat

Les quatre reaccions LR realitzades per obtenir els plasmidis pBB3 (LHP1 mutat-TurboID), pBB4 (LHP1-TurboID-Neon), pBB5 (PIF7 mutat-TurboID) i pBB6 (PIF7 mutat-TurboID-Neon), van utilitzar-se per transformar *E. coli* (soca TOP10) i es van obtenir múltiples colònies per cadascuna de les quatre transformacions. Després de fer cultius d'algunes de les colònies crescudes en medi selectiu (indicatiu de que havien incorporat un plasmidi portador de resistència), es va realitzar una purificació dels plasmidis d'aquests bacteris, seguit d'una digestió amb enzims de restricció que permetessin comprovar si els plasmidis eren correctes mitjançant la visualització de les bandes obtingudes en la digestió mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa

A través de l'eina Digest del programari Benchling, es van estimar la longitud dels fragments que havien de generar-se (en el cas que els plasmidis fossin correctes) a l'utilitzar els enzims de restricció seleccionats, que van ser el BglII pels vectors pBB3 i pBB4, i SphI pels vectors pBB5 i pBB6. Les longituds esperades d'aquests fragments són les següents: pBB3 (11657 i 2185, pb), pBB4 (12488 i 2191 pb), pBB5 (10455 i 3267 pb) i pBB6 (11175 i 3267 pb).

En la **Figura 4.8**, podem observar com la digestió dels plasmidis pBB3 a pBB6 es va realitzar correctament (es van incloure mostres no digerides dels plasmidis per comparar el patró de bandes) ja que els fragments obtinguts en l'electroforesi tenen la mida esperada. Per tant, podíem concloure la reacció de recombinació Gateway havia sigut exitosa i que els plasmidis esperats s'havien generat correctament.





**Figura 4.8: electroforesi dels plasmidis pBB3-pBB6**

*Els plasmidis que contenen el gen LHP1 (pBB3.1, pBB3.2, pBB4.1 i pBB4.2) i han sigut diferits amb BgIII, presenten unes bandes d'aproximadament 12000 i 2000 pb, mentre que els plasmidis que contenen PIF7 (pBB5.1, pBB6.1 i pBB6.2) i han sigut digerits amb SphI presenten bandes d'aproximadament 11000 i 3000 pb. En tots els casos, els plasmidis no digerits només presenten una banda. El segon número del plasmidi fa referència a la replica de cada plasmidi.*

#### **4.2.2 La transformació d'*A. tumefaciens* amb els plasmidis pBB3, pBB4, pBB5 i pBB6 permet aïllar colònies positives**

Un cop comprovat que es disposava dels *expression clones* (pBB3 a pBB6) correctes, es va transformar *A. tumefaciens* amb aquests plasmidis. Les quatre transformacions i un control sense transformar es van plaquejar en medi selectiu que contenia els antibiòtics rifampicina, espectinomicina i gentamicina. Com que per aquest experiment es va utilitzar una soca d'*A. tumefaciens* amb resistència a la rifampicina i a l'espectinomicina, i els plasmidis d'interès

aportaven a la cèl·lula resistència a la gentamicina, les colònies que van aparèixer es van considerar com a colònies positives, ja que el creixement de qualsevol altre tipus de bacteri era altament improbable. (Figura 4.9). El control sense transformar que va funcionar correctament, ja que no va presentar creixement de bacteris.

A més a més, es van utilitzar dues quantitats de bacteris diferents per plaquejar, i com era d'esperar, el nombre de colònies va ser superior com més volum es va plaquejar (sent les plaques marcades com a 900 les que tenien una major concentració inicial de bacteris).

