

**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat  
Autònoma de Barcelona**

**CARACTERITZACIÓ D'UNA NOVA  
PROTEÏNA DE *Solanum tuberosum*, PHOR1,  
INVOLUCRADA EN LA VIA DE  
SENYALITZACIÓ DE LES GIBEREL·LINES**

Memòria presentada per Virginia Amador Espinosa inscrita en el programa de doctorat de Biotecnologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, per optar al grau de Doctor en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona

Treball realitzat al Departament de Genètica Molecular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona al Centre d'Investigació i Desenvolupament (CID), sota la direcció de la Dra. Salomé Prat Montguió

Barcelona, Setembre del 2001

Vist-i-plau de la  
directora de Tesi

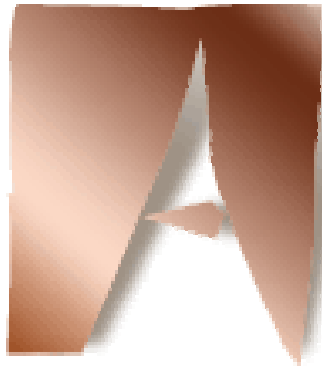
Vist-i-plau del  
Tutor

Signatura de  
l'Autora

Salomé Prat Montguió

Enrique Querol

Virginia Amador Espinosa



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la  
Universitat Autònoma de Barcelona**

**CARACTERITZACIÓ D'UNA NOVA PROTEÏNA DE  
*Solanum tuberosum*, PHOR1, INVOLUCRADA EN  
LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LES  
GIBEREL·LINES**

VIRGINIA AMADOR ESPINOSA

Barcelona, Setembre del 2001



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

**CARACTERITZACIÓ D'UNA NOVA PROTEÏNA DE *Solanum tuberosum*, PHOR1, INVOLUCRADA EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LES GIBEREL·LINES**

VIRGINIA AMADOR ESPINOSA

Barcelona, Setembre del 2001

## ÍNDEX GENERAL

---

INTRODUCCIÓ.....	1
OBJECTIUS.....	61
MATERIALS I MÈTODES.....	65
RESULTATS.....	131
DISCUSSIÓ.....	207
CONCLUSIONS.....	235
BIBLIOGRAFIA.....	241

# ÍNDEX TEMÀTIC

---

INTRODUCCIÓ.....	1
1. LA TUBERITZACIÓ.....	1
1.1 Factors ambientals.....	3
▪ Aportació de nitrogen.....	3
▪ Temperatura.....	4
▪ Fotoperíode.....	4
2. ELS FOTORRECEPTORS.....	6
• Fotoreceptors de llum roja o fitocroms.....	6
• Fotoreceptors de llum blava/UV-A.....	7
• Fotoreceptors de llum UV-B.....	8
3. ELS FITOCROMS.....	9
3.1 Estructura i activitat biològica.....	9
3.2 Processos de desenvolupament de la planta regulats pels fitocroms.....	14
• Els fitocroms i resposta fotoperiòdica.....	17
• Els fitocroms i el rellotge circadià.....	18
<u>Gens relacionats amb el rellotge circadià.....</u>	20
• Els fitocroms i les hormones vegetals.....	21
4. VIES DE TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL DE LA LLUM.....	22
5. ESTÍMUL INDUCTOR I REGULACIÓ HORMONAL DE LA TUBERITZACIÓ.....	29
6. GIBEREL.LINES.....	33
6.1 Biosíntesi de giberel.lines i mutants biosintètics.....	35
6.2 Regulació dels nivells endògens de GAs.....	41
• Regulació dels nivells endògens de GAs al llarg del desenvolupament de la planta.....	41
• Regulació de l'expressió dels gens biosintètics pels nivells endògens de GAs.....	42
• Regulació dels nivells endògens de GAs per la llum.....	44
6.3 Transducció de senyal de les GAs.....	45
• Mutants insensibles.....	48
▪ <i>gai i rga</i> .....	48
▪ <i>Rht i D8</i> .....	51
▪ <i>shi</i> .....	52
▪ <i>Pickle</i> .....	53
▪ <i>Sleepyl</i> .....	53
• Mutants allargats.....	54
▪ <i>sln</i> .....	54
▪ <i>spy</i> .....	55
<u>Model esquemàtic de la transducció de senyal de les GAs.....</u>	58
<b>OBJECTIUS.....</b>	61

<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	65
1 MATERIAL VEGETAL.....	65
2 SOQUES BACTERIANES I PLASMIDIS.....	65
3 EXTRACCIÓ I ANÀLISI DE RNA.....	67
3.1 Extracció de RNA pel mètode del tampó Z6.....	67
3.2 Purificació de RNA poli A <sup>+</sup> amb partícules magnètiques poli (dT) <sub>25</sub> .....	68
3.3 Anàlisi de RNA per northern blot i transferència a una membrana de niló.....	69
3.4 Transferència a membrana de niló.....	70
4 HIBRIDACIÓ D'ÀCIDS NUCLÈICS.....	70
5 MARCATGE RADIOACTIU DE DNA.....	71
▪ <u>Random priming</u> .....	71
6 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	72
6.1 Reacció en cadena de la polimerasa.....	72
6.2 Oligonucleòtids emprats en l'amplificació per PCR i construccions.....	73
* <u>Obtenció de plasmidis de <i>pET23a/Nt</i> i <i>pET28a/Ct</i></u> .....	73
* <u>Obtenció del plàsmid <i>pET28a/PHORI</i></u> .....	74
* <u>Obtenció del plàsmid <i>pUC2X35S-PHORI-GFP</i></u> .....	74
<u>Obtenció del plàsmid <i>pBin19-2X35S-PHORI-GFP</i></u> .....	75
** <u>Obtenció dels plàsmids <i>pUC-2X35S-CPI-GFP</i> i <i>Puc-2X35S-ARM-GFP</i></u> .....	76
<u>Obtenció del plàsmid <i>pUC2X35S-CPI-GFP-GUS</i></u> .....	76
** <u>Obtenció del plàsmid <i>pUC2X35SS-PHORI(-PSSS)-GFP</i></u> .....	77
* <u>Obtenció del plàsmid <i>pAS2-1/PHOR1</i>, <i>pAS2-1/CPI</i> i <i>pAS2-1/ARM</i></u> .....	77
7 5' RACE.....	78
8 EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANT A <i>E. coli</i> .....	79
8.1 Expressió.....	79
o <u>Anàlisi</u> .....	81
o Transferència.....	81
o Immunodetecció de proteïnes amb unan cua de 6-10 Histidines expressades en el vector pETs.....	81
<u>Immunodetecció amb anticossos específics</u> .....	82
8.2 Purificació de proteïnes recombinants mitjançant cromatografia d'afinitat en columnes de Ni <sup>2+</sup> .....	83
• <u>Fracció soluble i insoluble de proteïnes</u> .....	83
• <u>Extracció</u> .....	84
• <u>Purificació de proteïnes recombinants en condicions desnaturalitzants</u> .....	84
• <u>Renaturalització de les proteïnes recombinants extretes i purificades en condicions desnaturalitzants</u> .....	85
8.3 Purificació de proteïnes recombinants fusionades a la proteïna GST mitjançant cromatografia d'afinitat en columnes de DEAE glutatíó-sepharose.....	86

o	<u>Extracció</u> .....	86
o	<u>Purificaci</u> .....	87
9.	OBTENCIÓ DE SERUM IMMUNE DE CONILLS CONTRA LES PROTEINES RECOMBINANTS PURIFICADES .....	87
9.1	Obtenció de les proteïnes desnaturalitzades i purificades a partir d'un gel de proteïnes SDS- PAGE.....	87
9.2	Immunització de conills.....	88
•	<u>Immunització</u> .....	89
•	<u>Obtenció de sueros</u> .....	89
10.	PREPARACIÓ D'EXTRACTES PROTÈICS NUCLEARS A PARTIR DE FULLES DE PATATERA.....	90
10.1	.....	Aïllam
ent de nuclis.....	90	
10.2	.....	Extrac
ció de proteïnes nuclears.....	90	
11.	PREPARACIÓ D'EXTRÀCTES PROTEICS DE LA FRACCIÓ MICROSOMAL.....	92
11.1	.....	Aïllam
ent de la fracció microsomal.....	92	
12.	EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES TOTALS DE PLANTA.....	93
12.1	.....	Extrac
ció de proteïnes.....	93	
13.	IMMUNODETECCIÓ.....	94
14.	TRADUCCIÓ I TRANSCRIPCIÓ <i>In vitro</i> .....	94
15.	TRANSFORMACIÓ TRANSITÒRIA DE CÈL.LULES DE <i>Nicotina tabacum</i> Bright Yellow 2 .....	95
15.1	.....	Creixe
ment de la suspensió cèl.lular de <i>N. tabacum</i> BY2.....	95	
15.2	.....	Transf
ormació transitòria de les cèl.lules <i>N. tabacum</i> BY2.....	95	
▪	<u>Preparació de les partícules d'or</u> .....	95
▪	<u>Precipitació de les partícules d'or amb el DNA</u> .....	96
▪	<u>Transformació de les cèl.lules de tabac BY2</u> .....	97
16.	TRANSFORMACIÓ ESTABLE DE CÈL.LULES DE <i>N. tabacum</i> BY2.....	97
16.1	.....	Transf
ormació estable de cèl.lules de tabac BY2.....	98	
16.2	.....	Suspe
nsió cel.lular a partir de calls transformats.....	99	
16.3	.....	Tracta
ment de la suspensió cel.lular amb GA <sub>3</sub> i ancimidol.....	99	

16.4	Extrac	
ció de proteïnes totals de calls transformats.....		99
• <u>Extracció de proteïnes totals de calls</u> .....		100
16.5	Immu	
nodetecció de la proteïna de fusió PHOR1:GFP.....		100
17. MICROSCOPIA ÒPTICA I CONFOCAL.....		100
18. MICROSCOPIA ELECTRÒNICA I IMMUNOCITOQUÍMICA.....		101
18.1	Fixaci	
ó i inclusió.....		101
18.2	Incuba	
ció amb el serum immune de conill.....		102
19. TRANSFORMACIÓ DE <i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> .....		103
19.1		
Preparació i transformació de cèl.lules competents d' <i>Agrobacterium</i> de soca C58:C1		90
.....		
..103		
▪ <u>Procediment de preparació de cèl.lules competents d'<i>A. tumefaciens</i> de la soca</u>		
<u>C58:C1</u> .....		103
▪ <u>Procediment de transformació</u> .....		104
19.2		
Infecció de <i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> .....		105
19.3	Regen	
eració de plantes trangèniques de patatera.....		105
20. TRACTAMENTS AMB GA <sub>3</sub> .....		106
21. DETERMINACIÓ DE GIBEREL·LINES.....		107
<u>Purificació per partició entre dissolvents</u> .....		108
<u>Purificació en columna d'intercanvi iònic i cartutx Sep-Pack</u> .....		108
<u>Fraccionament de les GAs per HPLC</u> .....		108
<u>Preparació de derivats i quantificació</u> .....		108
22 METODOLOGIA GENERAL.....		109
22.1 Medis i solucions generals.....		109
• <u>Medis de</u>		
<u>cultiu</u> .....		109
• <u>Solucions</u> .....		
...109		
22.2	Antibi	
òtics.....		109
22.3	Prepar	
ació de DNA plasmídic.....		110
22.4	Transf	
ormació d' <i>E. coli</i> .....		112



•	<u>Preparació de cèl.lules competents DH5 (Hannahan et. al. 1983)</u> .....	112
•	<u>Transformació de les cèl.lules competents DH5<math>\alpha</math></u> .....	113
22.5	Enzims de restricció.....	113
22.6	Enzims de modificació.....	114
▪	<u>Fragments Klenow de la DNA polimerasa</u> .....	114
▪	<u>Pfu</u> .....	114
▪	<u>Fosfatasa alcalina</u> .....	115
22.7	Lligació.....	115
22.8	Electroforesis en gels d'agarosa.....	116
22.9	Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa.....	117
22.10	Seqüenciació.....	117
22.11	Tractament de les seqüències i programes informàtics.....	117
23.	DOBLE HÍBRID.....	117
23.1	Soques de llevat i plàsmids.....	118
23.2	Formació de llevats.....	119
23.3	Preparació d'extractes proteics de llevat.....	121
23.4	Conjugació "mating".....	123
23.5	Aïllament del DNA plasmídic a llevat.....	124
▪	<u>Enriquiment en el plàsmid pGAD424-AD</u> .....	124
▪	<u>Extracció del DNA plasmídic de soques de llevat que han segregat del plàsmid d'interès</u> .....	125
23.6	Assaig $\beta$ -galactosidasa.....	126
▪	<u>Assaig <math>\beta</math>-galactosidasa sobre filtres</u> .....	127
▪	<u>Assaig <math>\beta</math>-galactosidasa líquid</u> .....	127
24.	PULL DOWN.....	129
	<b>RESULTATS</b> .....	131
1.	LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA PROTEÏNA PHOR1.....	131
1.1	Obtenció de sèrum immune contra la proteïna PHOR1.....	134
1.2	Detecció de la proteïna PHOR1 a extractes totals de plantes de patatera.....	137
1.3	Immunodetecció de la proteïna PHOR1 en diferents fraccions subcel·lulars.....	139

1.4 Immunolocalització de la proteïna PHOR1 en talls ultrafins de fulla de patatera...	142
1.5 Localització de la proteïna de fusió PHOR1:GFP a cèl.lules de tabac BY-2.....	143
1.5a PHOR1 migra al núcli de manera ràpida i transitòria.....	146
1.5b Les cèl.lules BY2 mostren una resposta fisiològica a GAs.....	150
1.6 PHOR1 presenta un domini N-terminal CPI conservat i un domini C-terminal amb una estructura Armadillo repetida.....	152
1.7 El domini Armadillo de PHOR1 és el responsable de la migració de la proteïna al nucli.....	158
1.8 Els possibles llocs de <i>O</i> - <i>N</i> -acetilglucosaminació o fosforilació no són importants per a la migració al nucli de la proteïna PHOR1:GFP.....	161
2.LES PLANTES TRANSGÈNIQUES 8A PRESENTEN UNA SENSIBILITAT REDUÏDA A LES GAs.....	162
..	162
2.1 Les línies transgèniques amb nivells reduïts de PHOR1, 8A, tenen fulles més amples i amb els pecíols més curts, com les línies transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen GA 20-oxidasa.....	162
2.2 Les plantes 8A presenten una sensibilitat reduïda a l'aplicació exògena de GAs.....	166
2.3 Les plantes 8A presenten uns nivells superiors de GAs endògenes.....	168
2.4 Les plantes 8A presenten alterats els nivells de transcrit corresponents als gens de la ruta de biosíntesi de GAs, GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa.....	170
2.5 Fenotip observat a les plantes transgèniques portadores de la construcció de sobreexpressió constitutiva PHOR1:GFP.....	174
3.AÏLLAMENT DE PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN ESPECÍFICAMENT AMB PHOR1 MITJANÇANT EXPERIMENTS DE “DOBLE HÍBRID” EN LLEVAT.....	177
3.1 Preparació de les construccions pel criatge “doble-híbrid”.....	177
3.1.1 La proteïna PHOR1 fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 s'expressa correctament a llevat.....	180
3.1.2 La proteïna PHOR1 fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 no activa per sí sola els gens marcadors HIS3 i ADE2.....	182
3.2 Conjugació de les soques de llevat MATa PJ69-2A i MAT <sup>-</sup> Y187.....	184
3.2.1 Seqüenciació dels clons positius e identificació de les proteïnes codificades pels corresponents inserts.....	184
3.2.2 Comprovació de que l'activació dels gens marcadors HIS3 i ADE2 precisa de la presència de la proteïna GAL4-BD:PHOR1.....	186
3.3 Les proteïnes TH44 i TH53 interaccionen amb la proteïna PHOR1 a través del seu domini <i>armadillo</i> .....	189

4. COMPROVACIÓ DE LA INTERACCIO ENTRE LES PROTEINES TH53 O TH44 I PHOR1 MITJANÇANT EXPERIMENTS DE <i>pull down</i> .....	191
5. EL GEN <i>TH53</i> S'EXPRESSA MAJORITÀRIAMENT A LES PARTS SUBTERRÀNIES DE LES PLANTES <i>S.tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> .....	197
6. TH53 MOSTRA SIMILITUD AMB LA FAMILIA DE PROTEINES F-box.....	198
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	207
1.1 PHOR1 no presenta similitud amb cap dels enzims biosintètics de GAs coneguts...	210
1.2 Les plantes transgèniques -PHOR1 presenten una sensibilitat reduïda a les GAs...	210
• Les línies -PHOR1 requereixen concentracions més elevades de GAs que les plantes salvatges per a induir el creixement de la tija.....	212
• Les plantes -PHOR1 mostren nivells alterats d'expressió dels gens <i>StGA20ox1</i> i <i>StGA2ox</i> .....	213
• Les plantes transgèniques -PHOR1 presenten un increment en els nivells endògens de GAs.....	217
• PHOR1 és un possible element integrador entre les vies de senyalització del fotoperíode i les GAs.....	218
2. PHOR1 TÉ UN DOMINI <i>ARMADILLO</i> RESPONSABLE DE LA MIGRACIO DE LA PROTEÏNA AL NUCLI I UN DOMINI N-TERMINAL CPI QUE EN ABSÈNCIA DE GAs RETÉ LA PROTEÏNA AL CITOPLASMA.....	220
3. PHOR1 INTERACCIONA AMB LA PROTEÏNA PIP1 (PER <i>PHOR1 Interacting Protein 1</i> ) A TRAVÉS DEL DOMINI <i>ARMADILLO</i> .....	225
• El clon <i>TH53</i> codifica per una nova proteïna que conté un motiu F-box i domini <i>Kelch</i> .....	226
4. MODEL HIPOTÈTIC D'ACTUACIÓ DE LA PROTEÏNA PHOR1 EN RESPOSTA A LES GAs .....	232
<b>CONCLUSIONS</b> .....	235
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	241

## TAULES I FIGURES

---

### INTRODUCCIÓ

<b>Figura 1:</b> Control fotoperiòdic de la tuberització .....	5
<b>Figura 2:</b> Estructura del fitocrom .....	11
<b>Figura 3:</b> Model bàsic del sistema circadià a les cèl.lules de la planta.....	19
<b>Figura 4:</b> La proteïna COP1 regula l'abundància de la proteïna HY5 .....	26
<b>Figura 5:</b> Mutants afectats en la via de transducció del senyal dels fitocroms A i B .....	28
<b>Figura 6:</b> Transmissió de l'estímul inductor de tuberització .....	29
<b>Figura 7:</b> Transmissió de l'estímul inductor de floració des de plantes de tabac a plantes de patatera crescudes en LD.....	30
<b>Figura 8:</b> Els empels de fulles de plàntes transgèniques de patatera <i>-PHYB</i> promouen la tuberització de les plantes salvatges crescudes en condicions LD .....	31
<b>Figura 9:</b> Ruta de biosíntesi de les GAs.....	40
<b>Figura 10:</b> Funció de la proteïna GAI com a regulador negatiu de la resposta a GAs .....	50
<b>Figura 11:</b> Model esquemàtic de la transducció del senyal de les GAs.....	60

### MATERIAL I MÈTODES

<b>Taula 1:</b> Soques bacterianes i plasmidis .....	66
<b>Taula 2:</b> Preparació de gels de proteïnes SDS-PAGE.....	80
<b>Taula 3:</b> Hormones i antibiòtics emprats per a la regeneració de plantes.....	106
<b>Taula 4:</b> Relació de dosis d'antibiòtics i d'altres productes per al creixement de bacteris .....	110
<b>Taula 5:</b> Soques de llevat i plasmidis.....	118-119
<b>Figura 1:</b> Mapa del vector pUC/GFP S65C/T.....	75

## RESULTATS

<b>Figura 1:</b> Seqüència aminoacídica de la proteïna PHOR1 on es mostren els diferents potencials llocs de modificació post-traducional .....	133
<b>Figura 2:</b> Expressió de les proteïnes recombinants NT i CT .....	135
<b>Figura 3:</b> Western-blot dels anticossos preparats en front de les proteïnes PHOR1 recombinants NT i CT.....	13
<b>Figura 4:</b> Sensibilitat dels antisèrums en front de les proteïnes NT i CT recombinants. Assaig dot-blot.....	137
<b>Figura 5:</b> Immunolocalització de la proteïna PHOR1 a extractes totals de plantes <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> .....	138
<b>Figura 6:</b> Immunodetecció del fraccionament subcel·lular de fulles joves de patata <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> .....	140
<b>Figura 7:</b> Immunodetecció de la proteïna PHOR1 a extractes nuclears .....	141
<b>Figura 8:</b> Microscopia electrònica corresponent als talls ultrafins de les fulles joves de patata .....	143
<b>Figura 9:</b> Localització subcel·lular de la proteïna de fusió PHOR1:GFP en cèl·lules BY2.....	146
<b>Figura 10:</b> Localització de la proteïna de fusió PHOR:GFP en suspensions cel·lulars BY-2 .....	149
<b>Figura 11:</b> Nivells d'expressió del gen <i>NtGA2ox</i> , que codifica per l'enzim GA 2-oxidasa de tabac, en cèl·lules BY-2 transformació amb la construcció <i>pBin19-2x35ScaMV-PHOR1-GFP</i> , que expressen nivells alts de la proteïna de fusió PHOR1:GFP (call 33) .....	152
<b>Figura 12:</b> Dominis CPI i <i>armadillo</i> de PHOR1.....	155
<b>Figura 13:</b> El domini C-terminal conservat de PHOR1 mostra similitud amb el domini "arm-repeat" de la proteïna ARMADILLO de <i>Drosophila</i> i el seu homòleg -catenina de vertebrats .....	157
<b>Figura 14:</b> Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió ARM:GFP, CPI:GFP i CPI:GFP:GUS en cèl·lules BY-2 de tabac .....	160
<b>Figura 15:</b> Canvis morfològics observats en les fulles de les línies transgèniques antisentit pel cDNA de <i>PHOR1</i> (línies 8A) .....	165