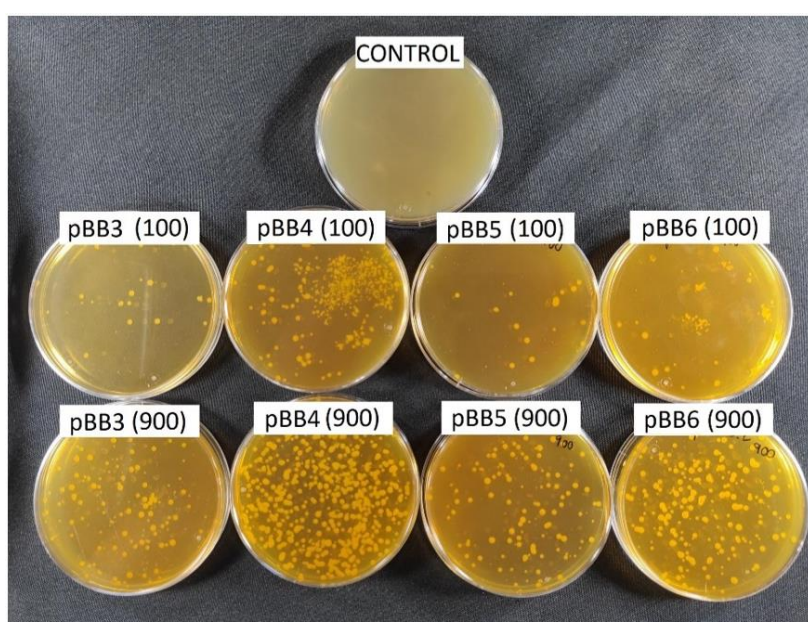


Figura 4.9: plaques dels plasmidis pBB3-pBB6

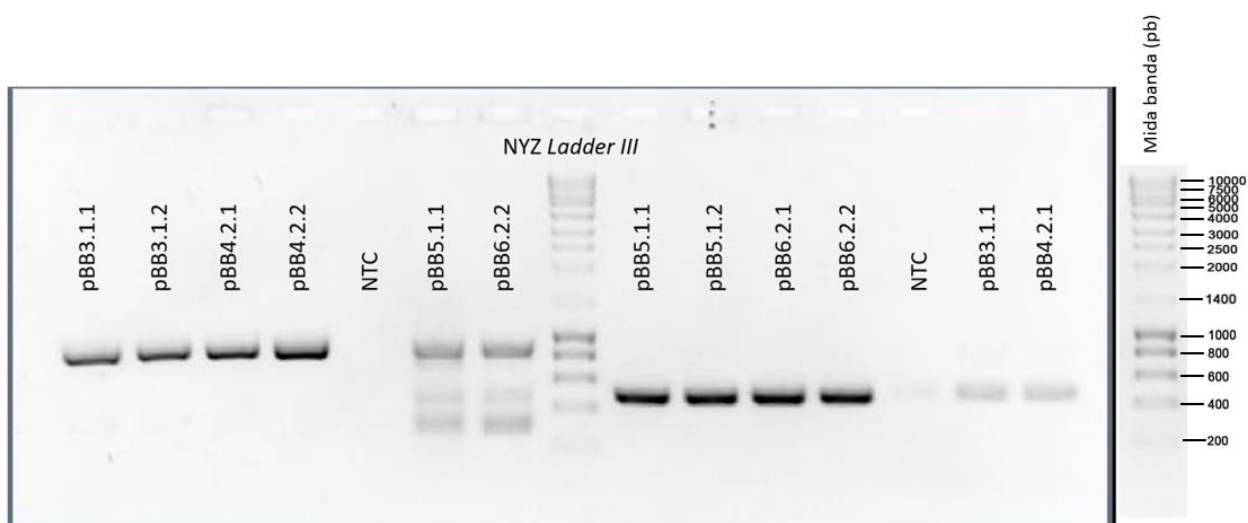
Colònies de *Agrobacterium tumefaciens* transformades amb els plasmidis amb LHP1 mutat (pBB i pBB4) i amb PIF7 mutat (pBB5 i pBB6).

#### **4.2.3 La PCR dels plasmidis de les soques positives d'*A. tumefaciens* confirma que s'ha incorporat el plasmidi i que per tant es poden utilitzar per transformar cèl·lules vegetals.**

Per comprovar que aquestes cèl·lules transformades contenen els plasmidis d'interès es va realitzar una PCR de les colònies d'*A. tumefaciens* transformades utilitzant *primers* que amplifiquen específicament cadascun dels plasmidis introduïts: l'oML13 i oML08, que amplifiquen una regió del gen *LHP1* per als plasmidis pBB3 i pBB4, i els JRO118 i JRO119, que amplifiquen una regió del gen *PIF7* per a pBB5 i pBB6. A partir de les seqüències dels plasmidis i a través del programari Benchling, es va calcular que el producte de PCR per pBB3 i pBB4 havia de ser de 892 pb, i de 509pb per pBB5 i pBB6.

En la **Figura 4.10** es pot observar com els resultats de l'electroforesi coincideixen amb els pesos moleculars esperats obtinguts al Benchling, indicant que les colònies obtingudes d'*A. tumefaciens* són positives ja que presenten els plasmidis d'interès. Per tant, això demostra que es van obtenir correctament les soques d'*A. tumefaciens* per a poder transformar cèl·lules vegetals.

Degut a restriccions de temps, en lloc de continuar la transformació de plantes amb les soques generades en aquesta primera part de treball (que contenen les versions mutades de *LHP1* i *PIF7*), es va treballar amb soques d'*A. tumefaciens* que contenen les construccions amb les versions silvestre (no mutades) dels gens, les quals ja eren disponibles al laboratori.



**Figura 4.10: electroforesi en gel d'agarosa de plasmidis obtinguts d'*A. tumefaciens***

*Els plasmidis que contenen PIF7 (pBB3 i pBB4) presenten unes bandes d'entre 800 i 1000 pb, mentre que els plasmidis que contenen PIF7 presenten unes bandes entre 400 i 600 pb. La numeració de cada plasmidi fa referència a la colònia de la que es va obtenir i al número de rèpliques, però degut a que els plasmidis són iguals, els resultats del gel també ho són.*

### **4.3 Mitjançant transformació transitòria, es determina que els vectors per a la tècnica TurboID s'expressen en cèl·lules vegetals i tenen activitat biotina lligasa**

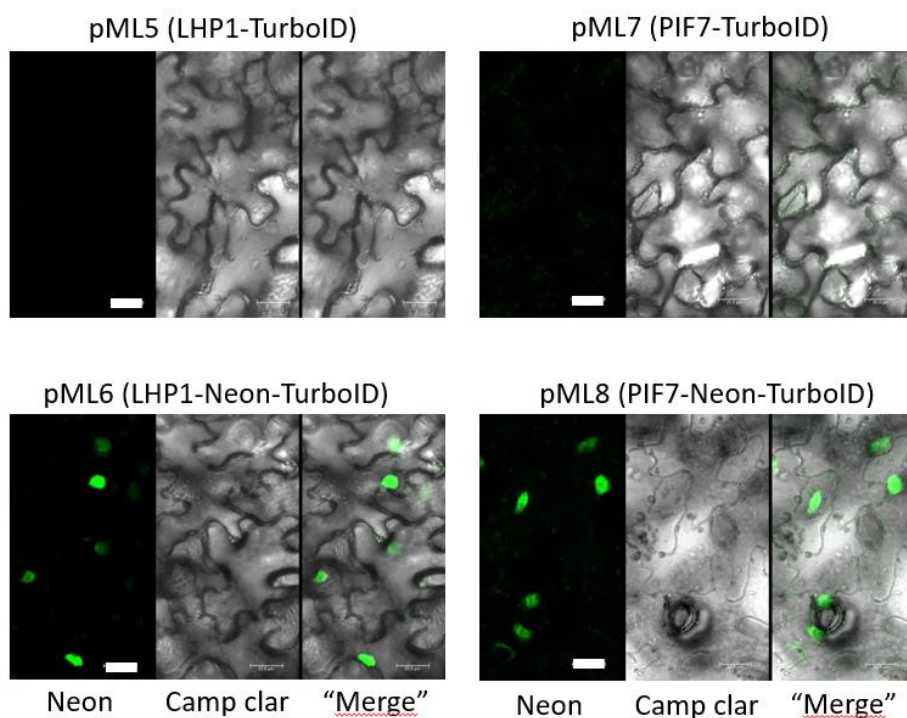
A partir de soques d'*A. tumefaciens* disponibles al laboratori amb els plasmidis *expression clones* pML5 (que generarà la proteïna LHP1-TurboID), pML6 (LHP1-Neon-TurboID), pML7 (PIF7-TurboID), pML8 (PIF7-Neon-TurboID) es va voler determinar si les fusions proteïques d'aquests plasmidis funcionaven correctament en cèl·lules vegetals. És a dir, es va avaluar si transformant cèl·lules vegetals, les construccions s'expressaven a nivell de RNA, a nivell de proteïna, i si, a més a més, aquesta proteïna era funcional (tenia activitat biotina lligasa). Per fer aquestes comprovacions, es van realitzar transformacions transitòries en plantes de tabac *Nicotiana benthamiana*.