<b>Figura 16:</b> Les corbes de dosi-resposta a GA <sub>3</sub> a les plantes <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> controls (A7540) i dos línies diferents portadores de la construcció antisentit del cDNA de <i>PHOR1</i> (8A-3, 8A-4) .....	168
<b>Figura 17:</b> Nivells de GAs endògens a les plantes <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> controls (A7540) i dos línies diferents portadores de la construcció antisentit del cDNA de <i>PHOR1</i> (8A3, 8A4) .....	169
<b>Figura 18:</b> Nivells d'expressió dels gens biosintètics GA 20 oxidasa i GA 2 oxidasa a les plantes <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> controls no transformades (A7540) i transformades amb la construcció antisentit del cDNA de <i>PHOR1</i> (8A3 i 8A4) .....	171
<b>Figura 19:</b> Quantificació dels nivells d'expressió a fulla del transcrit <i>StGA20ox1</i> en plantes <i>S. tuberosum ssp andigena</i> controls no transformades (A7540) i transformades amb la construcció antisentit del cDNA de <i>PHOR1</i> (8A3) crescudes sota fotoperíode de SD.....	172
<b>Figura 20:</b> Quantificació dels nivells d'expressió a fulla dels transcrits <i>StGA20ox1</i> i <i>PHOR1</i> en plantes <i>S. tuberosum ssp andigena</i> (A7540) crescudes sota fotoperíode de SD i SD+NB.....	173
<b>Figura 21:</b> Anàlisi d'expressió, mitjançant Western blot, de la proteïna PHOR1:GFP a les plantes de patatera <i>S. tuberosum ssp andigena</i> (A7540) i mutants <i>GAI</i> ( <i>gal1</i> ), transformades amb les construccions <i>pBin19-2X35S-Phor1-gfp-pA35S</i> .....	174
<b>Figura 22:</b> Canvis fenotípics, en quant a la llargària de la tija, i la morfologia de les fulles de les línies transgèniques de <i>S. tuberosum ssp andigena</i> que sobreexpressen alts nivells de la proteïna PHOR1:GFP .....	176
<b>Figura 23:</b> Anàlisi <i>western</i> de les proteïnes de fusió GAL4-BD:PHOR1, GAL4-BD:CPI, GAL4-BD:ARM i del domini GAL4-BD expressades en la soca de llevat PJ69-2A .....	181
<b>Figura 24:</b> Esquema gràfic de l'expressió dels gens marcadors HIS3 i ADE2 en que es fonamenten els experiments de doble híbrid .....	183
<b>Figura 25:</b> Co-transformació de la soca haploid MATa AH109 amb els plàsmids <i>pGAD/TH44</i> o <i>pGAD/TH53</i> i el vector <i>pAS2-1</i> , o les construccions <i>pAS1-2/PHOR1</i> , <i>pAS2-1/CPI</i> i <i>pAS2-1/ARM</i> .....	190

<b>Figura 26:</b> Experiments de <i>pull-down</i> per a demostrar la interacció entre la proteïna PHOR1 i les proteïnes TH44 i TH53 .....	192
<b>Figura 27:</b> Quantificació de l'afinitat d'interacció de la proteïna GST:TH53 amb els diferents dominis de PHOR1 .....	194
<b>Figura 28:</b> Assaig $\beta$ -galactosidasa de les cèl.lules MATa AH109 co-transformades amb la construcció GAL4-AD:TH53 i els diferents dominis de PHOR1 fusionats al GAL4-BD.....	196
<b>Figura 29:</b> Anàlisi <i>northern</i> de l'expressió del missatger <i>TH53</i> a diferents teixits de les plantes <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> , crescudes en condicions no inductores de la tuberització (LD) .....	197
<b>Figura 30:</b> Anàlisi <i>northern</i> de l'expressió del missatger <i>TH53</i> a diferents teixits de les plantes <i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> , crescudes en condicions de SD i SD+NB .....	198
<b>Figura 31:</b> Seqüència nucleotídica i seqüència aminoacídica deduïda a partir del clon de cDNA <i>TH53</i> complert .....	200-201
<b>Figura 32:</b> Dominis F-box i “ <i>Kelch</i> ” de PIP1 .....	204-205
<b>Taula 1 :</b> Percentatge de cèl.lules en que s'observa una localització nuclear o una localització citoplasmàtica de les proteïnes de fusió PHOR1:GFP, PHOR1(-PSSS):GFP, ARM:GFP, CPI:GFP I CPI:GFP:GUS en cèl.lules BY-2 .....	162
<b>Taula 2:</b> Comparació dels resultats obtinguts per transformació i creuament de les soques de llevat .....	180
<b>Taula 3:</b> Resultats obtinguts per comparació mitjançant el programa BLAST de les seqüències aminoacídiques corresponents a les proteïnes codificades pels diferents clons positius, amb les proteïnes dipositades als bancs de dades .	185-186
<b>Taula 4:</b> Resultats de la co-transformació de la soca MATa AH109 amb els diferents DNAs <i>pGAD/THx</i> , al mateix temps que la construcció <i>pAS2-1/PHOR1</i> o el vector <i>pAS2-1</i> buit.....	188

## DISCUSSIÓ

<b>Figura 1:</b> Mecanisme d'acció d'ARMADILLO/ $\beta$ -catenina en resposta a la senyal Wg/Wnt .....	223
<b>Figura 2:</b> Regulació de la resposta a auxines per degradació depenent d'ubiquitinació d'un o més represors específics al proteasoma.....	229
<b>Figura 3:</b> Model hipotètic d'actuació de la proteïna PHOR1 en resposta a les GAs .....	234



## ABREVIATURES

---

aà	aminoàcids
ABA.	àcid abscísic
AD	domini activador
APS	persulfat amoni
ARM	domini <i>armadillo</i> posició aà 109-400 de PHOR1
ARM:GFP	domini ARM fusionat a la GFP
BD	domini d'unió al DNA
BY-2	cèl.lules de <i>Nicotina tabacum</i> Bright Yellow 2
CaMV	virus del mosaic de la coliflor
CPI	domini CPI posició aà 13-79 de PHOR1
cDNA	DNA còpia
CDP	<i>ent</i> -copalil difosfat
CPI:GFP	domini CPI fusionat a la GFP
CT	domini C-terminal de la proteïna PHOR1 posició 728-1432 de <i>PHOR1</i>
- Ct5, Ct6	sèrum immune anti-CT dels conills Nt5 i Nt6 respectivament
DEPC	dietilpirocarbonat
DNA	àcid desoxirribonuclèic
dNTPs	desoxirribonucleòtids
DO	densitat òptica
EDTA	àcid etilendiamitetraacètic
Fr	llum del vermell llunyà, màx.=730
GA <sub>3</sub>	àcid giberèl·lic
GAs	giberel·lines
GC-MS	cromatografia de gasos acoplada a espectrometria de masses
GFP	green fluorescent protein
GGDP	geranilgeranil pirofosfat
GAL4-AD	domini activador de la proteïna GAL4
GAL4-BD	domini d'unió al DNA de la proteïna GAL4
h	hores
HPLC	cromatografia líquida d'alta eficàcia

I	induida per tuberitzar
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalacto-piranòsid
JA	àcid jasmònic
Kb	Kilobases
KDa	KiloDaltons
LD	dia llarg, 16h llum+8h fosc
MES	àcid 2-(N-morfoín) etanulfònic
Min	minuts
mRNA	RNA missatger
NB	interrupció del període de fosc amb 15-30 minuts de llum
NI	no induïda per a tuberitzar
NT	domini N-terminal de la proteïna PHOR1 posició 17-412 de <i>PHOR1</i>
-Nt3, Nt4	sèrum immune anti-NT dels conills Nt3 i Nt4, respectivament
<i>NtGA20ox</i>	GA 20-oxidasa de tabac
<i>NtGA2ox</i>	GA2-oxidasa de tabac
Pb	parell de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PHOR1	proteïna PHOtoperiod Responsive 1
PHOR1:GFP	proteïna PHOR1 fusionada a la GFP
<i>PHOR1</i>	cDNA del gen PHOtoperiod Responsive 1
<i>Phor1</i>	cDNA del gen PHOtoperiod Responsive 1
-PHOR1	plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de
PHOR1	
<i>PHY</i>	gen fitocrom
PHYA, PHYB	proteïna del fitocrom A I B, respectivament
<i>Phy</i>	mutant de fitocrom
- <i>PHYB</i>	plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de
<i>PHYB</i>	
PIP1 (TH53)	proteïna <u>P</u> HOR1 Interacting Protein 1
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
R	llum vermella, màx.=665 nm
RNA	àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut

rRNA	RNA ribosomal
SD	dia curt, 8h llum + 16h fosc
<sup>35</sup> S-Met	Metionina marcada radioactivament amb sofre 35
SD-L-T	medi mínim sense Leucina i sense triptòfan
SD-L	medi mínim sense Leucina
SD-T	medi mínim sense Triptòfan
SD-L-T-A-H	medi mínim sense Leucina, sense Triptòfan, sense Adenina i sense Histidina
SDS	dodecil sulfat de sodi
<i>StGA20ox</i>	GA 20-oxidasa de <i>S. tuberosum</i>
<i>StGA2ox</i>	GA 2-oxidasa de <i>S. tuberosum</i>
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N',-tetrametiletildiamida
TH	“Two Hybrid”
Th53	clon parcial de tomàquet aïllat per <u>T</u> wo <u>h</u> ybrid
TH53	proteïna clon parcial 53 de tomàquet aïllat per <u>T</u> wo <u>h</u> ybrid
TNT	traducció i transcripció <i>in vitro</i>
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	unitats
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indotil- -D-galactopiranòsid

## **1. INTRODUCCIÓ**

---

# INTRODUCCIÓ

---

## 1. La tuberització.

La tuberització és un procés de desenvolupament característic d'algunes plantes, entre elles la patatera (*Solanum tuberosum* L.), les quals en determinades condicions formen tubercles a partir de tiges subterrànies anomenades estolons. Aquests tubercles tenen una doble funció: d'una banda actuen com a òrgan de reserva i de l'altra serveixen com a sistema de propagació vegetativa de la planta.

En condicions no inductores per a la tuberització, els estolons tendeixen a créixer cap a dalt emergint del terra per formar un nou brot. En condicions inductores però, la zona subapical de l'estoló o tija de creixement diageotròpic, comença a engruixir-se per a formar el tubercle. Talls longitudinals en els estadis inicials de formació del tubercle mostren que les cèl·lules deixen de dividir-se en direcció longitudinal, canviant el pla de divisió cel·lular a lateral, el que dóna lloc a l'engrossiment de l'estoló (Koda i Okazawa, 1983). Aquest engrossiment ve acompanyat de l'acumulació de gran quantitat de midó i d'una glicoproteïna característica del tubercle anomenada *patatina* (Paiva *et al.*, 1983). Altres proteïnes també abundants en els tubercles són els inhibidors de proteinases, els quals s'ha vist que s'acumulen també en les parts aèries de la planta com a resposta a una ferida o a l'atac per insectes i plagues (Sánchez-Serrano *et al.*, 1986; Keil *et al.*, 1989). Tot i acumular-se en el tubercle, aquestes proteïnes no estarien directament involucrades en el procés de diferenciació del tubercle. La seva funció podria ser de reserva en el cas

de la *patatina* o com a sistema de defensa enfront de l'atac d'insectes, en el cas dels inhibidors de proteïnases (Hendriks *et al.*, 1991).

Els tubercles es formen normalment sota terra, ja que la obscuritat, les temperatures més aviat baixes, i possiblement també la resistència física del sòl són factors que afavoreixen el seu desenvolupament. No obstant, en determinades condicions qualsevol brot de la planta pot donar lloc a tubercles aeris, que són molt més petits que els subterranis i contenen clorofil·la (Ewing, 1987). Els tubercles aeris es formen, en general, a partir de brots axil·lars en els nusos de la tija, però poden formar-se fins i tot a partir de les flors (Ewing i Struik, 1992). La formació d'aquests tubercles acostuma a donar-se en condicions inductores molt fortes, o bé quan la planta no pot transportar els fotoassimilats als estolons i tubercles subterranis, degut a malalties o ferida (Jacksón, 1999).

Durant el procés de la tuberització, les parts aèries de la planta també pateixen nombrosos canvis morfològics i fisiològics. Les fulles esdevenen més primes, augmenta l'angle de les fulles respecte a la tija, s'incrementa la senescència foliar i disminueix l'activitat de floració (Steward *et al.*, 1981). Aquests canvis són reflexa d'una sèrie de canvis hortolans complexos que esdevenen a la planta. Durant la inducció de la tuberització es produeixen canvis simultanis en els nivells de diferents hormones, essent incert si el responsable de l'estímul de tuberització és una hormona en concret o el balanç global de diferents hormones. Fins i tot, es qüestiona si l'estímul inductor de la tuberització podria ser de tipus no hormonal i com a conseqüència del procés d'inducció, s'estableix un canvi en el balanç hormonal associat a la pròpia formació dels tubercles (Prat *et al.*, 1990)

Els mecanismes moleculars implicats en el procés d'inducció i inici de la formació del tubercle, com veurem, són encara força desconeguts. Degut a això, els estudis que es duen a terme en aquest camp són de gran importància ja que ajudaran a comprendre millor aquest procés, fent possible la seva manipulació a fi d'augmentar el rendiment en tubercles i deslliurar la planta dels requeriments ambientals concrets necessaris per a l'inici d'aquest procés.

### **1.1 Factors ambientals.**

El procés de tuberització es troba fortament influenciat per factors ambientals tal com el fotoperíode (hores de llum i de foscor que la planta rep al dia), la temperatura i els nivells de nitrogen en el sòl. Tot i que aquests tres factors són els que exerceixen un efecte més important sobre la inducció de tubercles, hi ha també d'altres factors abiòtics menys caracteritzats com la salinitat, els nivells d'oxigen i CO<sub>2</sub>, i la disponibilitat d'aigua, que afecten la tuberització. La resposta de la planta a aquests estímuls ambientals depèn, alhora, de factors endògens de la planta, la resposta de tuberització essent molt diferent segons el genotip, l'edat de la planta, i l'estat fisiològic del tubercle mare, el qual ve determinat per les condicions en què s'han crescut i emmagatzemat els tubercles (Ewing, 1987). Així per exemple, els tubercles extremadament vells no desenvolupen patates normals, sinó tan sols petits tubercles adherits als "ulls" del tubercle mare. Els tubercles plantats just després del període de dormància, d'altra banda, donen lloc a plantes que tuberitzen més tard que les plantes desenvolupades a partir de tubercles quelcom més vells (Ewing, 1987).

- **Aportació de nitrogen**

El nivell de nitrogen en el sòl té un paper força important en la formació de tubercles a plantes de patata. Dosis altes de nitrogen en l'adob subministrat a plantes crescudes en terra inhibeixen la tuberització (Sattelmacher i Marschner, 1978) i el mateix efecte s'ha observat en plantes crescudes en cultius hidropònics (Kraus i Marschner, 1982). L'aportació elevada de nitrogen al cultiu hidropònic un cop ja s'ha iniciat la tuberització, per altra banda, inhibeix la formació del tubercle i reverteix el seu creixement cap a estoló.

L'aplicació de nitrogen directament a les fulles s'ha vist que no inhibeix la tuberització. La reducció dels nivells de nitrogen en condicions no inductores, com elevades temperatures i dies llargs (LD), en canvi, no incrementen la formació de tubercles el que demostraria que el nitrogen no està implicat en la pròpia inducció de la tuberització però té un efecte negatiu sobre la formació de tubercles un cop iniciada la tuberització. De moment, no es coneix com és que els alts nivells de nitrogen causen la inhibició de la tuberització, si bé sembla que la retirada de nitrogen en l'adob podria afectar els nivells d'algunes fitohormones, causant la reducció en els nivells de les giberel·lines (GAs) i l'increment en els nivells d'àcid abscísic (ABA) (Krauss, 1985).

- **Temperatura**

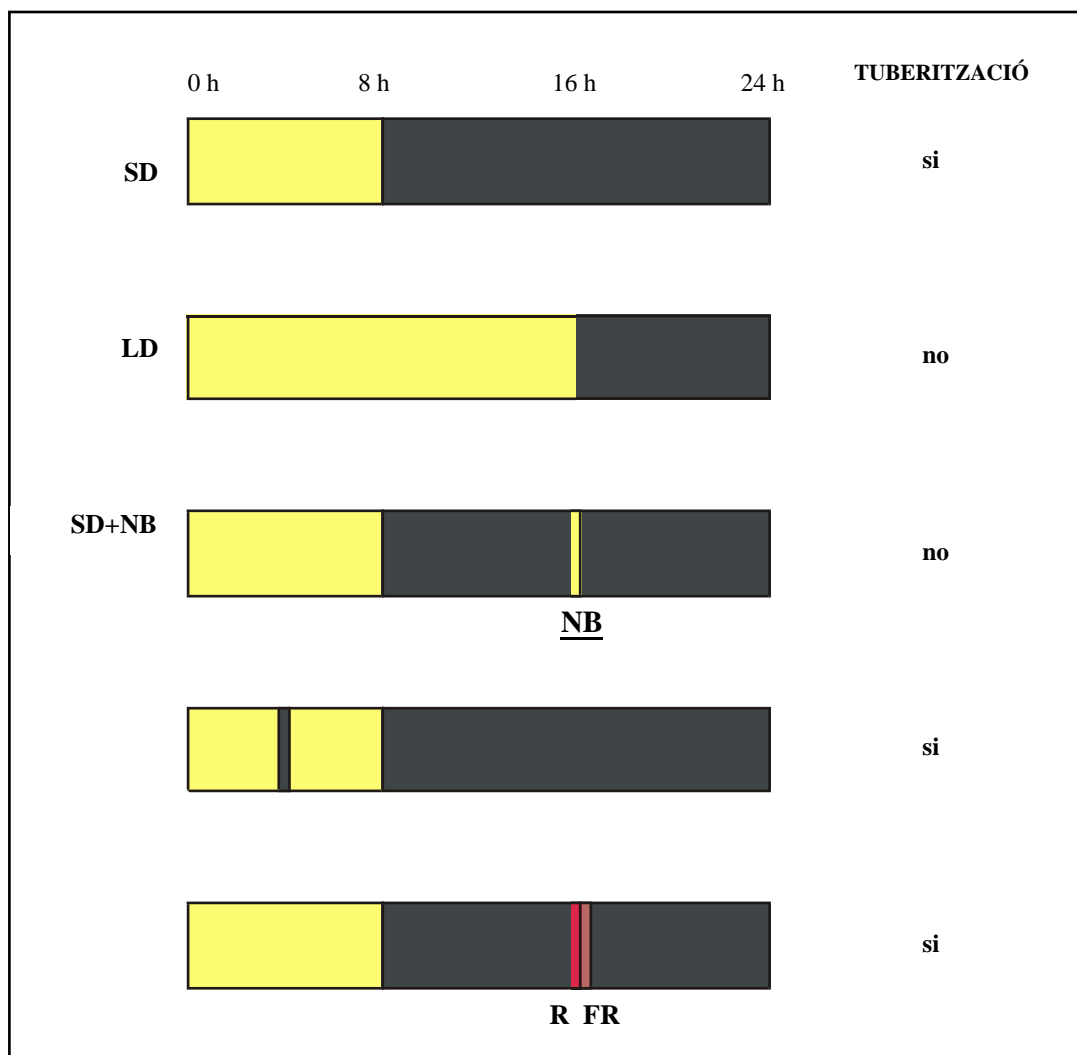
Les temperatures baixes, per sota de 30°C durant el dia i 20°C durant la nit, afavoreixen el procés de tuberització i una major diferència de temperatura entre el sòl i l'atmosfera augmenta el rendiment de tuberització. Per contra, les altes temperatures inhibeixen la formació de tubercles, essent l'efecte major si s'augmenta la temperatura dels brots més que no pas la del sòl (Ewing i Struik, 1992). Igual que s'havia descrit per a l'aportació elevada de nitrogen en l'adob, l'augment de temperatura un cop iniciada la tuberització inhibeix la formació del tubercle i reverteix el seu creixement cap a estoló. L'efecte inhibidor de la temperatura s'atribueix a un augment en els nivells de GAs (Jacksón, 1999).

- **Fotoperíode**

El fotoperíode és el nombre d'hores de llum i de foscor que la planta rep durant el dia, i varia segons la zona geogràfica i l'estació de l'any. En general els dies curts afavoreixen la tuberització mentre que els dies llargs la retarden o depenent del genotip, fins i tot la inhibeixen de manera completa (Snyder i Ewing, 1989). Algunes varietats de patatera originàries dels Andes, com *Solanum demissum* i *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*



mostren un control fotoperiòdic estricte de la tuberització. Aquestes plantes precisen de dies curts (10 o menys hores de llum) per a formar tubercles, i no tuberitzen en dies llargs (Ewing i Struik, 1992). Malgrat que aquestes plantes s'anomenen de dies curts (SDP), la resposta de tuberització ve determinada per la longitud crítica del període de fosc ( veure Figura 1). La interrupció del període de fosc amb 15 min de llum blanca (NB, per “*night break*”) inhibeix la tuberització, mentre que la interrupció del període de llum amb fosc no té cap efecte. S’ha demostrat que les interrupcions del període de fosc amb llum roja (R) són més efectives que no pas les d’altres longituds d’ona. A més a més, aquesta inhibició pot revertir-se si immediatament després de la llum roja es fa un tractament amb llum roja llunyana (FR) (Batutis i Ewing, 1982). Aquest comportament fotoreversible indica que el receptor de llum roja fitocrom, és el responsable de la percepció dels períodes de llum i fosc, i per tant del control fotoperiòdic de la tuberització.



**Figura 1: Control fotoperiòdic de la tuberització en plantes salvatges de patata *Solanum demissum* i *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*.** L'efecte inhibidor dels dies llargs (LD) sobre la tuberització es pot reproduir en dies curts (SD) amb una interrupció de 15 min del període fosc o *night break* (SD+NB). El comportament fotoreversible amb llum roja llunyana (FR) és indicativa que el control del procés de la tuberització està mediat pel receptor de llum roja fitocrom.

## 2. Els fotoreceptors

Els fotoreceptors són receptors que permeten a les plantes captar canvis en la llum solar respecte a intensitat, qualitat i duració, per tal de optimitzar l'absorció fotosintètica dels fotons, i adaptar el seu creixement i desenvolupament a les condicions ambientals. Els fotoreceptors posen en funcionament diferents vies de transducció de senyal que, mitjançant la regulació de l'expressió gènica, produeixen canvis metabòlics i del desenvolupament, adaptant cada etapa del cicle vital de les plantes al tipus de llum que rep en aquell moment. Processos fotomorfogènics típics regulats per llum són, per exemple, la germinació de les llavors, l'allargament de la tija, les respostes de fototropisme, el desenvolupament de les fulles i cloroplastes, l'obertura dels estomes, la síntesi de pigments i la formació de tricomes, i la inducció dels processos de floració i tuberització (Kendrick i Kronenberg, 1994; Millar *et al.*, 1994; Quail, 1994a; Smith, 1995; Chory *et al.*, 1996; McNellis i Deng, 1995; Chory, 1997). Aquests processos de fotomorfogènesi estan mediat per almenys tres tipus diferents de fotoreceptors, de funcions parcialment redundants, que detecten diferents qualitats de llum en un ampli rang espectral: els fitocroms o receptors de llum roja (Quail *et al.* 1995), els criptocroms o fotoreceptors de llum blava/UV-A (Young *et al.*, 1992; Ahmad i Cashmore, 1996) i els

---

fotoreceptors de llum UV-B (Beggs i Wellman, 1995; Christie i Jenkins, 1996; Kim *et al.*, 1998).

- **Fotoreceptors de llum roja o fitocroms:** Són els fotoreceptors responsables de la detecció de llum roja (R, de 600 a 700 nm) i roja llunyana (FR, de 700 a 800 nm), encara que també detecten la llum blava i l'ultravioleta. Són els fotoreceptors més ben caracteritzats. En plantes superiors i inferiors s'han identificat diferents tipus de fitocroms, tant a les angiospermes, com a moltes, algues i falgueres (Quail, 1994b; Pratt, 1995). A *Arabidopsis* els fitocroms comprenen una família de 5 gens, que s'han anomenat *phyA* a *phyE*. A tomaquera, s'ha identificat també 5 gens: *phyA*, *B1*, *B2*, *E* i *phyF*, essent aquest darrer l'homòleg de *phyC* d'*Arabidopsis* (Pratt *et al.*, 1995; Alba *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1995). Diferents membres de la família de fitocrom s'han identificat també en arròs, pèsol i en patatera (en aquesta espècie s'han identificat els gens *phyA*, *B1* i *B2*). S'han caracteritzat nombrosos mutants en aquests gens i s'han clonat els gens que els codifiquen, així com diferents components intermediaris de la ruta de transducció del senyal. A patatera, aquests fotoreceptors estan involucrats en el control fotoperiòdic de la tuberització, inhibint el procés de formació de tubercles en condicions no inductores de dies llargs (LD, veure més endavant).
- **Fotoreceptors de llum blava/UV-A:** Absorbeixen llum blava (B, des de 390 a 500 nm) i ultravioleta-A (UV-A, 320-390 nm). A *Arabidopsis* s'han aïllat tres gens que codifiquen receptors de llum blava: el criptocrom CRY1, el criptocrom CRY2/PHH1, i el fotoreceptor per al fototropisme NPH1 (Ahmad i Cashmore, 1993; 1996; Hoffman *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996; Huala *et al.*, 1997). L'anàlisi de mutants nuls i la de mutants que sobre-expressen aquests gens, ha permès determinar moltes de les funcions dels criptocroms. Si bé s'ha observat que alguns d'aquests receptors tenen funcions solapants, s'ha vist que també tenen funcions específiques, com el control fotoperiòdic de la floració per part de CRY2 o la sincronització dels ritmes circadians i fototropisme a càrrec de CRY1

(Batschauer, 1998; Guo *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 1998). A *Arabidopsis* CRY1 té un paper important en la de-etiolació de les plàntules conjuntament amb PHYA i PHYB ja que el mutants *hy4* deficients en CRY1 presenten un fenotip etiolat. Les plantes que sobre-expressen CRY1, d'altre banda, presenten una reducció en la longitud de l'hipocòtil i un increment en la producció d'antocianines, el que confirma una funció de CRY1 en el procés de de-etiolació (Lin, 2000; Lin *et al.*, 1996). S'ha observat que CRY2 té també un paper en el procés de de-etiolació, inhibint el creixement de l'hipocòtil en resposta a llum blava de molt baixa intensitat. Així doncs, CRY1 predominaria en respostes a altes intensitats de llum, mentre que CRY2 seria funcional només a baixes intensitats de llum (Ahmad *et al.*, 1998b; Lin *et al.*, 1998; Cashmore *et al.*, 1999). D'altre banda, s'ha vist *in vitro* que CRY1 és substrat per l'activitat quinasa de fitocrom A, i que *in vivo* aquest fotoreceptor es fosforila depenent de llum roja (Ahmad *et al.*, 1998a). El criptocrom CRY1 es una proteïna que guarda relació estructural amb les fotoliasas, amb un cromòfor de tipus FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) covalentment unit a l'extrem N-terminal de la proteïna, encara que no s'ha demostrat una activitat liasa (Lin, 2000). La proteïna CRY2 té un extrem N-terminal idèntic a CRY1 però presenta diferències estructurals en el domini C-terminal. Aquestes diferències podrien determinar la menor estabilitat d'aquest fotoreceptor, doncs s'ha vist que és menys estable que CRY1, essent ràpidament degradat en presència de llum blava. Els criptocroms són presents en totes les espècies vegetals, des de les moltes, a les algues, i falgueres i s'han identificat homòlegs d'aquests receptors a *Drosophila*, a mamífers i a humans. Aquests homòlegs animals estan implicats en el funcionament del rellotge circadià. El tercer fotoreceptor de llum blava, NPH1 intervé en la resposta de fototropisme, de manera independent dels fitocroms i de CRY1. El gen *nph1* codifica una proteïna de 120 KDa, associada a la membrana plasmàtica. Aquesta proteïna uneix FMN (flavin mononucleotide) i presenta dos dominis LOV (Light Oxygen and Voltage) al seu extrem N-terminal. A l'extrem C-terminal presenta un domini serin-treoninquinasa, i s'ha vist que s'autofosforila en presència de llum blava (Christie *et al.*,

1998). Altres respostes mediades per llum blava, tals com l'obertura dels estomes, estan regulades per un o més fotoreceptors encara no identificats (Lin, 2000).

- **Fotoreceptors de llum UV-B:** Absorbeixen la llum ultraviolada B (UV-B, entre 280 i 320 nm). Són els menys coneguts, coneixent-se també poc sobre les vies de transducció de senyal que estan implicades en les respostes fotomorfogèniques mediades per aquests receptors. La llum d'elevada energia en aquest rang de l'espectre causa danys al DNA i a les proteïnes, així com també la peroxidació de lípids i l'oxidació de pigments (Jordan, 1995). D'altra banda, la llum UV-B de baixa intensitat es coneix que propicia diferents tipus de respostes fotomorfogèniques i d'adaptació (Tevini i Teramura, 1989), tals com la inhibició del creixement de l'hipocòtil (Ballaré *et al.*, 1991; 1995; Lercari *et al.*, 1990), el corbament dels cotiledons (Wilsón i Greenberg, 1993), i la ràpida inducció d'una sèrie de gens, entre ells els que intervenen en la síntesis de flavonoids i fenilpropanoids, que actuen com a protectors de la radiació solar ultraviolada (Chappell i Hahlbrock, 1984; Kubasek *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993). A *Arabidopsis* s'ha observat que la inducció del gen de la chalcona sintasa (*CHS*) per UV-B i UV-A es mediada per diferents vies de transducció del senyal (Fuglevand *et al.*, 1996; Christie i Jenkins, 1996). D'altra banda, en mesurar la inhibició de l'allargament de l'hipocòtil induïda per UV-B de baixa intensitat a plantes d'*Arabidopsis* salvatges (wt) o mutants per altres fotoreceptors, s'observà que mentre que la resposta era la mateixa a les plantes wt que als mutants senzills *phyA*, *phyB*, i *cry1*, al doble mutant *phyAphyB* la resposta fotomorfogènica estava molt reduïda. Això indicaria que la resposta a llum UV-B requereix d'un dels fitocroms PHYA o PHYB, i que en aquesta zona de l'espectre aquests tenen una funció redundat. La presència de CRY1, en canvi, no seria necessària i cal encara veure el paper de CRY2 en aquesta resposta fotomorfogènica

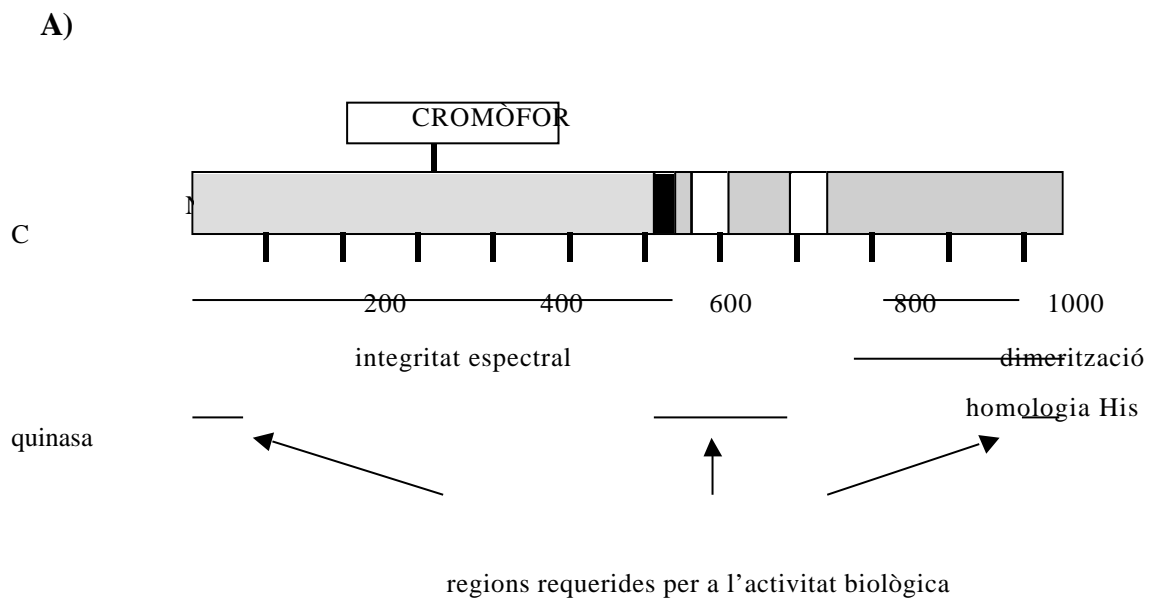
induïda (Kim *et al.*, 1998). Els receptors i vies de transducció del senyal induïdes per UV-B no han estat de moment identificats.

### **3. Els fitocroms.**

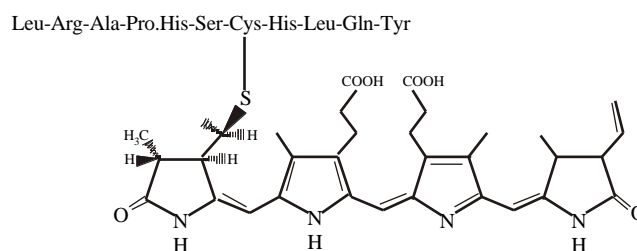
#### **3.1. Estructura i activitat biològica.**

Els fitocroms són cromoproteïnes solubles d'uns 125 KDa que presenten dos dominis estructurals independents units per una regió sensible a proteases (Quail *et al.*, 1995): un domini amino-terminal molt conservat d'aproximadament 600 aminoàcids que uneix un cromòfor tetrapirrol lineal o fitocromobilina i que conté l'activitat fotosensora, i un domini C-terminal de 550 amino àcids, menys conservat a on resideix l'activitat transmissora del senyal de la llum (Boylan *et al.*, 1994; Wagner i Quail, 1996b) (Figura 2). En el PHYA s'ha delimitat que la regió de 40 KDa flanquejant a la Cys322 és suficient per a la unió del cromòfor i la fotoreversibilitat (Cherry *et al.*, 1993; Gartner *et al.*, 1996). Estudis de sobre-expressió del domini amino terminal dels fitocroms en plantes transgèniques d'*Arabidopsis* han demostrat que aquest domini per si sol no presenten activitat biològica, i per tant, que és el domini carboxi terminal, el responsable de transmetre l'estímul als demés components intermediaris de la ruta de transducció. Recentment s'ha identificat un domini PAS a la regió C-terminal dels fitocroms, el qual s'ha vist que és essencial per a la interacció d'aquests receptors amb altres proteïnes com el factor de transcripció PIF3 (Tailor and Zhulin, 1999). Anàlisis bioquímiques i moleculars, conjuntament amb l'obtenció de plantes transgèniques que sobre-expressaven diferents dominis de la proteïna o l'anàlisi de mutants en aquests gens, han permès d'identificar quines regions i aminoàcids són importants per a l'activitat fotosensora o per a l'activitat reguladora de la transducció del senyal (Quail, 1997a, Chory, 1997). Aquests estudis han demostrat que els determinants necessaris per a la transmissió del senyal de la llum es troben tant en el domini amino com carboxi terminal de la proteïna (Cherry *et al.*, 1992; Boylan *et al.*, 1994; Emmler *et al.*, 1995). Alhora s'ha

observat que el domini carboxi terminal d'aquests fotoreceptors és bescanviable entre PHYA i PHYB (Wagner *et al.*, 1996a) i, per tant, que el mecanisme molecular d'acció és possiblement idèntic per a ambdós fitocroms (Quail *et al.*, 1995). Per altre banda, un 76% de les mutacions puntuals en la proteïna PHYA (12 de 17) i la totalitat de les mutacions en la proteïna PHYB (4 en total) que mantenen la funció fotosensora però que són defectius en la funció reguladora, presenten aquestes mutacions en una zona concreta d'uns 160 amino àcids, situada en el domini carboxi terminal de la proteïna (Quail *et al.*, 1995). Aquestes mutacions posen en evidència quin són els aminoàcids essencials per a la comunicació efectiva entre el procés de percepció del senyal de la llum i l'activació dels intermediaris de transducció del senyal, aquesta zona essent possiblement part del centre actiu del fotoreceptor.



B)



C)

C C

**Figura 2: Estructura del fitocrom (adaptat de Chory, 1997).**

**A:** Estructura típica del fitocrom. Se senyalen les regions determinants per a l'activitat fotosensora i biològica. La numeració està basada en el PHYB d'avena. La zona en gris correspon al domini N-terminal implicat en la funció fotosensora, la ratllada correspon al domini C-terminal, implicat en la transmissió del senyal lluminós, i la zona negra a la regió d'unió (adaptat de Vierstra, 1993).

**B:** Estructura del tetrapirrol lineal o cromòfor unit a l'apoproteïna a través d'un enllaç tioèter amb la cisteïna en posició 322 al PHYA d'avena.

**C:** Estructura del homodímer fitocrom. S'indiquen les regions N- i C- terminal de cada monòmer, noteu que la zona d'interacció proteïna-proteïna se situa a la regió C-terminal (adaptat de Jones i Edgerton, 1994) (CR=cromòfor).

Una alta freqüència de mutacions puntuals que afecten la funció reguladora de fitocrom es localitzen en una mateixa regió de les proteïnes PHYA i PHYB. Aquest fet estaria d'acord amb els experiments de bescanvi dels domini carboxi terminal d'ambdós receptors, i ha portat a proposar que les respostes diferencials mediatas per aquests dos fitocroms vindrien determinades per la regió fotosensora en el domini amino terminal (Wagner *et al.*, 1996a). Aquesta regió s'activaria sota condicions de llum diferents depenent del tipus de fitocrom, i transmet aquesta activació al domini C-terminal responsable de reconèixer i unir els diferents elements de transducció de senyal. D'aquesta manera, tot i que ambdós



fitocroms tenen mecanismes bioquímics d'acció idèntics, a la vegada poden presentar respostes particulars que vindrien determinades pels elements fotoreceptors en la regió amino terminal de la proteïna. Aquest model és anàleg al que presenten moltes famílies de receptors amb dos dominis, com per exemple la família de receptor-quinases.

La funció quinasa dels fitocroms ha estat molt controvertida. Actualment però, existeix una forta evidència a favor d'una activitat quinasa dels fitocroms, havent-se pogut demostrar que aquestes proteïnes tenen capacitat d'autofosforilar-se i de fosforilar altres substrats, preferentment als residus serina i treonina (Yeh and Lagarias, 1998). Recentment, mitjançant experiments de doble híbrid, s'ha aïllat la proteïna PKS1 (Phytocrome Kinase Substrate 1), la qual interacciona amb els fitocroms a l'igual que ho fan els receptors de llum blava CRY1 i CRY2 (Fankhauser *et al.*, 1999). En experiments *in vitro* s'ha pogut comprovar que aquestes proteïnes són fosforilades per extractes de llevat que expressen de manera heteròloga la proteïna PHYA de civada (Frankhauser *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 1998). Alhora, mitjançant experiments de doble híbrid s'ha aïllat la proteïna PIF3 (Phytocrome Interacting Factor 3) de la que parlarem detingudament més endavant, que interacciona directament tant amb PHYB com amb PHYA (Ni *et al.*, 1998), o la proteïna NDPK2 (Nucleotide DiPhosphate Kinase 2), que interacciona específicament amb el domini C-terminal de PHYA. S'ha vist que la interacció de NDPK2 amb PHYA es dona preferentment amb la forma activa del fotoreceptor, essent el percentatge de interacció del 78% amb la forma  $P_{fr}$  i del 22% amb la forma  $P_r$ . La interacció de NDPK2 amb la forma  $P_{fr}$  del PHYA, d'altre banda incrementa l'activitat de fosforilació d'aquesta quinasa. Així mateix, s'ha caracteritzat un mutant d'*Arabidopsis* que conté una inserció de T-DNA dins del gen (*ndpk2*). Aquest mutant mostra un fenotip semblant al dels mutants *phyA*, mostrant una resposta alterada d'obertura dels cotiledons quan es sotmet a llum FR i una resposta de germinació alterada en llum R, resultat que suggereix que NDPK2 participa en la via de senyalització dels fitocroms a *A. thaliana* (Giltso *et al.*, 1999).

Com ja s'ha esmentat la forma activa del fitocrom és la de homodímer, havent-se identificat dues regions necessàries per a la dimerització, una a prop del centre de la proteïna i una altra a prop de l'extrem carboxi terminal (Chang i Meyerowitz, 1994). Els

fitocroms són proteïnes fotointerconvertibles, i existeixen en dues conformacions,  $P_r$  i  $P_{fr}$ . Se sintetitzen en la forma  $P_r$  (Lagarias i Lagarias, 1989) però per absorció de llum R ( $\lambda_{m\grave{a}x.}$  a 660 nm), s'esdevé una isomerització d'un dels enllaços del cromòfor que produeix canvis en la interacció del cromòfor amb l'entorn polipeptídic, amb els quals el fitocrom passa a la forma  $P_{fr}$ . De la mateixa forma, per absorció de llum FR ( $\lambda_{m\grave{a}x.}$  a 730 nm), la forma  $P_{fr}$  isomeritza a la forma  $P_r$ . Tot i que les dues formes de fitocrom,  $P_r$  i  $P_{fr}$ , presenten diferents rangs d'absorció espectral, aquests se solapen parcialment i això fa que en condicions de llum determinades s'estableixi un fotoequilibri entre les dues formes. Així per exemple, la relació entre  $P_{fr}/P_{tot}$  en llum R és d'un 80%, d'un 3% en llum FR i d'un 40% en llum blava (Batschauer, 1998). La llum blava és doncs força eficient en la transformació de  $P_r$  a  $P_{fr}$ . La forma  $P_{fr}$  és la forma activa del fitocrom, tot i que alguns estudis atribueixen també algunes respostes a la forma  $P_r$  (Liscum i Hangarter, 1993; McCormac *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1994). A *Arabidopsis*, per exemple, s'ha observat que  $P_r$  pot intervenir com a receptor de llum blava induint la germinació de la llavor (Chory, 1997). També, en condicions d'elevada intensitat de llum FR, la forma  $P_r$  de fitocrom media la inhibició de l'elongació de l'hipocotil de la planta. Aquesta resposta es revertida per llum R, el que indica és la forma  $P_r$  la forma activa responsable d'aquesta inhibició (Shinomura *et al.*, 2000).

Estudis fotobiològics clàssics varen classificar els fitocroms en dos grups, els de tipus I o inestables a la llum i els de tipus II, estables a la llum. En plantes crescudes en la foscor, el fitocrom de tipus I s'acumula a nivells molt més elevats que el fitocrom de tipus II, essent la forma de fitocrom majoritària en aquestes plantes. Quan les plantes es transfereixen a la llum, la forma  $P_{fr}$  d'aquest fitocrom és degradada ràpidament, essent el fitocrom de tipus II la forma de fitocrom més abundant en aquestes condicions. S'ha demostrat que la proteïna codificada per *phyA* es un fitocrom de tipus I, mentre que els gens *phyB-E* correspondrien a fitocroms de tipus II (Somers *et al.*, 1991; Clack *et al.*, 1994). La degradació de la forma  $P_{fr}$  del fitocrom de tipus I es precedida pel segrest de la proteïna en certes àrees (SAPs), les quals es pensa que estan implicades en la unió de la proteïna fotoreceptora a ubiquitina per a la seva degradació, ja que les SAPs s'immunodetecten amb anticossos contra ubiquitina (Vierstra, 1994). Alhora, s'ha vist

que la transcripció de *phyA* està negativament regulada per llum i per tant, la funció del fitocrom de tipus I, *phyA*, seria molt més important en el procés inicial de de-etiolació, mentre que els fitocroms de tipus II, *phyB-E*, tindrien un paper predominant en plantes adultes (Quail *et al.*, 1995; Smith, 1995). Les formes  $P_{fr}$  de tots els fitocroms, d'altre banda, poden ser fotoconvertides a la forma  $P_r$  no només per llum FR, sinó també per la foscor (Briggs i Rice, 1972; Mancinelli, 1994). Això permet a la planta distingir entre un pols curt de llum i un procés d'il·luminació continuat, ja que en absència de llum la proporció de la forma  $P_{fr}$  decau i, per tant, decau també el senyal generat per aquesta (Batschauer, 1998).

### **3.2. Processos de desenvolupament de la planta regulats pels fitocroms:**

Els fitocroms són els responsables del control per llum de molts processos del desenvolupament en el cicle vital de la planta, tenint un paper prevalent en la germinació de les llavors, la de-etiolació de les plàntules, en la floració, tuberització i el “*shade avoidance*” o “fugit de l'ombra”, estratègia que fan servir les plantes quan es creixen en una alta densitat de població, les quals en captar l'ombra produïda per les plantes veïnes, extenen el seu creixement cap a les millors condicions de llum, competint així amb les altres plantes (Smith, 1995; Ballare *et al.*, 1990). Els fitocroms, especialment PHYA i PHYB, són responsables de la regulació de moltes d'aquestes respostes fisiològiques, degut a que integren el senyal lumínic i posen en funcionament diferents vies de transducció del senyal, bé a través de la interacció directa amb factors de transcripció, bé mitjançant la transmissió d'aquesta informació al rellotge biològic o sincronitzant el ritme circadià. Aquests fotoreceptors tenen alhora una funció important en la regulació del fototropisme i també en la regulació dels nivells endògens de diferents hormones en la planta i en la sensibilitat de la planta a aquestes hormones. Així per exemple hi ha multitud de dades que demostren una regulació de la biosíntesi de les giberel·lines en moltes espècies, per PHYA i PHYB (Chory i Li, 1997; Kamiya i García-Martínez, 1999).