#### **4.3.1 Fent servir els vectors amb la proteïna fluorescent Neon, s'observa que la transformació transitòria funciona**

La primera comprovació que es va realitzar va ser l'agroinfiltració de fulles de tabac per a poder visualitzar si la proteïna s'expressava *in vivo* en les cèl·lules de la planta. Amb aquest objectiu, es van utilitzar els plasmidis pML6 (LHP1-Neon-TurboID) pML8 (PIF7-Neon-TurboID) que produiran, a més de les proteïnes PIF7 o LHP1 juntament amb la proteïna TurboID, una proteïna fluorescent (proteïna Neon).

Es van observar les fulles transformades al un microscopi confocal per tal de veure si es detectava fluorescència (pML6 i pML8) (**Figura 4.11**) comparant amb dos controls negatius, els plasmidis amb TurboID però sense Neon (pML5 i pML7). Només es va detectar fluorescència als nuclis de les cèl·lules de les plantes que havien sigut transformades amb els vectors que contenien la proteïna Neon, el que significa que el procés d'agroinfiltració funciona i que les construccions (com a mínim les que porten Neon, pML6 i pML8) s'expressen a nivell de proteïna.

Aquestes fulles transformades que tenen senyal a microscopi es van fer servir com a controls positius als posteriors experiments, ja que l'expressió de la proteïna indica que també (anteriorment) s'estan expressant els gens i per tant hi ha RNA.



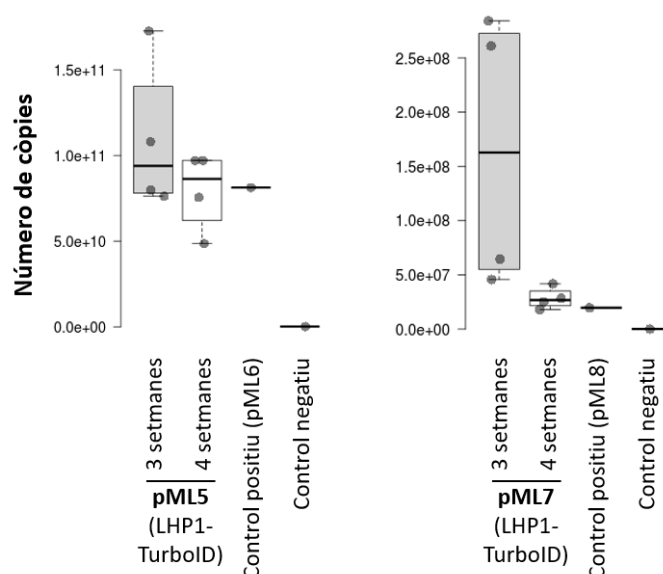
**Figura 4.11: fulles de tabac transformades amb pML5-8 i observades al microscopi confocal**

*Imatges de microscòpia confocal de fulles transformades amb els expression clones pML5-6 a camp de fluorescència verda (esquerra, per visualitzar Neon), camp clar (centre, per visualitzar les cèl·lules) i la suma de les imatges (dreta, merge). La barra correspon a 25  $\mu$ m.*

### 4.3.2 Les plantes de tabac de tres setmanes d'edat mostres una major eficiència en l'expressió dels vectors

Per poder estudiar si les construccions sense Neon (que no es van poder visualitzar al microscopi, pML5 i pML7) s'expressaven a les cèl·lules vegetals, i per trobar quines eren les millors condicions d'expressió de la proteïna TurboID, es va comparar l'expressió a nivell de RNA i de proteïna en fulles de plantes de tabac de tres i quatre setmanes d'edat agroinfiltrades amb els plasmidis corresponents.

Per quantificar l'expressió de les construccions, es va realitzar una PCR quantitativa absoluta (a través d'una recta patró dels plasmidis amb un nombre de còpies conegudes). Es va extreure RNA de fulles agroinfiltrades de plantes de 3 i 4 setmanes, i, posteriorment es va sintetitzar el cDNA. Seguidament, es va dur a terme la PCR quantitativa, i els valors de les mostres es van calcular comparant-los amb la recta patró, obtenint el nombre de còpies de la construcció a cada mostra (**Figura 4.12**). Es va observar que els nivells d'expressió dels gens, tant del *LHP1-TurboID* com del *PIF7-TurboID*, eren majors quan l'agroinfiltració es feia en plantes de 3 setmanes. Els controls positius (*LHP1-Neon-TurboID* i *PIF7-Neon-TurboID*) eren de les mateixes fulles observades a microscopi, de 5 setmanes de vida. Per aquesta raó es van obtenir uns nivells semblants als de l'expressió a 4 setmanes. A més a més, el nombre de còpies que es va quantificar de *LHP1-TurboID* era molt superior (dos ordres de magnitud), al de *PIF7-TurboID* el que indica que *LHP1* s'expressa molt més que *PIF7*.



**Figura 4.12: Anàlisi d'expressió de pML5 i pML7 en plantes de 3 i 4 setmanes**

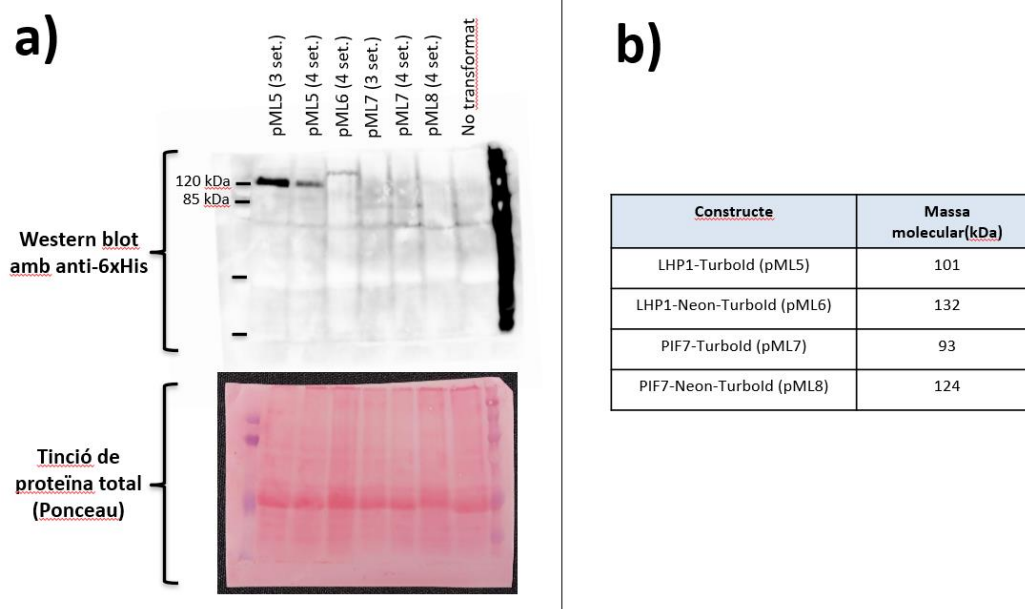
A la taula de l'esquerra, resultats obtinguts en l'anàlisi d'expressió en funció del nombre de còpies presents del plasmidi pML5. A la taula de la dreta, resultats obtinguts en l'anàlisi d'expressió del plasmidi pML7.