Les funcions dels fitocroms es divideixen en tres categories depenent de la quantitat de llum requerida per a iniciar la resposta. La primera d'aquestes categories es defineix com “*Very low fluence response*” (VLFR). Aquesta resposta es induïda per llum de molt baixa intensitat i no és reversible per aplicació de llum FR. El fitocrom implicat en aquesta resposta és PHYA. La segona categoria és la “*Low fluence response*” (LFR), la qual és activada per quantitats moderades de llum R i és revertida o inhibida per llum FR, essent en general mediada per PHYB. L'última categoria és l'anomenada “*High irradiance response*” (HIR), la qual requereix una exposició prolongada a l'irradiació de la llum. Aquesta resposta pot ser fotoreversible i segons el procés esta mediada per PHYA, PHYB i els criptocroms (Smith, 1995).

Tenint en compte aquestes diferents respostes fisiològiques regulades per llum i la diferència en l'estabilitat de les molècules de fitocrom, es considerà la possibilitat que cadascun dels diferents fitocroms fos responsable de mediar un diferent tipus de resposta. No obstant, els estudis amb mutants deficientes en PHYA o PHYB han demostrat que, en molts casos, aquests dos fitocroms fan funcions idèntiques i que la resposta es mediada per un o un altre fitocrom segons les condicions de llum. Així estudis de l'elongació de l'hipocòtil a *Arabidopsis* han mostrat que PHYA, fotolàbil, és el responsable de mediar la resposta a elevades radiacions amb llum FR (FR-HIR), mentre que PHYB, estable a la llum, mediarà la resposta de les plantes a radiacions continues amb llum R (McCormac *et al.*, 1993; Park i Quail, 1993). D'altre banda, l'estudi de mutants alterats en els gens fitocrom, ha permès en alguns casos d'atribuir funcions independents als diferents tipus de fitocrom. Així per exemple, s'ha vist que tots dos tipus de fitocrom tenen una funció important en la germinació de les llavors i en la floració, però que els dos tenen funcions fotosensores diferents (Reed *et al.*, 1994; Whitelam i Harberd, 1994). Els mutants *phyA* d'*Arabidopsis*, per altre banda, mostren un fenotip alterat degut a que són incapaços d'inhibir l'elongació de l'hipocòtil, obrir els cotilèdons o activar la síntesi d'antiocianines quan s'irradien amb llum FR, però mostren un fenotip salvatge en llum R (Whitelam *et al.*, 1998). Els mutants *phyB*, per altre banda, presenten una resposta de de-etiolació alterada semblant als mutants *phyA* quan s'irradien amb llum R. Aquestos mutants no responen a cap intensitat de llum R, però responen a llum FR. A *Arabidopsis* s'ha vist que PHYB promou la germinació de les

llavors en resposta a la llum R i que aquest efecte pot ser inhibit mitjançant polsos de llum FR (Shinomura *et al.*, 1996). Les llavors mutants *phyB*, en canvi, no presenten aquesta reversibilitat R-FR. Els mutants *lh* de cogombre són també insensibles a polsos de llum FR (Adamse *et al.*, 1988) i presenten una reacció de “*shade avoidance*” constitutiva (Lopez-Juez *et al.*, 1990 i 1992), el que suggereix que PHYB juga un paper principal en aquesta resposta. S'han aïllat mutacions en el gen *phyB* en un nombre elevat d'espècies, que inclouen el mutant *hy3* d'*Arabidopsis* (Koorneef *et al.*, 1980; Reed *et al.*, 1993; Somersn *et al.*, 1991), i els mutants *lh* de cogombre o *ein* de *Brassica rapa* (Devlin *et al.*, 1992; López-Juez *et al.*, 1992). Aquests mutant s'ha vist que presenten un fenotip comú caracteritzat per una reducció en els nivells de clorofil·la, una elongació de la tija, un increment en la dominància apical i una floració temprana. Respecte de la floració, s'ha vist que el mutant *phyA* de pèsol, presenta una alteració en el control fotoperiòdic de la floració (Weller *et al.*, 1997).

La sobre-expressió a tabac de les proteïnes PHYA i PHYB d'arròs fusionades a la GFP (Green Fluorescent Protein) va mostrar que aquestes proteïnes tenien una localització subcel·lular citoplasmàtica en plantes crescudes en foscor, i que en el cas de la fusió PHYB:GFP, la proteïna es translocava al nucli en resposta a irradiacions continues o polsos de llum R. Aquesta translocació es revertida si immediatament després de la llum R es dona un pols de llum FR, demostrant que la localització nucli/citoplasma de PHYB està relacionada amb la fotoconversió de la proteïna. Aquesta observació ve recolzada pel fet que els mutants inactius del PHYB fusionats a la GFP queden retinguts al citoplasma, en qualsevol condició de llum. La translocació de la proteïna PHYA:GFP al nucli, per altre part, no només es dona com a resposta a polsos de llum R sinó també a polsos de llum FR, i compren respostes de tipus VLFR i HIR, al contrari que la distribució nucli/citoplasma de PHYB que comprèn respostes de tipus LFR. Així doncs, la translocació dels fitocroms PHYA i PHYB al nucli es dona com a resposta a diferents qualitats de llum (Reed, 1999), el que suggereix que en ambdós processos es troben implicats mecanismes moleculars diferents (Jacksón *et al.*, 1999).

- **Els fitocroms i la resposta fotoperiòdica:**

PHYA i PHYB estan involucrats en el control fotoperiòdic de la floració i la tuberització. En espècies en que la floració és estrictament dependent de dies llargs (LDs) com pèsol, civada o Arabidopsis, s'ha vist que les mutacions en els gens *phyA* o *phyB* tenen un efecte notable sobre el temps de floració. Així per exemple, el mutant deficient en PHYA *fun1* de pèsol té una resposta reduïda de floració en condicions de dia llarg (LD, Weller *et al.*, 1997) mentre que el mutant BMDR1 de civada, degut a una mutació que fa que PHYB sigui fotolàbil, és insensible al fotoperíode (Hanumappa *et al.*, 1999). Els mutants d'Arabidopsis deficients en PHYA mostren una floració tardana, en tant que les plantes que sobre-exprimen PHYA floreixen abans que les plantes salvatges en condicions de LD (Johnsón *et al.*, 1994; Bagnall *et al.*, 1995). Els mutants *phyB* d'Arabidopsis, per altre banda, floreixen molt abans tant en condicions de SD com LD, el que indicaria que en Arabidopsis PHYA promou la floració mentre que PHYB la inhibeix. En espècies fotoperiòdiques estrictament dependents de dies curts (SDs) com sorgo i arròs s'ha demostrat un paper prevalent de PHYB en el control fotoperiòdic de la floració. Així doncs, el mutant  $ma_3^R$  de *Sorghum bicolor*, degut a una mutació en el gen *phyB*, floreix en qualsevol condició de fotoperíode a diferència de les plantes salvatges que únicament floreixen en condicions de SD (Childs *et al.*, 1995; 1997). El mutant *se5* d'arròs (*photoperiodic sensitivity*), deficient en el cromòfor de fitocrom, d'altre banda, floreix independentment del fotoperíode (Izawa *et al.*, 2000).

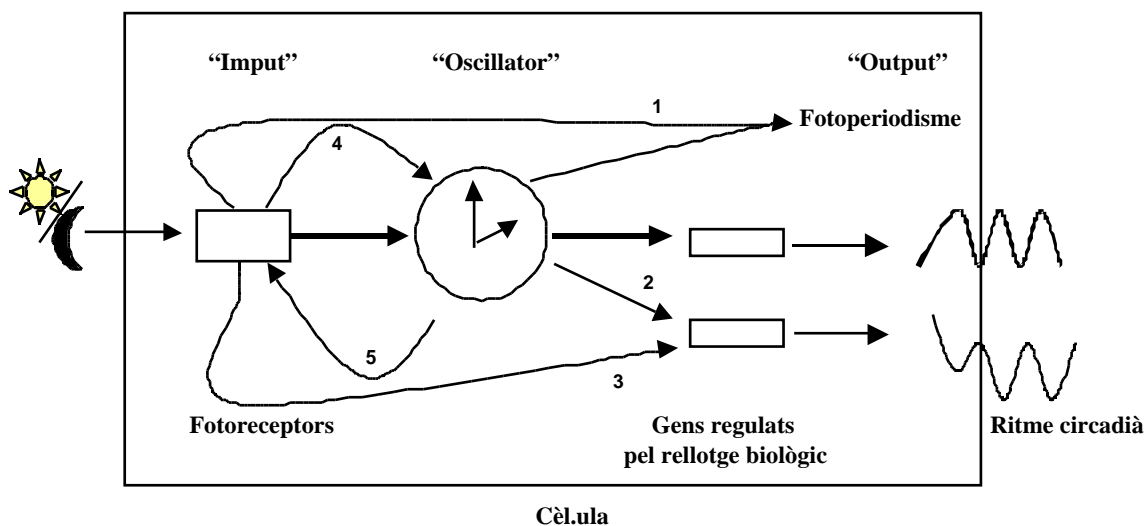
Respecte a la tuberització, s'ha vist que les plantes de patatera *S. tuberosum* ssp *andigena* estrictament fotoperiòdiques per a la tuberització portadores d'una construcció antisentit pel cDNA *phyB*, perden el control fotoperiòdic de la tuberització i formen tubèrculs en qualsevol condició de llum a diferència de les plantes salvatges que només tuberitzen en condicions de SD (Jackson i Prat, 1996). Per altre banda, PHYA està també involucrat en la detecció del fotoperíode i sincronització del ritme circadià, retardant el procés de tuberització en condicions no inductores de dies llargs LD (Yanovsky *et al.*, 2000).

- **Els fitocroms i el rellotge circadià:**

Els fitocroms estan involucrats en la transmissió d'informació al rellotge biològic per tal de sincronitzar els processos biològics que presenten un ritme circadià (oscil·lació biològica amb un període de 24 hores) endogen amb les condicions externes de fotoperíode (McClung, 2000). Processos típics regulats per aquest ritme endogen són per exemple, el moviment de les fulles i l'obertura dels estomes, a fi de maximitzar l'absorció de llum i activar l'expressió dels gens fotosintètics de manera que coincideixi amb el període de llum i optimitzar l'intercanvi de gasos per a una eficient assimilació fotosintètica. El ritme circadià està també involucrat en molts altres processos com el de floració i tuberització, en que la planta utilitza la informació que rep del rellotge biològic i dels cicles continus de llum i foscor per tal de conèixer l'època de l'any en que es troba i posar en marxa aquests processos de desenvolupament únicament si les condicions exògenes són favorables (a la primavera-estiu). D'acord amb Kondo i Ishiura (1999), el rellotge circadià estaria comprès per tres components diferents: l'"input", l'"oscillator" i l'"output". L'*input* seria el responsable de mesurar el temps fotoperiòdic i de transmetre el senyal lumínic a l'*oscillator* per tal de reajustar-lo. L'*oscillator* funcionaria en les cèl·lules individuals i seria responsable de generar el propi ritme circadià alhora que controlaria el *output* que en últim terme seria el que generaria un ritme circadià donat (Figura 3). Estudis basats en l'anàlisi de l'expressió del gen *cab2* (*Chlorophyll II a/b binding protein*) han demostrat que els fitocroms i el rellotge circadià tenen efectes complementaris sobre l'expressió d'aquest gen. Aquests estudis han posat en evidència que l'acció dels fitocroms és important per a un ajustament fi de les respostes controlades pel ritme circadià als canvis graduals de qualitat e intensitat de llum que es d'esperar que s'esdevinguin al llarg del dia (Millar i Kay, 1997; Lumsden i Millar, 1998). L'anàlisi de les variacions en els nivells d'expressió del promotor *cab2* fusionat a un

gen reportador, que ocorren en resposta a diferents qualitats de llum o en diferents mutants, ha permès de determinar en part les funcions individuals de cada fotoreceptor en aquest procés. Utilitzant aquesta estratègia s'ha pogut veure que PHYA conjuntament amb CRY1 mediarà la resposta a baixes intensitats de llum FR i blava, mentre que PHYB actuarà com a mediador de les respostes a elevades intensitats de llum R (Somers *et al.*, 1998). Aquests estudis també suggeriren que CRY2 podria mediar les respostes a molt baixes intensitats de llum blava.

Per altre banda, la homologia dels criptocroms de plantes amb les proteïnes CRY1 i CRY2 de ratolí indiquen que aquestes proteïnes tindrien una funció reguladora important en el manteniment del ritme circadià (van der Horst *et al.*, 1999). Així mateix, l'aïllament recent d'alguns dels gens que participarien en l'establiment del ritme circadià, ha posat en evidència que les proteïnes codificades per aquests gens tenen alguns dominis estructurals en comú amb els fotoreceptors. S'ha vist, per exemple, que aquests gens contenen un domini PAS característic, que es troba també als fitocroms. Variants degeneratives d'aquest motiu tals com el domini LOV, s'ha observat que estan també presents a la proteïna NPH1 (Taylor and Zhulin, 1999). Pel últim, s'ha vist que tant els nivells de mRNA com els nivells d'acumulació de la proteïna PHYB, mostren una oscil·lació circadiana similar a la observada per a moltes proteïnes amb una funció reguladora del ritme circadià. En conseqüència, aquest fotoreceptor podria estar també actuant com a "output" en el ritme circadià (Bognar *et al.*, 1999).





**Figura 3. Model bàsic del sistema circadià a les cèl·lules de la planta.** El sistema circadià està compost pel “input”, el “oscillator” i el “output”. El “oscillator” o rellotge biològic funciona en les cèl·lules individuals generant les oscil·lacions circadianes. El rellotge circadià controla el “output”, per conduït el ritme circadià donat. El “input” transmet la senyal lumínica al rellotge per reajustar-lo. En la transmissió d’informació al rellotge biològic estan involucrats el PHYB, el PHYA i el CRY1. El “oscillator” és, assumidament, independent del ritme circadià donat. S’ha vist que a les cèl·lules de la planta (1) El fotoperiodisme està doblement controlat per la senyal lumínica directament i a través del rellotge biològic. (2) El rellotge biològic controla múltiples “outputs”. (3) Existeix un control dual del “output” per la senyal lumínica i el rellotge biològic. (4) El rellotge biològic està regulat per la senyal lumínica. I a la vegada (5) el rellotge biològic modula la sensibilitat a les condicions de llum. (Kondo i Ishiura, 1999).

### **Gens relacionats amb el rellotge circadià:**

La recent identificació de mutants d’*Arabidopsis* que mostraven una alteració en el moviment circadià de les fulles o en el patró rítmic d’expressió del gen *cab2* ha permès d’aïllar i caracteritzar algun dels gens amb una funció en el rellotge circadià. Aquests mutants mostren en molts casos també una alteració en el temps de floració, el que ha permès de determinar les funcions del fotoperíode i el rellotge circadià en el control de la resposta fotoperiòdica de floració. L’anàlisi d’aquests mutants ha permès, per exemple, establir que ELF3 (*Early flowering 3*) seria responsable de reprimir la floració en condicions de SD, al mesurar la longitud del dia i transmetre aquest senyal al rellotge biològic (Thomas, 1998; Zagota *et al.*, 1996; Hincks *et al.*, 1997). Aquests estudis, alhora, han suggerit que TOC1 (*Timing of CAB1*) formaria part del rellotge biològic central (Somers *et al.*, 1998), en tant que els factors de transcripció LHY (*Late Elongated Hypocotil*) (Schaffer *et al.*, 1998) i CCA1 (*Circadian Clock Associated 1*) el qual està implicat en la regulació de l’expressió del gen *cab2* (Wang i Tobin, 1998), s’ha proposat que tindrien una funció reguladora del ritme circadià, regulant negativament l’expressió de GI (*Gigantea*) (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Els estudis fets amb GI, han mostrat que l’expressió d’aquest gen segueix un patró rítmic que està alterat als mutants *elf3*, *cca1-ox* i *lhy* (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). La mutació *gi*, per altre part, redueix l’expressió d’alguns dels gens relacionats amb el rellotge biològic, entre ells CCA1 i LHY (Fowler *et al.*, 1999). Recentment s’han aïllat dos nous gens d’*Arabidopsis* anomenats ZTL (*ZEITLUPE*) (Somers *et al.*, 2000) i FKF1

(Nelson et al., 2000), mitjançant el criatge de mutants que presentaven una alteració en la regulació gènica via el rellotge circadià o el temps de floració. Aquests mutants retarden la floració únicament en condicions de SD i mostren un patró d'expressió alterat del promotor *cab2* fusionat al gen de la luciferasa. Les proteïnes ZTL i FKF1 presenten tres dominis característics: un domini LOV, un domini F-box i sis motius repetits *kelch*. El domini LOV és una variant del domini PAS, un domini d'interacció proteïna-proteïna identificat als fitocroms i en moltes proteïnes amb una funció reguladora del ritme circadià. El domini F-box està implicat en senyalització de proteïnes per a ser degradades via el sistema de l'ubiquitina (Paton *et al.*, 1998). Aquest domini funciona com a un domini d'interacció proteïna-proteïna capaç d'interaccionar amb el complex "E2-E3" d'ubiquitinació i reclutar així proteïnes específiques per a la seva degradació. El motiu repetitiu *kelch* per altre banda, és també un domini d'interacció proteïna-proteïna, sobre el que es parlarà detingudament més endavant. L'anàlisi de seqüència de ZTL i FKF1 suggereix que aquestes proteïnes estarien involucrades en la senyalització de proteïnes específiques per a la seva degradació, mitjançant una resposta que estaria activada o inhibida per llum. De fet, la degradació específica de proteïnes en resposta a la llum s'ha vist que és un mecanisme força general en els processos fotomorfogènics. Com ja veurem més endavant, s'ha demostrat que el complex COP està també involucrat en la degradació del factor de transcripció HY5 i que aquesta degradació està reprimida per llum (Osterland *et al.*, 2000).

- **Els fitocroms i els hormones vegetals:**

Com veurem detalladament més endavant, els fitocroms controlen alguns processos biològics a través de canvis hormonals en les plantes, essent la regulació de la biosíntesi i el metabolisme de les giberel·lines un bon exemple d'aquest tipus de control (Kamiya i García-Martínez, 1999). A *Arabidopsis* s'ha vist que l'expressió dels gens que codifiquen l'enzim GA3-hidroxilasa (*GA4* i *GA4H*) és activada per la llum R i que aquesta activació és important en el procés de germinació de la llavor. S'ha pogut demostrar que mentre que l'expressió de *GA4H* està regulada pel PHYB, la de *GA4* estaria regulada per un altre fotoreceptor ja que en els mutants *phyB* no hi ha activació del gen *GA4H* però l'expressió de

*GA4* es normal (Yamaguchi *et al.*, 1998). Resultats similars han estat també obtinguts en l'estudi del procés de germinació de les llavors d'enciam, en que s'estudià l'expressió dels gens biosintètics *Ls20ox1*, *Ls20ox2*, *Ls3h1* i *Ls3h2* en resposta a llum R i llum FR (Toyomasu *et al.*, 1998) o en el procés de de-etiolació de les plàntules de pèsol (Damian *et al.*, 2000). A patatera, s'ha demostrat també que PHYB controla l'expressió de l'enzim GA 20-oxidasa. Les plantes de patatera amb nivells reduïts de PHYB presenten un fenotip allargat, amb un contingut menor en clorofil·les, fenotip que s'assembla al de les plantes amb alts nivells de GAs (Jackson *et al.*, 1996). Aquestes plantes presenten uns nivells majors d'expressió del gen biosintètic *StGA20ox1* comparat amb les plantes salvatges, el que demostraria que PHYB està involucrat en el control dels nivells d'expressió d'aquest gen (Jacksón *et al.*, 2000). Nivells endògens de GAs incrementats s'han observat també en els mutants *phyB* de *Sorghum* i *Brassica rapa* (Rood *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1994). D'altre banda, estudis realitzats en els mutants *phyB* de pèsol, cogombre i *Arabidopsis* semblarien indicar que en aquestes plantes la sensibilitat a les GAs està també afectada (Weller *et al.*, 1994; Lopez-Juez *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1997).

#### **4. Vies de transducció del senyal de la llum.**

L'obtenció de mutants fotomorfològics d'*A. thaliana* que presentaven nivells normals de fitocrom actiu ha estat de gran ajut en l'estudi dels elements que funcionen *downstream* en la ruta de senyalització d'aquests fotoreceptors. Aquestes mutacions afecten gens que codifiquen per a intermediaris de la ruta de transducció del senyal dels fitocroms i, per tant, el aïllament d'aquests gens ha permès de caracteritzar diferents components en la via de transducció. (Figura 5).

Els mutants fotomorfològics identificats es poden agrupar en dos grups. Un primer grup que presenta un desenvolupament anormal en foscor, el qual es caracteritza per que les plàntules presenten hipocòtils curts, cotilèdons oberts i expandits, plàstids diferenciats i un patró d'expressió gènica i de diferenciació cel·lular propi del desenvolupament en presència

de llum. Aquest grup inclou els mutants *cop* (“*constitutively photomorphogenic*”), *det* (“*de-etiolated*”), *fus* (“*fusca*”) i *cpd* (“*constitutively photomorphogenic and dwarfism*”) (Castle i Meinke, 1994; Chory *et al.*, 1989; Deng, 1994; Misera *et al.*, 1994). Les proteïnes codificades pels al·lels salvatges d'aquests gens actuen negativament en la cascada de transducció del senyal, reprimint el desenvolupament fotomorfogènic en la foscor. La llum, per altre banda, actuaria desactivant aquesta repressió i posant en marxa el procés de fotomorfogènesi. Estudis dels efectes epistàtics després de creuar varis dels mutants ha permès de situar aquests gens més endavant o en la confluència de les cascades de transducció del senyal de fitocroms i dels fotoreceptors de llum blava. Varis d'aquests loci han estat caracteritzat, entre d'altres *COP1* (Deng *et al.*, 1992), *COP9* (Wei *et al.*, 1994), *FUS6* (Castle i Meinke, 1994), *DET1* (Pepper *et al.*, 1994), *DET2* (Li *et al.*, 1996) i *CPD* (Szekeres *et al.*, 1996).