Per saber si aquestes diferències d'expressió es podien detectar també a nivell de proteïna, es va fer una extracció de proteïnes de les fulles agroinfiltrades a 3 i 4 setmanes, i es va dur a terme una anàlisi Western Blot fent servir anticossos anti-6xHis (cua d'histidines que es troba a la construcció), per tal de detectar la presència de proteïna (**Figura 4.13**). Les diferents mostres tenien una quantitat similar de proteïna (com es pot veure a la tinció Ponceau de proteïna total). Quan es va incubar amb anti-6xHis es va detectar senyal de banda a les fulles transformades amb LHP1-TurboID i LHP1-Neon-TurboID (sent la banda de LHP1-TurboID-Neon de major pes molecular, com s'esperava i es mostra en l'apartat b de la **Figura 4.13**), però no a les fulles transformades amb PIF7-TurboID o PIF7-Neon-TurboID. Això implica que la proteïna de les construccions amb PIF7 s'expressa molt menys que la de LHP1, o que la proteïna PIF7 és molt menys estable que LHP1.

Tot i així, com es va veure a microscopi PIF7-Neon-TurboID però no al Western Blot, podem concloure que els nivells de detecció en aquesta tècnica van ser inferiors als del microscopi. A més



a més, els nivells de proteïna (al igual que passava amb els de RNA) eren molt superiors a plantes infiltrades a 3 setmanes que a 4 setmanes, com es pot veure a la mostra de pML5 en la **Figura 4.13**. En base a aquesta informació, els posteriors experiments es van realitzar amb plantes de 3 setmanes.



**Figura 4.13: resultats de la tècnica Western Blot**

a) Resultats de l'extracció de proteïna a través de Western Blot fent servir anti-6xHis com a medi d'incubació (imatge superior) i contingut total de proteïna en cada mostra a través de tinció de proteïna total Ponceau (imatge inferior) b) Massa molecular esperada calculada a partir dels vectors d'estudi;

### 4.3.3 Podem detectar activitat biotina lligasa als construccions amb Turboid

Un cop comprovat que les construccions s'expressaven a les cèl·lules transformades per agroinfiltració, es va comprovar si aquestes també tenien l'activitat biotina lligasa conferida per la proteïna Turboid.

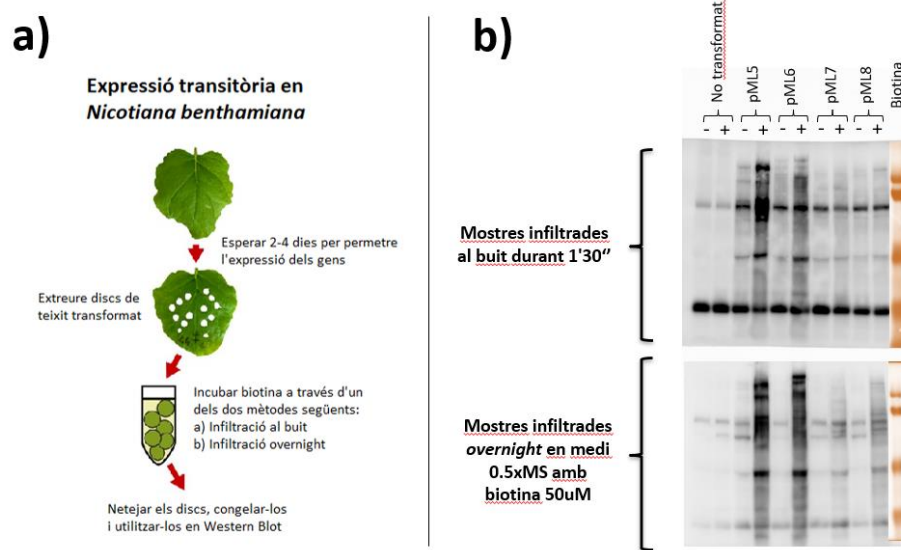
Per fer-ho es van agroinfiltrar novament plantes de 3 i 4 setmanes. Uns dies després, quan ja s'expressaven les construccions, fulles d'aquestes plantes es van incubar amb biotina exògena.