Els estudis de localització de la proteïna COP1 van demostrar que la localització nuclear d'aquesta proteïna és indispensable per a la seva activitat morfogenètica repressora en condicions de foscor, la llum essent responsable de reprimir la seva activitat al retenir COP1 al citoplasma (Minviluz *et al.*, 2000). S'ha vist que en els mutants *hyl* d'*Arabidopsis*, deficients en la biosíntesi del cromòfor fitocromobilina, i per tant defectius en tots els fitocroms, COP1 es localitza de manera constitutiva al nucli, el que indicaria que els fitocroms controlen l'activitat de COP1 al regular la seva localització subcel·lular (Mark *et al.*, 2000). Resultats més recents demostren que COP1 actuaria al nucli interaccionant amb factors de transcripció activadors de la fotomorfogènesi com HY5, i dirigint la seva degradació pel proteasoma. S'ha vist que la interacció COP1-HY5, es necessària per a la degradació de HY5 i que el complex COP9 signalosoma requereix que COP1 s'acumuli al nucli per a ser estable (Chamovits *et al.*, 1996). La proteïna COP1 presenta un motiu “RING finger” que és el responsable de regular la localització nuclear o citoplasmàtica de la proteïna en resposta a la llum. En presència de llum aquesta regió media la interacció de COP1 amb d'altres proteïnes citoplasmàtiques, excluint la proteïna del nucli (Torii *et al.*, 1998). S'ha demostrat que aquest domini interacciona específicament amb el domini “RING-H2” d'una proteïna citoplasmàtica anomenada CIP8 (*COP1 interacting protein 8*),

la qual s'ha aïllat mitjançant experiments de doble híbrid (Torii *et al.*, 1999). Aquesta s'ha vist que correspon a la subunitat 4 del COP9 signalosoma, essent capaç d'interaccionar amb les proteïnes del complex COP9 signalosoma COP9, FUS6/COP11, FUS5 i JAB1 homòleg (Freilich *et al.*, 1999). S'ha vist que les proteïnes amb un domini RING finger actuen com a lligases d'ubiquitina (“ubiquitin-protein ligases” o E3), les quals funcionen reclutant els enzims conjugadors d'ubiquitina (“ubiquitin-conjugating enzymes” o E2) per a ubiquitinar les proteïnes substracte i dirigir-les cap a la seva degradació (Joazeiro *et al.*, 1999; Lorick *et al.*, 1999). S'ha descrit també una segona proteïna que interacciona amb el domini “coiled-coil” de COP1, situat contigu al domini “RING finger”. Aquesta proteïna s'ha anomenat CIP1 (*COP1 interacting protein 1*) i formaria part o estaria associada amb el citoesquelet. S'ha vist que CIP1 tindria un paper regulador de l'activitat nuclear de COP1, ja que en presència de llum segregaria la proteïna al citoplasma (Matsui *et al.*, 1995). COP1 té un motiu NLS (*Nuclear Localization Signal*) bipartit de i un motiu CLS (*Cytoplasmic Localization Signal*) alhora que un motiu repetitiu WD amb una estructura de -propeller, que funcionaria com a domini d'interacció proteïna-proteïna. Aquest domini media la interacció de COP1 amb la proteïna HY5 i així com amb una altra proteïna nuclear anomenada CIP7 (Ang *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998).

COP9 correspon a la primera subunitat identificada del signalosoma de plantes, i més endavant es trobà que mostrava certa similitud amb la subunitat S8 del signalosoma humà. Posteriorment, es varen identificar FUS6 i FUS5 les quals mostren també similitud amb les subunitats S1 i S7 del signalosoma animal (Chamovits *et al.*, 1995). En l'actualitat és coneixen 11 locis COP/DET/FUS diferents que codifiquen per subunitats o components involucrats en l'assemblatge del complex COP9 signalosoma nuclear (Kwok *et al.*, 1998). Malgrat que COP1 i DET1 no formen part del complex COP9 signalosoma, la localització de COP1 al nucli en condicions de foscor precisa d'un complex COP9 signalosoma funcional, ja que tant la localització nuclear de COP1, com la degradació de HY5 estan alterades en els mutants *cop/det/fus*. Resultats derivats de la clonació de les diferents subunitats i de l'anàlisi bioquímica del complex COP9 signalosoma de coliflor, han mostrat que aquest és un complex multiproteic compost per vuit subunitats molt conservades

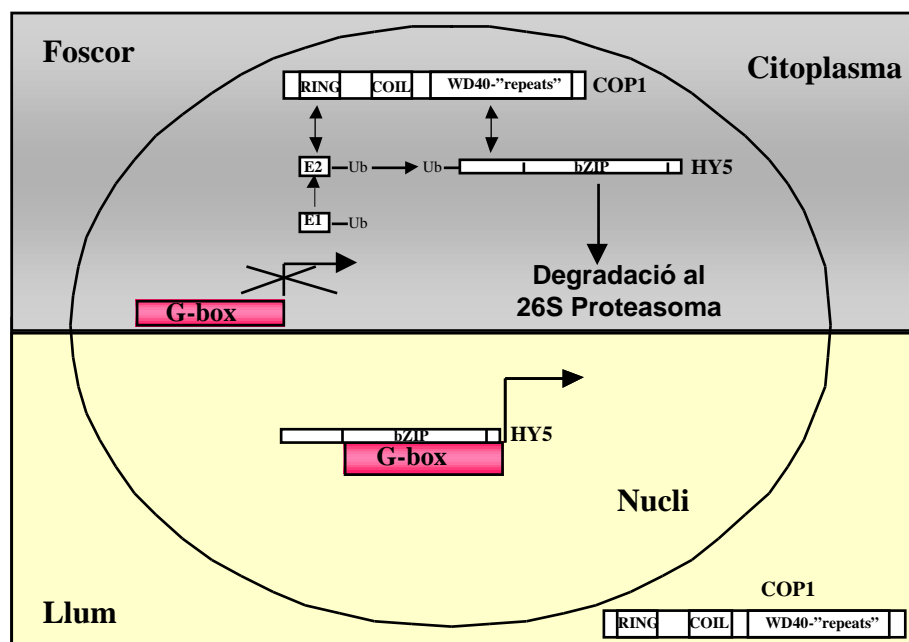
entre plantes i animals. Les vuit subunitats del complexe presenten un domini PCI de 200 amino àcids molt conservat, que és troba també present a les diferents subunitats del 26S proteasoma i a eIF3 (*eukariotic translation Initiation Factor 3*). Les diferents subunitats contenen també un domini NPN conservat de 140 amino àcids, el qual esta també present també a dues de les subunitats del 26S proteasoma i a eIF3.

El complex 26S proteasoma constitueix el mecanisme de degradació proteica més important de la cèl·lula eucariota. La partícula reguladora 19S (RP) del 26S proteasoma humà està formada per diferents subunitats que formen una base i una tapa que fan la funció de reconeixement de la ubiquitina unida als substrats dirigits per a la seva degradació. S'ha vist que cada una de les vuit subunitats del COP9 signalosoma de plantes mostra una elevada similitud amb les subunitats corresponents de la tapa de la partícula reguladora 19S, el que suggereix que el COP9 signalosoma formaria part del complexe proteasoma (Schwechheimer i Deng, 2000). Actualment s'han aïllat moltes altres proteïnes relacionades amb aquest complexe proteic, el que ha permès avançar molt en l'estudi de la funció del COP9 signalosoma com a partícula reguladora del sistema 26S proteasoma vegetal (Karniol i Chamovitz, 2000; Serino *et al.*, 1999; Schwechheimer i Deng, 2000; Kwok *et al.*, 1999; Glickman *et al.*, 1998).

L'aïllament de les mutacions *DET2* i *CPD*, per altre banda, va posar en evidència que aquestes mutacions corresponen a gens que codifiquen enzims implicats en la biosíntesi de brassinoesteroids, el que demostraria que aquestes hormones esteroides participen en la regulació de processos de desenvolupament controlats per llum (Grove *et al.*, 1979; Mandava, 1988).

El segon grup de mutants mostren un desenvolupament normal a la foscor però tenen sensibilitat reduïda a la llum, desenvolupant en presència de llum un hipocòtil llarg com si haguessin crescut en la foscor. A aquest segon grup de mutants hi pertanyen els mutants *hy5* ("long hypocotyl"), *fhy1*, *fhy3*, *spa1*, *psi1*, *pef1*, *pef2*, *pef3*, *red1* i *poc1* (Koorneef *et al.*, 1980; Whitlam *et al.*, 1993; Hoecker *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1997; Halliday *et al.*, 1999).

El mutant *hy5* mostra un bloqueig en la resposta a múltiples longituds d'ona (B, R i FR). El producte gènic HY5 semblaria per tant correspondre a un regulador positiu de la fotomorfogènesi, que actuaria força endavant en la via de transducció del senyal, després de la convergència de les vies dels fitocroms i dels criptocroms (Koornneef *et al.*, 1980; Ang i Deng, 1994; Osterlund *et al.*, 2000). S'ha vist que l'acumulació de HY5 està regulada per COP1 i el complex COP9 signalosoma (Osterlund *et al.*, 2000). Mutants que presenten un increment en l'acumulació de COP1 al nucli, mostren nivells reduïts d'aquest factor de transcripció i presenten un fenotip fortament etiolat (Osterlund *et al.*, 2000). Així per exemple, el mutants *hy1* deficients en la síntesis de fitocromobilina que estan afectats en tots els fitocroms, acumulen COP1 en el nucli i mostren nivells molt reduïts de HY5 (Osterlund *et al.*, 2000). La proteïna HY5 és un factor de transcripció de tipus domini basic-cremallera de leucines, que es localitza de manera constitutiva al nucli. S'ha vist que aquest factor de transcripció interacciona amb el motiu "G-box" que es troba present en molts dels promotors de gens induïts per llum (Ang *et al.*, 1998; Chatopadhyay *et al.*, 1998).



**Figura 4.** La proteïna COP1 regula l'abundància de la proteïna HY5. En condicions de foscor, COP1 es localitza al nucli i media la degradació de la proteïna HY5, mitjançant l'ubiquitinació d'aquesta per marcar-la per a degradar al 26S proteasoma. En condicions de llum COP1 es localitza al citoplasma de la cèl·lula i HY5 pot acumular-se al nucli. HY5 és un factor de transcripció que uneix elements dels promotors G-box de gens induïts per llum. (Osterlund et al., 2000).

El mutant *psi* mostra una resposta augmentada a la llum R i FR, mentre que *pef1* està afectat en les respostes mediades per R i FR. Aquests mutants mostrarien per tant una alteració en la via de senyalització d'ambdós fitocroms PHYA i PHYB. *Fhy1*, *fhy3* i *spa1*, en canvi, tenen selectivament alterada la resposta a llum FR i, per tant, aquestes mutacions corresponen a proteïnes que actuen en la via de transducció del senyal de PHYA. Els mutants *pef2*, *pef3* i *red1* mostren de-etiolació reduïda només en llum R, i els corresponents loci codifiquen per a reguladors positius específics de la via de PHYB. *Poc1*, per altre banda, té de-etiolació augmentada només en condicions de llum R, i per tant participa en la via de senyalització de PHYB. Aquest mutant es va obtenir per crivellatge genètic de mutants obtinguts per inserció d'un T-DNA, el que ha fet possible aïllar el gen corresponent. Així, s'ha vist que aquesta mutació és el resultat d'una inserció en la regió promotora del gen *PIF3*, el qual en un estudi independent utilitzant la tècnica de doble-híbrid a llevat s'havia vist que interacciona de manera específica i fotoreversible amb el domini C-terminal de la forma  $P_{fr}$  activa ambdós PHYB i PHYA, essent la afinitat per PHYA 10 cops més baixa que per PHYB. Aquest resultat es correlaciona amb els resultats obtinguts amb els mutants *pif3*, els quals mostren una reducció en la resposta a llum R continua (percebuda predominantment pel PHYB) vers només una reducció parcial en la resposta a la llum FR continua (percebuda exclusivament pel PHYA), el que indicaria que PIF3 té un paper important en la transducció del senyal de PHYB i un paper menor en la transducció del senyal de PHYA (Ni et al., 1998). PIF3 s'ha identificat com a un potencial



---

factor activador de la transcripció del tipus bàsic hèlix-loop-hèlix (bHLH), de localització nuclear, que interacciona de forma específica amb els motius G-box presents a molts promotors regulats per llum. Mitjançant experiments de doble híbrid es va determinar quines regions eren importants per a la interacció de PIF3 i PHYB. Aquests estudis mostraren que el domini PAS (posicions 120-193 de PIF3) és necessari per a l'interacció amb els fitocroms però que aquest domini per sí sol no és suficient, essent necessària la regió entre els residus 402-484 on es situa el domini bHLH per a una màxima interacció. S'ha vist per altre part que la regió entre els residus 442-524 podria estar involucrada en la discriminació entre les formes  $P_{fr}$  i  $P_r$  de PHYB, doncs deleccions en aquesta regió afavoreixen la interacció de PIF3 amb la forma  $P_r$  de PHYB (Zhu *et al.*, 2000). PIF3 correspondria doncs a la primera proteïna en la ruta de transducció del senyal dels fitocroms. Quan la llum els transforma en la seva forma  $P_{fr}$  activa, aquests es transloquen al nucli i allà interaccionen amb PIF3 activant la transcripció gènica (Ni *et al.*, 1999).

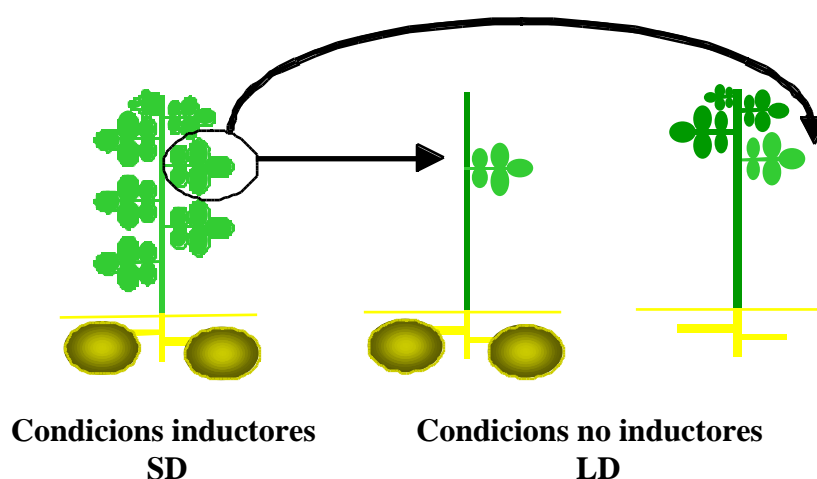
## INTRODUCCIÓ

efecte	mutant	proteïna	foscor	FRe	Rc	Referència
w	w1	W1				
no sensible a FRe	<i>phyA</i>	PHYA				Dehesh <i>et al.</i> (1993)
no sensible a Rc	<i>phyB</i>	PHYB				Good <i>et al.</i> (1993)
	<i>cop1 del fcr</i>	COPI, o FUS3, o DEET 2				Verma <i>et al.</i> (1997) Cusack-Matney (1996) Cary <i>et al.</i> (1998) Kap <i>et al.</i> (1994)
hiposensible a FRe	<i>far1, fan2, phy1, phy3</i>	FAR1				Anders <i>et al.</i> (1992) Seki <i>et al.</i> (1994) Linn <i>et al.</i> (1995) Went <i>et al.</i> (1997)
hipersensible a FRe	<i>spa1</i>	SPA1				Loeber <i>et al.</i> (1995)
hiposensible a Rc	<i>red1, pet2, pet3</i>					Wagner <i>et al.</i> (1997) Altschuld & Cashmore (1996)
hipersensible a Rc	<i>pef1</i>	PEF3				Stoll <i>et al.</i> (1996)
hipersensible a Rc i FRe	<i>pef1</i>					Altschuld & Cashmore (1996)
hipersensible a Rc i FRe	<i>py2</i>					Gracia <i>et al.</i> (1998)

**Figura 5: Mutants afectats en la via de transducció del senyal dels fitocroms A i B.** Fenotip d'aquests mutants en condicions de foscor, llum roja llunyana contínua (FRe) i llum roja contínua (Rc). S'indiquen també les proteïnes per a les que els gens s'han clonat. L'asterisc vermell indica el fenotip alterat degut a una alteració de la sensibilitat a Rc, FRe, o a ambdues.

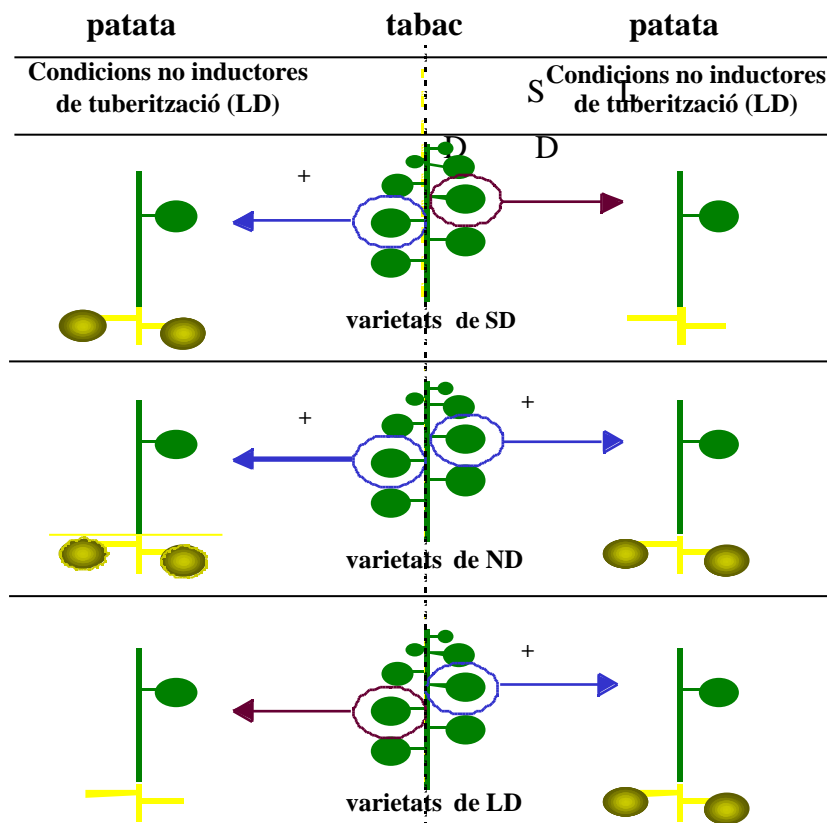
## 5 Estímul inductor i regulació hormonal de la tuberització.

L'existència d'un estímul transmissible, inductor de la tuberització, es va posar de manifest mitjançant experiments basats en empelts entre plantes induïdes i no induïdes per a la formació de tubercles, (Gregory, 1956; Kumar i Wareing, 1973). Aquest estímul es produït en les fulles de plantes *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* crescudes en SD (plantes induïdes) i quan aquestes fulles s'empelten sobre plantes crescudes en LD (no induïdes), es capaç de transmetre a través de l'empelt, promovent la tuberització en les plantes empeltades encara que aquestes es segueixin mantenint en condicions no inductores de LD (Figura 6). Alhora, es va observar que la tuberització només tenia lloc si en el moment de fer l'empelt s'eliminaven totes les fulles de la planta receptora crescuda en condicions no inductores, el que indicava que, a més d'un estímul inductor, existeixen també senyals inhibidores de la tuberització que són produïdes per les fulles de les plantes no induïdes.



**Figura 6:** Transmissió de l'estímul inductor de tuberització entre plantes de patatera crescudes en condicions fotoperiòdiques inductores per a la tuberització de SD i les crescudes en condicions no inductores de LD. Per tal que l'empelt promogui la tuberització en les plantes receptores no induïdes, és necessari que s'eliminïn les fulles de la planta receptora, les quals generen un senyal inhibidor.

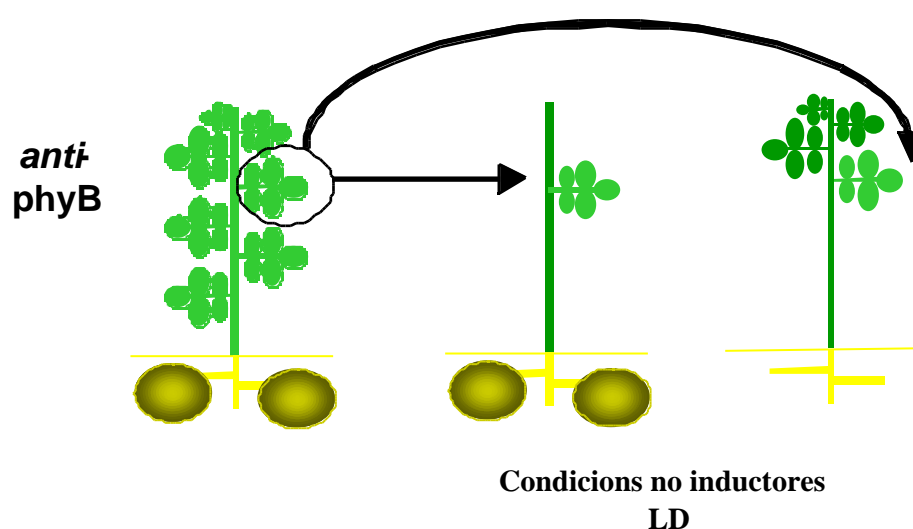
A l'igual que la tuberització, la inducció i desenvolupament de les flors està regulada per factors genètics i ambientals, essent el fotoperíode un dels factors determinants del temps de floració. En experiments en que s'utilitzà varietats de tabac estrictament fotoperiòdiques per a la floració, i es van empeltar fulles d'aquestes plantes en plantes de patatera crescudes en condicions no inductores per a la tuberització (LD), es va observar que sempre que els empelts es feren amb fulles de plantes de tabac que eren induïdes per a la floració, aquestes eren capaces de promoure la tuberització en les plantes de patatera (Hammes i Nel, 1975). D'altra banda, els resultats eren idèntics, independentment de si les fulles induïdes provenien de varietats de tabac que requerien SD o LD per a la floració (Figura 7),



**Figura 7. Transmissió de l'estímul inductor de la floració des de plantes de tabac a plantes de patatera crescudes en LD (condicions no inductores de la tuberització).** A l'igual que en el cas anterior, per tal que s'indueixi la tuberització en les plantes receptores és necessari que s'eliminïn les fulles de la planta receptora, les quals generen un senyal inhibitor.

sempre i quan aquestes fulles fossin de plantes induïdes per a la floració (crescudes en SD per a les varietats SD o crescudes en LD per a les varietats LD). Aquests resultats demostren que l'estímul de floració produït a les fulles de tabac es capaç d'induir la formació de tubercles en les plantes receptores de patata (Martin *et al.*, 1982) i, per tant, que les primeres etapes en la inducció fotoperiòdica de floració i tuberització serien comuns, essent en etapes posteriors que ambdós processos divergeixen per desenvolupar tubercles o flors.