Seguidament, es van comparar dos tractaments d'incubació amb biotina (**Figura 4.14, a**): 1) un tractament curt d'una hora d'incubació amb biotina (100  $\mu$ M) amb una infiltració prèvia de la biotina al buit durant 1 minut i mig, i 2) un tractament de tota una nit (16 hores) amb biotina (50  $\mu$ M) sense tractament de buit.

A més de les mostres incubades amb biotina es van incloure un control sense biotina i un altre control negatiu de plantes no transformades amb cap de les construccions. Es va extreure proteïna total de les mostres i es va fer un Western Blot amb estreptavidina (que reconeix fortament la biotina) unida a un marcador fluorescent per poder detectar la senyal de biotinitilació (**Figura 4.14, b**).

En el tractament d'una hora es va detectar senyal de biotinitilació (major senyal de fluorescència a diferents pesos moleculars) principalment a les plantes transformades amb LHP1-TurboID i LHP1-Neon-TurboID (pML5 i pML6). Per poder detectar biotinitilació a les mostres de PIF7-TurboID i PIF7-Neon-TurboID (pML7 i pML8) les fulles transformades van haver de ser incubades amb biotina a temps llargs (16 hores).

Tal i com passava amb els nivells de RNA de proteïna detectats anteriorment, els nivells de biotinitilació van ser majors a les mostres de les construccions amb LHP1 que en les mostres amb les construccions de PIF7. Això indica que els majors nivells de biotinitilació en les mostres transformades amb LHP1-TurboID, són degudes a una major expressió d'aquesta construcció, i no necessàriament a un major número de proteïnes amb les que interacciona.



**Figura 4.14: detecció de l'activitat biotina lligasa aportada per el gen TurboID**

- a) Protocol per a l'infiltració de *Nicotiana benthamiana* i possibles mètodes d'incubació de biotina.  
b) Resultats obtinguts en l'expressió de la biotina

Els resultats de transformació transitòria en tabac indiquen que les proteïnes quimèriques amb TurboID s'expressen i són actives, tot i que sembla que les línies amb LHP1 tenen una major expressió que les de PIF7. En qualsevol cas, aquests resultats indiquen que es poden fer servir aquests construccions per transformar de manera estable plantes d'*Arabidopsis*, i realitzar els experiments finals de detecció de proteïnes properes a LHP1 i PIF7.

## 5. Conclusions

### Part 1. Clonació:

- 1) Mitjançant mutagènesi dirigida s'han generat plasmidis amb els gens *LHP1* i *PIF7* mutats fusionats als gens que codifiquen la proteïna *TurboID* i *Neon*.
- 2) Els plasmidis generats (*expression clones*) s'han pogut introduir en el vector de transformació de plantes *Agrobacterium tumefaciens*.

### Part 2. Transformació transitòria:

- 3) La tècnica d'agroinfiltració ens ha permès expressar en planta les proteïnes quimèriques LHP1-TurboID, LHP1-Neon-TurboID, i PIF7-TurboID i PIF7-Neon-TurboID en les seves varietats funcionals.
- 4) Els nivells de proteïna obtinguts amb les construccions de LHP1 són majors que els de PIF7. Tot i això, els nivells de proteïna PIF7 poden detectar-se mitjançant microscòpia.
- 5) Les construccions generades amb TurboID tenen activitat biotina lligasa, que pot ser detectada després d'una hora d'incubació quan els nivells d'expressió de proteïna son alts (en el cas de LHP1), però es requereixen temps d'incubació més elevats quan els nivells són baixos (en el cas de PIF7).

## 6. Bibliografia

### 6.1 Referències bibliogràfiques

- [1] SMITH, H. and WHITELAM, G.C. (1997), The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment*, 20: 840-844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-104.x>
- [2] Morelli, G., & Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant physiology*, 122(3), 621–626. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.621>
- [3] Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *The arabidopsis book*, 9, e0148. <https://doi.org/10.1199/tab.0148>
- [4] Roig-Villanova, I., & Martínez-García, J. F. (2016). Plant Responses to Vegetation Proximity: A Whole Life Avoiding Shade. *Frontiers in plant science*, 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00236>
- [5] Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>
- [6] Li, M., Zhang, H., Wang, J. X., & Pan, Y. (2012). A new essential protein discovery method based on the integration of protein-protein interaction and gene expression data. *BMC systems biology*, 6, 15. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-15>
- [7] Yang, C., Zhu, T., Zhou, N., Huang, S., Zeng, Y., Jiang, W., Xie, Y., Shen, W. H., & Li, L. (2023). PIF7-mediated epigenetic reprogramming promotes the transcriptional response to shade in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 42(8), e111472. <https://doi.org/10.15252/embj.2022111472>
- [8] Maolin Peng, Zepeng Li, Nana Zhou, Mengmeng Ma, Yupei Jiang, Aiwu Dong, Wen-Hui Shen, Lin Li, Linking PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR to Histone Modification in Plant Shade Avoidance , *Plant Physiology*, Volume 176, Issue 2, February 2018, Pages 1341–1351, <https://doi.org/10.1104/pp.17.01189>
- [9] Willige, B. C., Zander, M., Yoo, C. Y., Phan, A., Garza, R. M., Wanamaker, S. A., He, Y., Nery, J. R., Chen, H., Chen, M., Ecker, J. R., & Chory, J. (2021). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS trigger environmentally responsive chromatin dynamics in plants. *Nature genetics*, 53(7), 955–961. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00882-3>

- [10] Berry, S., Rosa, S., Howard, M., Bühler, M., & Dean, C. (2017). Disruption of an RNA-binding hinge region abolishes LHP1-mediated epigenetic repression. *Genes & development*, 31(21), 2115–2120. <https://doi.org/10.1101/gad.305227.117>
- [11] VALDÉS, A.E., RIZZARDI, K., JOHANNESSON, H., PARA, A., SUNDÅS-LARSSON, A. and LANDBERG, K. (2012), *Arabidopsis thaliana* TERMINAL FLOWER2 is involved in light-controlled signalling during seedling photomorphogenesis. *Plant, Cell & Environment*, 35: 1013-1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02468.x>
- [12] Edelheit, O., Hanukoglu, A. & Hanukoglu, I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* 9, 61 (2009). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
- [13] Al-Sady, B., Kikis, E. A., Monte, E., & Quail, P. H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2232–2237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711675105>

## 6.2 Bibliografia complementària

Yang, C., Zhu, T., Zhou, N., Huang, S., Zeng, Y., Jiang, W., Xie, Y., Shen, W. H., & Li, L. (2023). PIF7-mediated epigenetic reprogramming promotes the transcriptional response to shade in Arabidopsis. *The EMBO journal*, 42(8), e111472. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111472>

Reece-Hoyes, J. S., & Walhout, A. J. M. (2018). Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(1), pdb.top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>

Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M., & Martínez-García, J. F. (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *The EMBO journal*, 26(22), 4756–4767. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601890>

Willige, B. C., Zander, M., Yoo, C. Y., Phan, A., Garza, R. M., Wanamaker, S. A., He, Y., Nery, J. R., Chen, H., Chen, M., Ecker, J. R., & Chory, J. (2021). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS trigger environmentally responsive chromatin dynamics in plants. *Nature genetics*, 53(7), 955–961. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00882-3>

Zhang, N., Evers, J. B., Anten, N. P. R., & Marcelis, L. F. M. (2021). Turning plant interactions upside down: Light signals from below matter. *Plant, cell & environment*, 44(4), 1111–1118. <https://doi.org/10.1111/pce.13886>

Thermo Fisher Scientific Inc. (<https://www.thermofisher.com/es/es/home.html>)