Així mateix, experiments en que s'empeltaren fulles que provenien de plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena* portadores de una construcció antisentit pel cDNA *phyB*, i les que a diferència de les plantes salvatges poden formar tubercles en LD, sobre plantes receptores salvatges crescudes en condicions no inductores per a la tuberització (LD) van mostrar els resultats que s'observen a la figura 8.



**Figura 8. Els empelts de fulles de plantes transgèniques de patatera portadores de una construcció antisentit pel cDNA *phyB* promouen la tuberització de les plantes salvatges crescudes en condicions no inductores per a la tuberització.** A l'igual que en cas anterior, per tal que l'empelt promogui la tuberització en les plantes receptores no induïdes, és necessari que s'eliminin les fulles de la planta receptora, les quals generen un senyal inhibidor.

Els empelts d'aquestes fulles, inclús quan provenien de plantes crescudes en LD, eren capaces de induir la tuberització de les plantes receptores crescudes en condicions no inductores. Aquest resultat demostra que, en plantes salvatges, PHYB regula la síntesi en condicions no inductores d'un senyal inhibidor responsable de reprimir el procés de tuberització. Aquest senyal inhibidor no es sintetitzaria en les fulles de les plantes antisentit pel gen *phyB*, pel que els empelts que provenen d'aquestes plantes promouen la tuberització de les plantes receptores (Jacksón, 1999).

Les evidències obtingudes sobre l'existència d'un estímul inductor de la tuberització, el qual podia ser transmès a través d'empelts (Gregory, 1956), juntament amb l'observació que de manera concomitant amb l'inducció de la tuberització, s'esdevenen a la planta un seguit de canvis fisiològics i morfològics (Steward *et al.*, 1981), va portar a pensar que els senyals inductors de la tuberització podrien ser de tipus hormonal. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha descrit un paper de les GAs clarament inhibidor de la tuberització (Tizio, 1971). No obstant, malgrat aquesta acció inhibidora, s'ha demostrat que l'aplicació exògena de GAs no és suficient per a inhibir la tuberització en condicions inductores. Per tant, semblaria que apart de l'acció inhibidora d'aquestes hormones, alhora existiria un estímul inductor addicional possiblement de caràcter també hormonal, essent el balanç entre senyals inductors i inhibidors de la tuberització el responsable de la formació o no de tubercles. Es va postular que l'estímul inductor de la tuberització podria ser un antagonista de les GAs, com l'àcid abscísic (ABA), però més tard Okazawa (1967) pogué observar que l'aplicació d'ABA no tenia un efecte significatiu en la tuberització. També s'ha considerat un possible paper de les citoquinines i de l'etilè, però els resultats obtinguts amb aquestes hormones no són clars. Koda *et al.* (1988), per altre part, foren capaços d'aïllar a partir de fulles de plantes induïdes per a la tuberització un

derivat de l'àcid jasmònic, l'àcid tuberònic, que mostrava una forta activitat inductora de tuberització *in vitro*. Aquests autors van demostrar que en plantes de patatera l'àcid jasmònic és progressivament metabolitzat a àcid tuberònic, el qual es glicosilat rendint un derivat soluble, que és transportat per tota la planta fins als estolons i tubercles (Yoshihara *et al.*, 1996). Si bé aquestes dades eren força prometedores, Jacksón i Willmitzer (1994) demostraren que l'àcid jasmònic te una forta activitat inductora de la formació de tubercles *in vitro*, però no es capaç de induir la tuberització de plantes *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* crescudes en LD.

Com a conclusió d'aquests resultats es pot afirmar que un paper hormonal clau en el procés de tuberització només s'ha pogut demostrar per a les GAs. Per un cantó, s'ha observat que els nivells endògens d'aquestes hormones són molt menors en plantes induïdes per a tuberitzar que no pas en plantes no induïdes (Railton i Wareing, 1973; Kumar i Wareing, 1974; Okazawa, 1960; Racca *et al.*, 1968). Alhora, Koda i Okazawa (1983) van demostrar que els nivells endògens de GAs i compostos derivats, disminueixen a l'extrem apical dels estolons, quan en aquests s'inicia la formació del tubercle. Així mateix, s'ha vist que el tractament de plantes de patatera *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, que requereixen dies curts per a tuberitzar, de forma continuada amb ancymidol (inhibidor dels passos inicials de síntesi de GAs) indueix la tuberització d'aquestes plantes en condicions no inductores de LD (Jacksón i Prat, 1996). Apart, el mutant nan d'*andigena*, *ga1*, bloquejat en el pas de conversió de GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub>, pot formar tubercles en LD, tot i que necessita un període llarg de temps per a iniciar la tuberització (van der Berg, 1995).

## 6 Giberel.lines

Les giberel.lines (GAs) van ser descobertes per Kurosawa l'any 1926, arreu de la malaltia *bakanae* de l'arròs, causada pel fong *Giberella fujikuroi* (*Fusarium*

*moniliforme*), el qual causa un creixement excessiu de les tiges i brots degut a la producció massiva per part del fong d'una mescla de GAs.

La primera giberel·lina d'origen vegetal s'aïllà a partir de les llavors de mongeta (*Phaesolus vulgaris*, Durley *et al.*, 1971), i d'ençà aleshores s'han identificat moltes més GAs a partir de les llavors d'altres espècies (Albone *et al.*, 1984; Duncan i West, 1981; Fujisawa *et al.*, 1985; Gafni Schechter, 1981; Gaskin *et al.*, 1980) degut a que aquest teixit conté concentracions molt més elevades de GAs que la resta d'òrgans de la planta (Sponzel, 1995).

Les GAs són àcids diterpenoides tetracíclics amb un esquelet bàsic d'*ent*-giberel·là. S'han identificat més de 126 giberel·lines diferents, les quals s'han enumerat seguint l'ordre cronològic en que es varen aïllar, i es diferencien bàsicament per les modificacions que presenten en els diversos àtoms de carboni de l'esquelet *ent*-giberel·là. D'acord amb el nombre d'àtoms de carboni que contenen, les GAs es classifiquen en dos grups: les GAs de 20 àtoms de carboni (C20-GAs) i les de 19 àtoms de carboni (C19-GAs). Les C19-GAs es sintetitzen a partir de les C20-GAs, per oxidació i eliminació del carboni 20, a través de diferents intermediaris de síntesi amb graus creixents d'oxidació d'aquest àtom de carboni (alcohol, aldèhid i àcid carboxílic, per a ser per últim eliminat com a CO<sub>2</sub>). Les molècules GAs es diferencien per la presència o no d'un grup hidroxil als carbonis 2, 3 i 13, el qual pot estar en configuració *o* o *r*. La modificació en aquests àtoms de carboni així com la estereoquímica dels grups hidroxil, s'ha vist que es determinant de l'activitat biològica de les GAs. També s'han observat modificacions de tipus doble enllaç, epòxid, o cetona en diversos àtoms de l'anell *ent*-giberel·là. Les GAs biològicament més actives en quan al seu efecte sobre l'elongació de la tija són les de 19 àtoms de carboni (C19-GAs) que presenten una modificació hidroxil al carboni-3 en configuració *r* (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> i GA<sub>32</sub>) o una insaturació en aquest àtom de carboni (GA<sub>5</sub>). Alhora, el perfeccionament dels sistemes d'anàlisi han permès d'identificar tot un ventall de noves GAs, gràcies a tècniques de cromatografia tals com l'HPLC i la GC-MS.



Les GAs regulen molts processos del cicle vital de les plantes i són essencials en moltes fases del creixement i desenvolupament vegetals. D'entre les funcions millor caracteritzades d'aquestes hormones s'inclou la de promoció del creixement de la tija (elongació dels internodes), l'expansió de les fulles i la mobilització de les reserves del gra en cereals, immediatament després que s'inicia la germinació de la llavor (funció realitzada per les cèl.lules de l'aleurona). Depenent de l'espècie vegetal, les GAs són també requerides per a la germinació de les llavors i pel desenvolupament de les anteres, de les llavors i del fruit. Altres processos de desenvolupament modulats per les GAs són la inducció floral i la biosíntesi d'antocianines, així com la inducció de tuberculs (les GAs afecten negativament el procés d'inducció).

L'estudi de mutants deficients en GAs, així com l'anàlisi dels efectes produïts per l'aplicació d'inhibidors de la biosíntesi (inhibeixen de manera específica algun dels enzims biosintètics), o per aplicació de GAs, ha permès de conèixer moltes de les funcions biològiques d'aquestes hormones. Així mateix, la caracterització de mutants deficients en GAs o insensibles a aquestes hormones, ha permès de caracteritzar molts dels gens implicats en la biosíntesi de GAs i d'estudiar la seva regulació, alhora que ha permès l'aïllament i caracterització dels gens que codifiquen diferents intermediaris en la ruta de senyalització de les GAs.

### **6.1 Biosíntesi de giberel·lines i mutants biosintètics:**

Durant els darrers cinc anys s'han clonat, mitjançant estratègies diverses, la gran majoria de gens corresponents als diferents enzims implicats en la biosíntesi de GA. Això ha permès de tenir informació sobre aquests enzims, la seva localització subcel.lular, així com la seva regulació per senyals endògens i ambientals. Els avenços més importants en la caracterització de la ruta de biosíntesi de GAs s'ha aconseguit a partir del treball amb mutants biosintètics, deficients en GAs actives, els quals es caracteritzen per presentar entre d'altres alteracions un fenotip nan amb internodes curts, un tamany reduït de les fulles i/o un retard en el temps de floració, essent tots aquests caràcters revertits en

aplicar GAs exògenes. A la figura 9 es mostra un esquema de la ruta biosintètica de les GAs i els gens descrits fins ara a *Arabidopsis* per a cada un dels passos de síntesi.

Els principals llocs de síntesi de GAs són els fruits, les llavors joves, les arrels, teixits meristemàtics tal com l'apex i gemes laterals de la tija i el teixit vascular de les fulles. Els primers passos de síntesi, fins al precursor geranilgeranil pirofosfat (GGPP), són comuns amb els de la resta de terpenoids, carotenoids i la cadena fitol de les clorofil·les. El GGPP es sintetitza en plàstids a partir d'isopentenil pirofosfat (IPP), i per ciclació es transforma a *ent*-kaurè, passant per l'intermediari *ent*-copalil difosfat (CDP). Els enzims involucrats en aquesta transformació són les terpén ciclases *ent*-copalil difosfat sintasa (CPS) i *ent*-kaurè sintasa (KS), localitzades als proplàstids. La CPS catalitza la conversió de GGPP a CDP, i la KS la conversió de CDP a *ent*-kaurè. A *Arabidopsis*, el locus *gal* corresponent a la CPS s'ha clonat per substracció genòmica (Sun *et al.*, 1992). Tot i que l'anàlisi *Southern* indicava que era un gen de còpia única, el mutant *gal* és capaç de produir petites quantitats de GA, indicant bé la presència de gens homòlegs o bé la d'una ruta alternativa de biosíntesi d'*ent*-kaurè. La situació és similar a blat de moro, a on s'ha clonat el locus *An1* corresponent al *GAI* d'*Arabidopsis*, per *transposón tagging* (Bensen *et al.*, 1995b). Els mutants homozigòtics d'*An1* acumulen fins a un 20% de l'*ent*-kaurè acumulat en plantes wt, el que indica l'existència d'isoenzims addicionals. D'acord amb aquesta observació, s'ha pogut amplificar per RT-PCR un altre cDNA homòleg a *An1*, que s'ha anomenat *An2* (Bensen *et al.*, 1995a). El locus *ls* de pèsol correspon també a un gen que codifica la CPS, la identitat del qual es va confirmar per expressió heteròloga en *E.coli* (Ross *et al.*, 1995; Ait-ali *et al.*, 1997). A tomàquet s'han aïllat almenys dos homòlegs de *GAI* per RT-PCR, emprant com a primers oligonucleòtids dissenyats a partir de les seqüències d'*Arabidopsis* i de blat de moro (Hedden i Kamiya, 1997). La *ent*-kauren sintasa catalitza el pas de copalil difosfat a *ent*-kaurè. A *Arabidopsis* aquest pas està catalitzat per l'enzim *GA2*. A carbassa es va aïllar, mitjançant RT-PCR i utilitzant oligonucleòtids degenerats, l'enzim *ent*-kaurene B (Yamaguchi *et al.*, 1996). A pèsol, espinac i *Agrostemma githago*, s'ha vist que la producció d'*ent*-kaurè està afectada per factors ambientals tals com la llum, el fotoperíode, la temperatura i així com

durant el desenvolupament de la planta (Ecklund i Moore, 1974; Zeevaart i Gare, 1993; Moore i Moore, 1991; Chung i Coolbaugh, 1986).

L'oxidació de l'*ent*-kaurè a GA<sub>12</sub>-aldèhid i GA<sub>12</sub> es catalitzada per monooxigenases microssomals de tipus citocrom P450. Aquests enzims catalitzen reaccions que requereixen oxigen molecular i NADPH com a cofactors, i en les quals s'incorpora només un dels àtoms de la molècula d'oxigen al substrat (Sponsel, 1995). Estudis bioquímics realitzats en embrions de pèsol i en endosperma de carabassa han demostrat que com a mínim un dels enzims implicats en aquest pas de síntesi estaria associat a la membrana del reticle endoplàsmic. Per tant, per a aquesta part de la ruta de síntesi és necessari que l'*ent*-kaurè o un intermediari posterior, sigui transportat des dels plastidis cap al citoplasma. L'oxidació de l'*ent*-kaurè a GA<sub>12</sub> requereix 6 passos, en els que es formen els intermediaris *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal, àcid *ent*-kaurenoic, àcid *ent*-7 -hidroxikaurenoic i GA<sub>12</sub>-aldehid. Els primers passos d'oxidació seqüencial del C19 de l'*ent*-kaurè fins a formar l'àcid *ent*-kaurenoic són probablement catalitzats pel mateix enzim i s'ha suggerit que el mutant *ga3* d'*Arabidopsis* podria correspondre a una mutació en aquest pas de síntesi (Hedden, 1983). Als passos següents, l'àcid *ent*-kaurenoic és hidroxilat a àcid *ent*-7 -hidroxikaurenoic, el qual per contracció de l'anell B i exclusió del carboni 7 fora de l'anell, es transforma en GA<sub>12</sub>-aldehid. Aquesta és la primera molècula amb estructura giberel·lina que es forma en totes les plantes, i la precursora de la resta de GAs. El GA<sub>12</sub>-aldehid es seguidament oxidat en el carboni 7 per a donar GA<sub>12</sub>, en una reacció catalitzada per les GA 7-oxidases les quals comprenen tant enzims de tipus monooxigenases com dioxigenases. Actualment només s'han clonat dos gens corresponents a aquests passos de síntesi. Un d'ells es el gen *Dwarf3* de blat de moro, el qual codifica un membre de la família CYP88 de monooxigenases de tipus citocrom P450 (Winkler i Helentjaris, 1995). Tot i que es sap que el mutant *Dwarf3* correspon a un mutant deficient en GA, no es coneix exactament quin pas concret de la ruta de síntesi aquest enzim catalitza. El gen *GA3* d'*Arabidopsis* codifica, per altre banda, una monooxigenasa de tipus citocrom P450 de la família CYP701 (Helliwell *et al.*, 1998). El

mutant *ga3* acumula *ent*-kaurè i respon a l'aplicació d'àcid *ent*-kaurenoic però no a la d'*ent*-kaurè (Helliwell *et al.*, 1998). Per expressió heteròloga a llevat, s'ha demostrat que la proteïna GA3 catalitza l'oxidació en tres etapes de l'*ent*-kaurè fins a àcid *ent*-kaurenoic (Helliwell *et al.*, 1999).

Si bé totes les espècies vegetals segueixen una ruta idèntica de biosíntesi fins a GA<sub>12</sub>, a partir d'aquest punt, la ruta difereix entre espècies i fins i tot entre diferents òrgans d'una mateixa planta. Segons la posició i ordre seqüencial en què tenen lloc els passos següents d'oxidació, la conversió de GA<sub>12</sub> a GAs actives pot dur-se a terme segons quatre vies principals que comprenen passos de 3-hidroxilació, 13-hidroxilació, 3- i 13-hidroxilació, o no hidroxilació. Apart d'aquests passos diferencials, les 4 vies comparteixen una sèrie de reaccions d'oxidació successiva del carboni 20 el qual es elimina com a CO<sub>2</sub>, donant lloc a giberel·lines de 19 àtoms de carboni o C<sub>19</sub>-GAs, les quals són biològicament més actives que les GAs de 20 àtoms de carboni (Sponsel 1995).

En plantes vasculars la via alternativa de síntesi més estesa és la que comporta una prompta hidroxilació del carboni 13 (ruta de 13-hidroxilació). Aquesta ruta és majoritària en pèsol i patatera, i suposa la 13-hidroxilació de GA<sub>12</sub> per a donar GA<sub>53</sub>. Les següents reaccions en la ruta de síntesi comporten la oxidació del carboni 20 i hidroxilació del carboni 3 per a donar GA biològicament actives, i la posterior inactivació d'aquestes, per hidroxilació i oxidació del carboni 2. Aquestes reaccions són totes elles catalitzades per enzims solubles de tipus dioxigenasa depenent de 2-oxoglutarat. En la reacció catalitzada per aquests enzims, a diferència de les monoxigenases, ambdós àtoms de la molècula d'oxigen s'incorporen al substrat.

La ruta majoritària de 13-hidroxilació segueix amb la transformació de GA<sub>53</sub> a GA<sub>20</sub>, per oxidació successiva i eliminació del carboni 20, passant pels intermediaris GA<sub>44</sub>, GA<sub>17</sub> i GA<sub>19</sub> (Sponsel, 1995). D'aquesta manera s'obtenen les C<sub>19</sub>-GAs, amb un enllaç lactona que forma un anell entre els àtoms de carboni 10 i 19 que és important per a una elevada activitat biològica. Aquests passos oxidatius són catalitzats per un únic enzim multifuncional conegut com a GA 20-oxidasa (Lange *et al.*, 1994). La primera GA 20-

oxidasa s'aïllà a partir de l'endosperma de carabassa, i es demostrà que era capaç de convertir GA<sub>53</sub> a GA<sub>17</sub> (Lange *et al.*, 1994). A *Arabidopsis* s'ha vist que l'enzim GA 20-oxidasa es codificat pel locus *ga5*, el qual es va clonar emprant el cDNA de carabassa com a sonda heteròloga (Xu *et al.*, 1995). A l'actualitat, els gens corresponents a aquests enzims s'han clonat en un nombre elevat d'espècies com carabassa (Lange *et al.*, 1994), *Arabidopsis* (Phillips *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995), pèsol (Martin *et al.*, 1996; García-Martínez *et al.*, 1997), espinac (Wu *et al.*, 1996), mongeta (García-Martínez *et al.*, 1997), carbassa (Lange *et al.*, 1994) i patatera (Carrera *et al.*, 1999), entre d'altres. Això ha permès determinar que aquesta activitat es en general codificada per una petita família gènica de 2-3 gens, cadascun dels membres de la família gènica mostrant un patró d'expressió específic per algun teixit.

Seguint la ruta majoritària, les C19-GAs poden ser hidroxilades en 3 o 2. La hidroxilació en la posició 3 - és catalitzada per les 3 -hidroxilases, i rendeix GAs que són més actives quant a l'allargament de la tija. Mitjançant aquesta reacció, GA<sub>20</sub> es convertida en GA<sub>1</sub>, mentre que en la ruta de no 13-hidroxilació GA<sub>4</sub> passa a GA<sub>9</sub>. Es coneixen mutants que tenen bloquejada la biosíntesi de GAs en aquest pas, com el mutant *le* de pèsol descrit per Mendel, el mutant *dwarf1* de blat de moro i el *ga4* d'*Arabidopsis* (Ingram *et al.*, 1984; Mendel 1866; Spray *et al.*, 1996). Aquests mutants presenten un fenotip nan que pot ser revertit per aplicació de GA<sub>1</sub>, mentre que l'aplicació de GA<sub>20</sub> no és capaç de revertir el fenotip. A espècies com *Arabidopsis* (GA4 i GA4H; Chiang *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1998), enciam (Toyomasu *et al.*, 1998) i tomàquet (Rebers *et al.*, 1999) s'han aïllat dos gens que codifiquen per l'activitat 3 - hidroxilasa. En canvi, a pèsol (Lester *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997) i a tabac (Itoh *et al.*, 1999) només s'ha identificat un gen. A carabassa s'ha aïllat un clon de cDNA que codifica un enzim bifuncional amb activitat 2 - i 3 -hidroxilasa (Lange *et al.*, 1997). Aquest enzim és diferent de la resta de 3 -hidroxilases, les quals no mostren activitat 2 -hidroxilasa.



**Figura 9. Ruta de biosíntesis de les GAs a partir de GGPP.** El precursor GGPP es converteix a *ent*-kaurè per mitjà de les diterpens ciclases CPS i KS, als plàstids. Els següents passos d'oxidació de l' *ent*-kaurè fins a GA<sub>12</sub> són catalitzats per monoxigenases microsomals de tipus citocrom p450. Les reaccions d'oxidació i pèrdua del carboni 20, i hidroxilació en 3 i 2 són catalitzats per dioxigenases solubles dependents de 2-oxoglutarat. A *A. thaliana* el metabolisme de GAs segueix diferents vies: la de no hidroxilació (on R1= H i R2= H) i la de 13-hidroxilació (on R1= H i R2= OH), (GA<sub>no hidroxil./13-hidroxil.</sub>). A la patata el metabolisme de GAs segueix majoritàriament la ruta de 13-hidroxilació, seguida de l'oxidació i eliminació de C-20, i posterior hidroxilació en 3 per a donar GA<sub>1</sub>. Els gens descrits fins ara a *Arabidopsis* per a cada un dels passos de biosíntesi estan marcats en vermell, els descrits per a blat de moro en verd i els de pèsol en blau.

## 6.2 Regulació dels nivells endògens de les GAs:

Els nivells endògens de GAs a les plantes estan regulats per factors ambientals com la llum, el fotoperíode i la temperatura. Alhora, existeixen mecanismes endògens de control, operatius al llarg del creixement i desenvolupament de la planta, que fan que aquestes hormones es sintetitzin exclusivament en aquells teixits i en el moment de desenvolupament on es donarà la resposta a GAs. L'expressió gènica dels enzims biosintètics està regulada pel producte final de la via, GA<sub>1</sub>. Mitjançant l'estudi de mutants biosintètics s'ha pogut comprovar que una alteració en els nivells endògens de les GAs actives provoquen una alteració en els nivells d'expressió dels gens biosintètics (Hendden and Kamiya; 1997;

Lange, 1998), a l'igual que passava amb l'aplicació exògena de GAs o d'inhibidors de la ruta de síntesis. Alhora, les mutacions que afecten els gens implicats en la transducció del senyal de les GAs o en la resposta a aquestes hormones, provoquen una alteració en els nivells d'expressió dels gens biosintètics donant lloc a un increment en els nivells endògens de GAs.

- **Regulació dels nivells endògens de GAs al llarg del desenvolupament de la planta:**

L'expressió del gen *GA1* d'*Arabidopsis* que codifica per l'activitat CPS es elevada en alguns teixits específics com l'àpex, la punta de les arrels, les anteres i les llavors immadures. Els mutants *gal* presenten una alteració fenotípica en aquests teixits específics, el que suggereix que els gens biosintètics de GAs són només actius en aquells teixits on aquestes hormones actuen. Durant el creixement vegetatiu de la carabassa, els nivells dels transcrits corresponents als enzims biosintètics CPS i KS s'incrementen exclusivament als teixits joves, els nivells d'aquests transcrits fent-se menors a mida que aquests teixits es fan vells (Smith et al., 1998). També s'ha observat que els gens que codifiquen els enzims biosintètics CPSs, GA 20-oxidases i GA 3 -hidroxilases de tomàquet presenten nivells més alts d'expressió en les flors i fruits, les GAs essent indispensables pel desenvolupament d'aquests òrgans (Rebers et al., 1999). Aquests resultats indicarien doncs que la síntesi de les GAs només té lloc en aquells òrgans on són requerides per a regular algun procés de desenvolupament i diferenciació.

- **Regulació de l'expressió dels gens biosintètics pels nivells endògens de GAs:**

S'ha observat que les dioxigenases dependents de 2-oxoglutarat implicades en la síntesi de GAs estan regulades pels nivells endògens de GAs, concretament per *GA1*, que és el producte final de la via. La transcripció dels gens que codifiquen les GA 20-oxidases i les



3 -hidroxilases està regulada per retroalimentació negativa per GA<sub>1</sub>. Així els transcrits d'aquests gens s'acumulen a nivells majors en plantes mutants deficientes en GAs o en plantes salvatges tractades amb inhibidors de la ruta de síntesi de les GAs com placobutazol, ancimidol o prohexadiona). Els nivells d'aquests transcrits, per altre banda són menors en plantes a les que s'ha aplicat GAs exògenes. El mutant *gal* de *S. tuberosum* ssp *andigena*, que presenta un bloqueig en el pas de síntesi de GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub> a l'igual que les plantes salvatges tractades amb ancimidol o prohexadiona presenten un increment en els nivells d'expressió del gen *StGA20ox1* corresponent a la GA 20-oxidasa, respecte a les plantes salvatges. Per contra, els nivells d'aquest missatger són menors en les plantes salvatges tractades amb GA<sub>3</sub> (Carrera et al., 1999). L'efecte de la regulació negativa per producte final de la via ha estat també demostrada per als gens GA4 i GA5 d'*Arabidopsis*, havent-se vist que el mutant *gal-3* d'*Arabidopsis* amb un bloqueig en la síntesi de l'*ent*-kaurè presenta nivells molt incrementats d'aquests dos transcrits (Sun and Kamiya, 1994; Chiang et al., 1995; Xu et al., 1995).

A la vegada, s'ha observat que l'expressió dels mRNAs corresponents a les GA 2-oxidases està regulada positivament per GA<sub>1</sub>. Plantes tractades amb GAs mostren nivells superiors del transcrit GA 2-oxidasa que les plantes salvatges, i que les plantes deficientes en GAs. Així, a *Arabidopsis* s'ha vist que el transcrits *AtGA2ox1* i *AtGA2ox2* s'expressen a nivells molt reduïts en el mutant *gal-2*, però que els nivells d'expressió ambdós gens s'incrementa notablement quan les plantes es tracten amb 10 µM GA<sub>3</sub> (Jacksón et al., 1999). Aquest doble mecanisme positiu i negatiu de regulació, dels gens GA 2-oxidasa i dels gens GA 20-oxidasa/GA 3 -hidroxilasa, permetria a les plantes regular finament els nivells de GAs actives (Thomas et al., 1999).

La sobreexpressió del gen NTH15 de tabac (Tanaka-Ueguchi et al., 1998) o del gen OSH1 d'arròs (OSH1) (Kusaba et al., 1998) que codifiquen factors homeobox de tipus "KNOTTED", suprimeix l'expressió del gen biosintètic GA 20-oxidasa, reduint els nivells de GA<sub>1</sub> i produint un fenotip nan en plantes transgèniques de tabac. Recentment s'ha vist que el factor de transcripció RSG (*Repression of Shoot Growth*) uneix i activa el gen GA3 que codifica per la proteïna biosintètica EKO (Fukazawa et al., 2000). Per tant,

els productes d'aquests gens tindrien una funció en la regulació de l'expressió gènica dels enzims biosintètics.

Per altre banda, estudis recents han mostrat que els mutants en la ruta de senyalització de les GAs presenten també una alteració en els nivells d'expressió dels gens GA 20-oxidases i GA 3 -hidroxilases, acumulant nivells més elevats ambdós transcrits. Així per exemple, el mutant *gai* d'*Arabidopsis* presenta un fenotip nan similar al dels mutants deficientes en GAs però és insensible a l'aplicació exògena de GAs. Aquest mutant mostra nivells elevats de GAs endògenes i nivells elevats dels transcrits GA 20-oxidasa en comparació amb les plantes salvatges, el que suggereix que té una sensibilitat reduïda a les GAs (Peng et al., 1997). Es va veure que la mutació recessiva *rga* pot revertir parcialment el fenotip del mutant biosintètic *gal-3*. Aquesta mutació aboleix els alts nivells d'expressió del gen biosintètic GA4 a les plantes *gal-3*, suggerint que RGA pot jugar un paper important com a intermediari en la ruta de resposta a les GAs (Silverstone et al., 1998). Per últim, el mutant allargat de pèsol *slender* (*sln*) presenta, a l'igual que les plantes tractades amb 2,2-dimetil-GA4, uns nivells del transcrit GA 20 oxidasa menors que els de les plantes salvatges tot i que en aquest mutant els nivells endògens de GAs estan reduïts (Martin et al., 1999). Aquests resultats donen una idea de la gran complexitat dels mecanismes de regulació que controlen l'expressió dels diferents gens biosintètics, i de la estricta regulació dels nivells endògens de GAs en la cèl·lula per part d'aquests mecanismes de control.

- **Regulació dels nivells endògens de GAs per la llum:**

Molts processos de desenvolupament regulats per la llum com la germinació de les llavors, l'elongació de la tija, la floració i la tuberització, són també controlats per les GAs. En molts d'aquests casos, la llum actua sobre aquests processos en part a través de la producció de canvis en els nivells de GAs. En alguns casos, com per exemple, la germinació

de les llavors d'enciam o d'*Arabidopsis*, s'ha comprovat que l'aplicació exògena de GAs pot substituir els requeriments específics de llum. A llavors d'enciam, els nivells de GA<sub>20</sub> en condicions de foscor són 100 cops més elevats que els nivells de GA<sub>1</sub>, i els nivells d'expressió ambdós gens GA 20-oxidasa són elevats. Després d'un tractament amb llum R (que promou la germinació de la llavor) s'incrementen els nivells de GA<sub>1</sub>, però no els de GA<sub>20</sub>, i aquest increment coincideix amb un augment en els nivells d'expressió dels gens 3-hidroxisilasa. Aquest efecte, per altre part, es revertit per llum FR (que inhibeix la germinació), el que indica que durant la germinació de les llavors d'enciam, els PHYs controlen la 3-hidroxisilació de GA<sub>20</sub> mitjançant la regulació dels nivells d'expressió de l'enzim 3-hidroxisilasa (Toyomasu et al., 1998). Aquest mateix resultat es va obtenir pels gens GA4 i GA4H d'*Arabidopsis*. Als mutants *phyB1*, l'expressió de GA4H no és induïda en resposta a la llum R, tal i com passa en les plantes salvatges o als mutant *gal-3*, el que demostra que la inducció d'aquest gen és directament regulada per la llum (Yamaguchi et al., 1998). Per altre part, durant la de-etiolació de les plàntules de *Pisum sativum* la llum controla, a través de PHYA i PHYB, l'expressió del gen biosintètic 2-hidroxisilasa. En presència de llum s'incrementa l'expressió d'aquest gen, el que resulta en una disminució en els nivells de GA<sub>1</sub> i un increment en els nivells de GA<sub>8</sub>, observable ja a les 2 hores després de l'irradiació amb llum, alhora que un augment en els nivells d'expressió dels gens GA 20-oxidasa i GA 3-hidroxisilasa. L'increment en els nivells d'expressió d'aquests dos últims gens es dona com a efecte secundari de la disminució de GA<sub>1</sub>, i es mediat pel control per retroalimentació negativa d'aquests gens (Ait-Ali et al., 1999). L'estudi de mutants en els gens *phy* ha posat en evidència a diferents espècies que la llum és un regulador de la biosíntesi o la sensibilitat de les GAs en processos controlats pel fotoperíode com la floració i la tuberització (Kamiya i Martinez, 1999). Les plantes *S. tuberosum* ssp *andigena* portadores de la construcció antisentit pel cDNA *phyB* a més de perdre el control fotoperiòdic de la tuberització i ser capaços de tuberitzar en condicions no inductores de dies llargs (LD), mostren un fenotip allargat igual al de les plantes salvatges tractades amb GAs (Jacksón et al., 1996). Aquest fenotip es dona juntament a un increment en els nivells del transcrit *StGA20ox1* i possiblement un increment en els nivells

de GA<sub>1</sub> i GA<sub>20</sub> (explicaria el fenotip allargat i la reducció en els nivells de clorofil·les d'aquestes plantes) a la part apical de la planta. Les plantes mutants ma<sub>3</sub><sup>R</sup> de *Shorgum bicolor* amb una mutació en el gen *phyB*, presenten també una sensibilitat reduïda al fotoperíode, i floreixen en condicions no inductores de dies llargs LD. Aquestes plantes presenten nivells incrementats de GA<sub>20</sub>, i mostren canvis en els ritmes cíclics normals dia/nit d'aquesta GA (Foster and Morgan, 1995; Lee et al., 1998). De manera similar, també s'ha observat canvis en el cicle rítmic d'acumulació del transcrit *StGA20ox1* a les plantes de patatera amb nivells reduïts de PHYB, el que suggereix que en aquestes plantes el mecanisme de control negatiu pel producte final de la via GA<sub>1</sub> està alterat, degut a que presenten una reducció en la resposta o sensibilitat a les GAs (Jacksón *et al.*, 2000). Una possibilitat alternativa és que en condicions de LD els nivells de GA<sub>20</sub> i GA<sub>1</sub> s'incrementen a les fulles, i aquestes GAs en ser transportades cap als estolons actuen com a inhibidors de la tuberització. En condicions inductores de SD, a l'igual que a les plantes anti-PHYB, les GAs romandrien a les fulles, el que fa que malgrat que s'observi un allargament de la tija el qual és reflex de l'increment en els nivells de GA<sub>1</sub> en aquest òrgan, la concentració de GA<sub>1</sub> als estolons és menor que en condicions de LD, i s'inicia la formació de tuberculs (Kamiya i Martínez, 1999).

### 6.3 Transducció del senyal de les GAs:

L'aïllament i caracterització de mutants en l'allargament de la tija i que alhora mostraven una alteració en els nivells endògens de GAs, ha estat de gran utilitat en la caracterització dels enzims implicats en la biosíntesi i també en la identificació d'alguns dels gens implicats en la via de senyalització d'aquestes hormones. Estudis basats en la resposta induïda per les GAs a les cèl·lules de la capa d'aleurona del gra d'ordi, conjuntament amb aproximacions genètiques en *Arabidopsis*, han permès també identificar d'altres components addicionals en la via de senyalització.

La capa de cèl.lules d'aleurona del gra d'ordi i els protoplastes d'aquestes cèl.lules són dos dels sistemes model, on la resposta a GAs ha estat més ben estudiada. Aquests sistemes han estat idonis per a l'estudi dels mecanismes d'acció tant de les GAs com de l'àcid abscísic (ABA), pel fet que presenten nivells indetectables d'aquestes hormones i a la vegada mostren una resposta molt elevada i ben caracteritzada. Les cèl.lules de la capa de l'aleurona envolten l'endosperma, i responen a les GAs sintetitzades per l'embrió, acumulant enzims hidrolítics com la  $\alpha$ -amilasa, amb una funció en la mobilització de les reserves acumulades a l'endosperma com a font de nutrients per al nou brot en creixement.

Estudis en aquests sistemes han permès d'identificar diferents missatgers secundaris implicats en transmetre el senyal de GAs des de la membrana plasmàtica al nucli. Aquests missatgers secundaris inclouen proteïna G i diacilglicerol, que actuen en la membrana plasmàtica, així com calci, calmodulina, cGMP, canvis de pH i canvis en el patró de fosforilació de proteïnes, que actuarien com a senyals citosòlics (Bethke et al., 1997). La relació entre aquests diferents missatgers és encara desconeguda i també el seu paper en la resposta d'altres teixits a les GAs. El tractament dels protoplastes de cèl.lules d'aleurona amb un antagonista de la proteïna G té el mateix efecte sobre l'expressió i secreció d'  $\alpha$ -amilasa que els tractaments amb GAs, els inhibidors de l'acció de les proteïnes G abolint aquesta expressió. La concentració citoplasmàtica de  $Ca^{2+}$ , calmodulina (CaM) i cGMP, d'altre banda, es veu incrementada en els protoplastes d'aleurona en resposta al tractament amb GAs (Jon *et al.*, 1998; Penson *et al.*, 1996; Gilroy, 1996; Ritchie i Gilroy, 1998).

Recentment s'ha reportat que el mutant d'arròs *dl*, que presenta un fenotip nan molt semblant al de les plantes deficientes en GAs, és defectiu en la subunitat  $\beta$  de la proteïna G heterotrimèrica ( $G_{\beta}$ ) (Fujisawa *et al.*, 1999; Ashicari *et al.*, 1999). Aquest mutant té una sensibilitat reduïda a les GAs i el seu fenotip es revertit per la mutació *slr* que es descriu més endavant (el doble mutant *dl/slr* presenta un fenotip normal) el que demostraria que en arròs la proteïna G  $\beta$  D1 i SLR actuarien en la mateixa via de senyalització de les GAs. Aquests experiments també han suggerit l'existència d'una via

de senyalització de GAs alternativa, on la proteïna G no hi estaria involucrada i que només respon a concentracions altes de GAs (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2000).

Mitjançant el cribatge d'una llibreria de cDNA de civada, Gubler *et al.* (1995) van aïllar i caracteritzar un factor de transcripció de tipus Myb, anomenat GAMyb, el qual es necessari per a l'activació de la transcripció de l'  $\alpha$ -amilasa. Mitjançant experiments d'expressió transiènt, aquests autors pogueren demostrar que el factor GAMyb activa la transcripció del promotor  $\alpha$ -amilasa fusionat al gen marcador GUS, en absència de GAs. Aquest factor s'uneix a l'element en *cis* "GA-response complex", el qual s'ha demostrat que és necessari i suficient per a la resposta a GAs del promotor de les  $\alpha$ -amilases (Skriver *et al.*, 1991; Gubler i Jacoben, 1992; Rogers *et al.*, 1994). L'expressió de GAMyb es regulada per GAs, el missatger corresponent a aquest gen acumulant-se abans que el de l'  $\alpha$ -amilasa com s'esperaria per un tal factor de transcripció implicat en la regulació d'aquest darrer gen. Aquest factor correspondria doncs a un component terminal de la cascada de senyalització de GAs, essent directament implicat en l'activació de l'expressió gènica (Gubler *et al.*, 1995). Recentment s'ha identificat també una proteïna de civada amb un dit de zinc, la qual s'ha anomenat HRT, que inhibeix l'activació transcripcional del gen  $\alpha$ -amilasa en resposta a les GAs (Raventós *et al.*, 1998).

Malgrat el gran nombre d'esforços realitzats, el receptor cel.lular de les GAs no ha estat encara identificat. Estudis realitzats a les cèl.lules d'aleurona, mitjançant tractaments amb GA<sub>4</sub> immobilitzada a Sepharosa o microinjecció de GAs, han mostrat evidència de al menys un receptor de GAs associat a la part externa de la membrana plasmàtica (Gilroy i Jones, 1994; Hooley *et al.*, 1991). Mitjançant experiments d'afinitat s'han pogut aïllar dos proteïnes de membrana que uneixen GAs i que s'expressen a les cèl.lules d'aleurona i a la tija de moltes espècies vegetals (Lovegrove *et al.*, 1998). Per altre banda, a partir de cèl.lules de l'hipocòtil de cogombre o de llavors de *Azuki* s'ha pogut purificar llurs proteïnes citosòliques que uneixen GAs marcades radioactivament (Keith *et al.*, 1982; Nakajima *et al.*, 1997). Aquestes proteïnes són candidates a ser un segon

tipus de receptors de GAs però no s'ha pogut demostrar la seva funció *in vivo*. Tampoc s'han identificat de moment mutants relacionats amb el receptor de les GAs, molt probablement degut a que aquesta mutació seria letal, sobretot si considerem els resultats recents que suggereixen que aquestes hormones serien essencials pel desenvolupament de la llavor.

Per últim, l'anàlisi genètic de mutants amb nivells endògens de GAs alterats, que no responen a l'aplicació exògena de GAs, ha permès clonar i identificar altres elements addicionals de la via de senyalització de GAs. Aquests mutants han estat classificats en dos grups: insensibles i allargats, i corresponen a gens que funcionen la majoria com a reguladors negatius de la resposta a les GAs.

- **Mutants insensibles:**

Aquests mutants són fenotípicament idèntics als mutants biosintètics deficients en GA, però per aplicació exògena de GAs no reverteixen completament al fenotip salvatge. Aquests mutants tenen afectades la percepció o sensibilitat dels teixits a les GAs, i corresponen a gens implicats en algun pas de la via de transducció del senyal de GAs (Swain i Olzsweski 1996). A *Arabidopsis* s'ha aïllat el mutant insensible *ga insensitive1-1* (*gai1-1*), les mutacions semidominants *rga* (*repressor of GA*) i *short internodes* (*shi*), i els al·lels recessius *pickle* (*pkl*) i *sleepy* (*sly*) que corresponen a components de la via de transducció de les GAs. Apart dels mutants d'*Arabidopsis*, els mutants insensibles més ben caracteritzats són els mutants *D8*, *D9* i *Mpl* de blat de moro (Harberd i Freeling 1989; Winkler i Freeling 1994), el mutant *Rht* de blat (Gale *et al.* 1975), i el mutant *gai* d'ordi (Chandler i Robertson, 1999). Actualment però s'estan caracteritzant molts d'altres mutants insensibles com el *gse* d'ordi, alhora que s'estan trobant proteïnes de la família GRAS com RGA-like (RGL) i RGA1-like d'*Arabidopsis* (Sanchez-Fernandez *et al.*, 1998) i OsGAI d'arròs (Ogawa *et al.*, 2000) per a les que s'ha pogut demostrar un paper en la resposta a GAs.

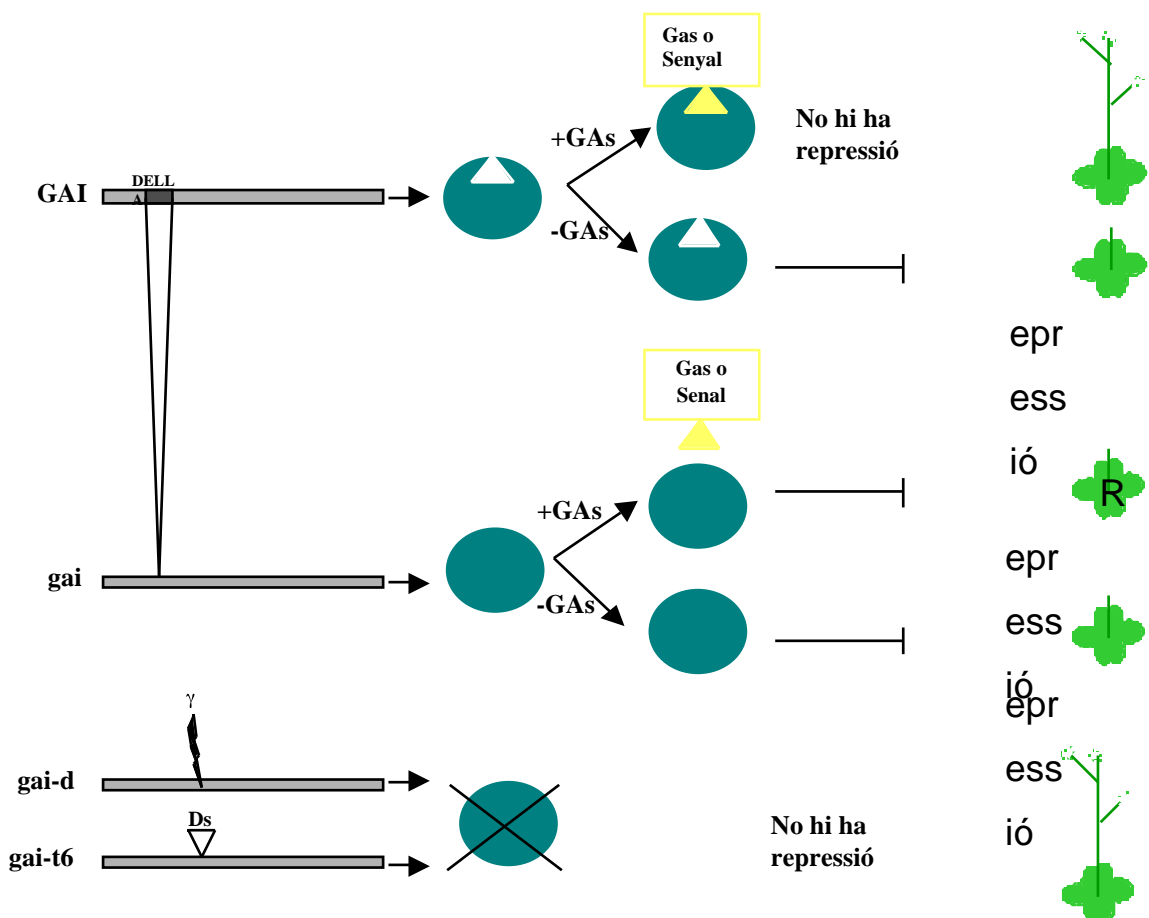
**gai i rga:**

La mutació *gai1-1* d'*Arabidopsis* és semidominant i confereix un fenotip nan amb fulles de color verd fosc molt semblant al del mutant biosintètic *gai1-3* (aquesta mutació afecta al gen CPS i, a l'igual que totes les corresponents als gens biosintètics es recessiva) (Ezura *et al.*, 1995; Koornneef *et al.*, 1985; Peng i Harberd, 1993; Wilsón *et al.*, 1992). A diferència del mutant biosintètic però, *gai1-1* no respon a l'aplicació de exògena de giberel·lines (Koornneef *et al.*, 1985; Wilsón *et al.*, 1992; Wilson i Somerville, 1995). El mutant *gai1-1* conté nivells elevats de GA<sub>4</sub> i GA<sub>1</sub> (Talon *et al.* 1990) i en aquestes plantes els nivells dels transcrits GA 20-oxidasa i 3 -hidroxilasa són superiors al de les plantes salvatges, el que suggereix que la mutació *gai* afecta la regulació per retroalimentació negativa d'aquests gens (Peng *et al.*, 1997). S'ha aïllat el gen responsable de la mutació *gai* i s'ha vist que codifica per una proteïna amb homologia a la part C-terminal amb *scarecrow* (*scr*), un membre de la nova família de reguladors gènics GRAS (Physh *et al.*, 1999). Tots els membres d'aquesta família de proteïnes contenen una regió central VHIID i una regió C-terminal RVER altament conservades. SCARECROW és candidat a ser un factor de transcripció implicat en la regulació del patró de divisió cel·lular durant el desenvolupament de l'arrel. Apart d'aquesta homologia amb SCARECROW, GAI conté característiques estructurals típiques dels reguladors transcripcionals com un senyal de localització nuclear (NLS) i dos motius de tipus LXXLL necessaris per a l'unió de coactivadors transcripcionals als receptors esteroides (Carol *et al.*, 1995; Peng i Harberd, 1993; 1997; Wilsón i Somerville, 1995). La única diferència entre les proteïnes GAI i *gai* mutant és una delecció d'una regió de 17 amino àcids anomenada DELLA a la meitat N-terminal de la proteïna. A més del mutant *gai1-1*, s'han aïllat altres mutacions en aquest gen, les quals es van obtenir per inserció de l'element transponible Ds (*gai-t6*) o per mutagènesis amb raigs- (*gai-d*). Ambdues mutacions donen lloc a una interrupció en la pauta de lectura, i per tant corresponen a mutants nuls. Aquests mutants tenen un fenotip normal, però són més resistents a l'efecte d'inhibidors de la ruta de biosíntesis de GAs com el paclobutrazol (Peng i Harberd, 1993; Wilsón i Somerville, 1995; Peng *et al.*, 1997), per tant, semblaria que necessiten menys GAs que les plantes salvatges per créixer. Aquests resultats indicarien



que GAI actua com a un regulador negatiu en la via de transducció del senyal de les GAs i que la presència de GAs inhibeix l'activitat repressora de GAI. D'altre banda, el fet que la mutació *gai-1* reprimeix de manera constitutiva l'elongació de la tija independentment de la presència de GAs, suggereix que el domini DELLA delecionat en el mutant, és necessari per a la regulació per GAs de l'activitat de GAI. Aquesta regió seria responsable d'unir les GAs o un intermediari en la transducció del

senyal d'aquestes hormones, inhibint l'activitat repressora de GAI. A la figura 10 es mostra un esquema de la funció de la proteïna GAI en la regulació de la resposta a GAs.



**Figura 10. Funció de la proteïna GAI com a regulador negatiu de la resposta a GAs.** En absència de GAs, GAI té una funció repressora de la resposta a GAs. Les GAs s'unirien a la regió DELLA de la proteïna inhibint la seva activitat repressora. La regió DELLA és delectada al mutant *gai-1*, el qual mostra una inhibició constitutiva de la resposta a GAs. Els mutants *gai-d* i *gai-t6* corresponen a mutants nuls. En aquests mutants la resposta a GAs no es troba reprimida.

El locus *RGA* (per *repressor of gal-3*) d'*Arabidopsis* va ser identificat en un criatge de mutants que revertissin el fenotip nan del mutant biosintètic *gal-3*. Tots els al·lels *rga* aïllats fins al moment supprimeixen parcialment el fenotip del mutant *gal-3*, però les llavors del doble mutant *gal-3rga* encara precisen de l'aplicació de GAs per a que germinin. Això suggereix que *RGA* seria un regulador negatiu de la via de transducció del senyal de les GAs en teixit vegetatiu però no en la llavor. D'altra banda, la mutació *rga* supprimeix l'increment en els nivells d'expressió del gen *GA4* als mutants *gal-3*, el que suggereix que *RGA* juga també un paper en la ruta de resposta responsable del control per retroalimentació negativa d'aquest enzim biosintètic. *RGA* i *GAI* presenten entre elles un 83% d'identitat, essent membres de la mateixa família de proteïnes reguladores GRAS. Aquestes dues proteïnes però no tenen funcions fisiològiques idèntiques, doncs s'ha vist que genèticament no són totalment redundants. Estudis d'expressió transient a cèl·lules de l'epidermis de ceba d'aquestes proteïnes fusionades a la GFP van mostrar que eren proteïnes nuclears (Silverstone, 1998). Ambdues proteïnes contenen dos motius LxxLL que a animals s'ha vist que es troben presents als coactivadors dels receptors d'hormones esteroides, jugant un paper en la interacció d'aquestes proteïnes amb el receptor. *RGA* i *GAI* contenen un domini SH2 similar al dels factors de transcripció STATS i un domini DELLA, a l'extrem N-terminal, responsable de regular l'activitat d'aquestes proteïnes en resposta al senyal de GAs. Recentment s'han identificat altres proteïnes de la família GRAS com *RGA-like* (*RGL*) i *RGA1-like* d'*Arabidopsis* o *OsGAI* de ordi que a l'igual que *GAI* i *RGA* contenen aquesta regió DELLA. Tant *RGA* com *GAI* podrien estar actuant com a co-activadors o repressors de la via de transducció del senyal de GAs, a través de la interacció amb altres factors de

transcripció doncs en aquestes proteïnes no s'ha observat un domini d'unió al DNA definit (Sun, 2000).

### **Rht i D8:**

Mutants nans, insensible a GAs i amb nivells elevats de GAs endògenes, similars al mutant *gai1-1* d'*Arabidopsis* han estat també aïllats a d'altres espècies vegetals com per exemple els mutants *Rht1*, *Rht2* i *Rht3* de blat, *D8* i *D9* de blat de moro i *gai* d'ordi (Gale *et al.*, 1975; Lenton *et al.*, 1987; Fujioka *et al.*, 1988; Harberd i Freling, 1989; Talon *et al.*, 1990; Peng i Harberd, 1993; Winkler i Freeling, 1994; Wilsón i Somerville, 1995). La mutació *Rht* de blat és especialment important a nivell agrícola ja que és la base genètica de les varietats de blat parcialment nanes i amb un alt rendiment que han constituït el que s'ha vingut a anomenar la “revolució verda”, (Gale i Youssefian, 1985). S'ha vist que tant el gen *D8* de blat de moro com dos dels loci *Rht* de blat són ortòlegs a *GAI* i *RGA* (Peng *et al.* 1999). Per comparació de les seqüències de totes aquestes proteïnes s'ha pogut identificar un domini anomenat “*SRC Homology 2 phosphotyrosin-binding*” (SH2) present a la família de factors de transcripció STATs (*Signal Transducer and Activators of Transcription*) animals. La funció d'aquest domini és la de mediar la unió de les proteïnes STAT amb varis receptor tirosin-quinases, les quals fosforilen aquests factors de transcripció controlant la seva translocació al nucli. De moment es desconeix si els dominis SH2 són funcionals a plantes, però en cas que ho fossin, els receptors tirosin-quinases jugarien un paper en la transducció del senyal de GAs.

El mutant *D8* presenta petites deleccions internes (que mantenen la pauta de lectura) en el domini DELLA, mentre que els mutants *Rht*, segons la mutació, contenen deleccions similars o una substitució de bases que introdueix un codó de parada en la proteïna. Aquestes mutacions codifiquen proteïnes truncades, el qual s'ha pogut confirmar amb anticossos contra la proteïna nativa RHT. Aquests resultats confirmarien que el domini DELLA a l'extrem N-terminal de la família de proteïnes *GAI/RGA/RHT/D8* és el responsable de modular l'activitat d'aquestes proteïnes en resposta al senyal de les GAs.

### **SHI:**

Aquest mutant semi-dominant es va obtenir per inserció d'un T-DNA 2x35S a la regió promotora del gen *SHI* que resulta en la sobre-expressió del gen. El mutant *shi* mostra un fenotip parcialment nan, que no és revertit per aplicació exògena de GAs, i de fet, aquestes plantes presenten alts nivells de GAs actives (Fridborg *et al.*, 1999). El gen *SHI* codifica un possible factor de transcripció amb un dit de zinc. La sobreexpressió de *SHI* regula negativament la resposta de GA, bé actuant com a repressor de la transcripció de gens de resposta de GA o bé estimulant la transcripció de gens reguladors negatius d'aquesta resposta. L'obtenció d'un mutant amb pèrdua de funció permetrà confirmar el paper de SHI en la senyalització de GA, ja que la sobreexpressió ectòpica de *SHI* podria generar interaccions noves i inapropiades de SHI amb altres proteïnes o promotors implicats en la resposta a GAs.

### **Pickle:**

El mutant *pickle* (*pkl*) es va aïllar en un crivellatge de mutants amb alteracions en el desenvolupament de l'arrel (Ogas *et al.*, 1997). Els mutants *pkl* tenen un fenotip semblant als mutants deficients en GAs o amb una resposta reduïda a les GAs, amb internodes curts, fulles verd fosc, pèrdua de dominància apical i retard en el temps de floració. El fenotip d'aquest mutant s'accentua per deficiència en GA i es recupera parcialment per tractament amb GA exògenes. Aquests resultats suggereixen que PKL podria estar actuant com a regulador positiu en de la via de senyalització de les GAs. El doble mutant *pkl gai* mostra un fenotip més sever que els mutants senzills, el que suggereix que aquestes dues mutacions afectarien a diferents vies de senyalització de les GAs. *Pkl* mostra a més a més un fenotip defectiu a les arrels que no s'ha observat ni als mutant deficient en GAs ni a d'altres mutants amb una resposta a GAs alterada, suggerint que PKL mediarà diferenciació de les arrels durant la formació de l'embrió i germinació de la llavor. La proteïna PKL conté seqüències homòlogues al repressor

CHD3 (per Chromo (chromatin-organization modifier) Domain, un domini “helicase/ATPase”, i un domini “DNA-binding”), “chromatin-remodeling factor”, que regula l’expressió gènica mitjançant la repressió de la transcripció (Ogas et al., 1999).

### *sleepy1*

La mutació recessiva *sleepy1* (*sly1*) es va identificar com a una mutació capaç de revertir la mutació *abil-1* (insensible a l’ABA), requerint nivells baixos de GAs per a germinar (Steber *et al.*, 1998). Les alteracions fenotípiques d’aquest mutant són semblants a les dels mutants deficients en GAs, però no reverteixen per aplicació de GAs, el que indica que la proteïna SLY1 és necessària per a la resposta de GAs. Per altre part, les llavors mutants *sly1* no germinen en un fons salvatge pel locus *ABII*. Per tant, els mutants *sleepy1* representarien un tipus de mutant en la resposta a GAs no aïllats fins ara, que no germinen a no ser que al mateix temps presentin un defecte en la resposta o síntesi d’ABA.

- **Mutants allargats:**

Els mutants allargats estan causats per mutacions recessives i tenen un fenotip semblant al de les plantes salvatges tractades amb concentracions saturants de GAs, caracteritzat per llargs pecíols, fulles de color verd pàlid, entre nusos allargats, desenvolupament partenocàrpic del fruit en el cas de les dicotiledònies, i escassa producció de pol·len amb baixa fertilitat, tot i que presenten nivells reduïts de GAs. Aquests mutants són alhora insensibles a GAs exògenes i resistents als inhibidors de la ruta biosintètica de les GAs. Per tant, es comporten com si estiguessin sobresaturats en aquestes hormones.

Els mutants més estudiats són el *la* i *cry* de pèsol, *pro* de tomàquet, *sln* d’ordi (Chandler, 1988) i *spy* d’*Arabidopsis* (Jacobsen, 1993). A *Arabidopsis* també s’han identificat els mutants recessius *gai* i el mutant *rga* (*repressor of gal-3*) (Silverstone *et*

*al.*, 1997). Recentment, s'han caracteritzats altres mutants amb aquestes característiques com *goe1*, *goe2* i *goe3* (*per GASA Over-Expressed*) (Raventós et al., 2000).

### SLN:

El mutant *sln* d'ordi mostra un creixement excessiu de les beines de les fulles i dels entrenusos de la tija, i està completament saturat en la resposta de creixement induïda per GAs (Chandler, 1988; Lanahan i Ho, 1988). Aquest mutant és insensible a l'aplicació exògena de GAs, i té nivells reduïts de GA<sub>1</sub>, GA<sub>20</sub> i GA<sub>3</sub> però acumula GA<sub>19</sub> (Crocker *et al.*, 1990). El creuament del mutant *sln* amb mutants deficients en la síntesi de GAs no altera el fenotip de les plantes homozigotes *sln*, el que suggereix que la proteïna SLN és crítica per a una correcta senyalització de GAs (Swain i Olszwesky, 1996). La mutació *sln* és epistàtica amb la mutació *gse*, el que indica que SLN està actuant més avall en la ruta de senyalització de les GAs.

Actualment, s'han aïllat els ortòlegs de RGA i GAI a civada i arròs, els quals s'han anomenat SLN i SLR. La mutació d'aquests locus mostren un fenotip allargat com si presentessin una des-repressió constitutiva de la senyalització de les GAs. El mutant *slr* arròs reverteix el fenotip nan dels mutants *dl*, deficients en la proteïna heterotrimèrica G . El doble mutant *slr/dl* té un fenotip allargat igual al del mutant *slr*, demostrant que SLR i D1 participarien en la mateixa via de senyalització de les GAs, però mentres que D1 seria un activador del senyal de GAs, SLR és un regulador negatiu de la resposta a les GAs.

### SPY:

Aquest mutant es va identificar mitjançant el crivellatge de mutants d'Arabidopsis que tenien la capacitat de germinar en presència de l'inhibidor de la biosíntesi de GAs paclobutazol (Jacobsen *et al.*, 1996). La mutació *spy* suprimeix parcialment el fenotip *gal-3* i presenta un fenotip semblant al d'una planta salvatge tractada amb GAs. Aquest

resultats suggereixen que SPY està actuant com a un regulador negatiu en resposta a les GAs. Tot i això, la resposta a GAs del mutant *spy* no es totalment saturada, i les plantes responen encara a l'aplicació exògena de GAs. La mutació *spy* suprimeix, d'altre banda, parcialment el fenotip dels mutants *gai*, revertint els alts nivells d'acumulació dels transcrits GA 20-oxidasa i GA 3 -hidroxilasa i els elevats nivells de GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub> d'aquestes plantes. Aquests resultats suggereixen que els productes gènics del loci *GAI* i *SPY* estan implicats en la mateixa via de transducció de senyal de les GAs, i que SPY estaria actuant abans que GAI en aquesta via (Swain i Olszewski, 1996).

Mes recentment, s'ha aïllat l'ortòleg de SPY a civada, el qual s'ha anomenat HvSPY. L'expressió de HvSPY als mutants *spy* d'*Arabidopsis* complementa la mutació. Mitjançant expressió transitòria en cèl.lules d'aleurona, per co-bombardeig de HvSPY fusionat a un promotor constitutiu i del promotor del gen -amilasa fusionat a GUS, s'ha demostrat que HvSPY bloqueja l'expressió regulada per GAs del promotor -amilasa, indicant que és un regulador negatiu del senyal de les GAs (Robertson *et al.*, 1998).

*SPY* i HvSPY contenen deu còpies del motiu TPR (*tetratricopeptide repeat*) a l'extrem N-terminal de la proteïna i un domini catalític a l'extrem C-terminal amb un elevat grau de similitud a nivell de seqüència amino acídica amb les *protein Ser/Thr O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferases* (OGTs) de rates i humans. A animals, s'ha vist que les proteïnes OGTs actuen, tant al citosol com al nucli de les cèl.lules, modificant proteïnes diana per *N*-acetil *O*-glicosilació de residus Ser i/o Thr. Aquesta modificació, per altre banda, s'ha vist que modula l'activitat de la proteïna de manera semblant a com ho fa la fosforilació. Tot i que no hi ha un consens estricte per al lloc de modificació, molts d'aquests llocs coincideixen amb els reconeguts per les Ser/Thr-quinases, ambdues modificacions competint a l'hora de regular l'activitat de la proteïna. D'altre banda, s'ha vist que l'especificitat de substracte vindria donada per l'interacció amb el domini TPR a la regió N-terminal de les OGTs. A animals, les proteïnes OGTs actuen com a proteïnes reguladores que participen en la transducció de diferents senyals, alterant la localització subcel.lular, l'estat de fosforilació, la interacció amb altres

proteïnes i l'estabilitat de les proteïnes diana, en resposta a estímuls externs i durant el cicle cel·lular. Hi han evidències que suggereixen que la modificació per O-GlcNAcetilació juga un paper important en l'import nuclear de les proteïnes, actuant com una senyal de retenció a nucli d'aquestes.

Anàlisis genètics van indicar que tant domini TPR com el possible domini catalític participen en la transducció del senyal de GAs. De fet, tant GAI com RGA tenen regions riques en Thr i Ser que podrien ser dianes de O-GlcNAc transferases. Així, es possible que SPY pugui modificar RGA i/o GAI mitjançant la transferència d'un grup GlcNAc, responsable d'activar aquestes proteïnes, i induir la seva acumulació al nucli a on actuarien reprimint gens implicats en la resposta de GAs. Un augment en els nivells de GAs podria inactivar aquests repressors a través de l'eliminació del grup GlcNAc (Jacobsen *et al.*, 1996) i conseqüentment induir la resposta de la planta a GAs. De moment però, no s'ha confirmat que l'activitat OGT de SPY modifiqui les proteïnes GAI i RGA a plantes.

D'altre banda, s'ha descrit el gen *GRS* (per *GAI-related sequence*) amb una 82 % d'identitat amb *GAI*, que conté tots els dominis característics descrits per *GAI*, i que recentment s'ha vist que correspon a *RGA* (per *repressor de gal-3*). *Rga* junt amb *spy* es van identificar com a mutacions que suprimeixen el fenotip del mutant deficient en giberel·lines *gal-3*. La pèrdua de funció de *RGA/GRS* i de *SPY* produeix un mutant amb un fenotip allargat, que és resistent a l'acció dels inhibidors de la síntesi de GAs (Peng *et al.*, 1997). El doble mutant *spy/rga* presenta un fenotip encara més acusat que les mutacions senzilles, el que indicaria que *RGA* i *SPY* són reguladors transcripcionals que reprimeixen la senyalització de les GAs per dues vies diferents.

Per últim, s'han aïllat dos mutants dominants anomenats *gar2* i *gar1-1* que actuen, a l'igual que el mutant *spy*, com a supressors extragènics de la mutació *gai* (Carol *et al.*, 1995; Wilsón i Somerville, 1995). S'ha vist que els efectes de *spy* i *gar2* són additius i que la combinació d'aquestes dues mutacions suprimeix el fenotip i els nivells elevats de GAs dels mutants *gai*, igualant-los als d'una planta salvatge. La dominància d'aquestes dues noves mutacions dificulta, per ara, la predicció de quina podria ser la funció de *GAR*



dins la via de resposta a GAs. La combinació de les mutacions *la* i *cry* de pèsol resulta en el mateix fenotip que les mutacions *gar2* i *gar1-1* (Potts *et al.*, 1985). Per aquests loci, d'altre banda, s'han obtingut evidències de que participarien també en la via de transducció del fitocrom (Murfet, 1990).

Recentment s'ha caracteritzat un mutant recessiu addicional d'*Arabidopsis*, designat com a *ear1* (*early flowering 1*), que presenta un fenotip semblant als mutants *phyB* y *spy*, amb fulles verd pàl·lid, pecíols allargats i floració avançada, en comparació a les plantes salvatges. Aquest mutant, a més a més, es capaç de germinar en presència de paclobutrazol, el que suggereix que EAF1 actuaria com a un repressor de la resposta a GAs en els processos de germinació i la floració, afectant bé els nivells de GAs, bé la resposta a aquestes hormones (Scott *et al.*, 1999).

Mitjançant l'anàlisi de gens induïts per GAs, s'han aïllat també altres possibles components de la via de senyalització d'aquestes hormones, com Os-TMK una “*leucine-rich repeat receptor-like protein kinase*” d'arròs que interacciona amb una proteïna quinasa tipus 2C associada a la fosfatasa Os-KAPP, fosforilant-la (van der Knaap *et al.*, 1999). Una altre gen activat per GAs es el gen *Os-GRF* d'arròs, el qual es va aïllar per Differential Display. Aquest gen codifica una proteïna nuclear amb motius similars als dels factors de transcripció, la sobre-expressió de la qual inhibeix l'elongació de la planta i aquest fenotip no es recupera per aplicació exògena de GAs (van der Knaap *et al.*, 2000). La funció d'aquests gens en la via de senyalització de les GAs és però encara desconeguda.

### **Model esquemàtic de la transducció del senyal de GAs:**

Fins al moment, s'han proposat diferents models que intentarien explicar les diferents funcions i llocs d'acció dels varis components intermediaris per als que es té evidència de

la seva participació en la via de senyalització de les GAs. A la Figura 11, es presenta el model de senyalització en la actualitat més acceptat, tenint en compte els resultats obtinguts als diferents laboratoris.

Els estudis realitzats en cèl.lules d'aleurona han mostrat evidències convincentes d'una localització a la membrana plasmàtica del receptor de GAs, associat a la part externa de la membrana. El reconeixement de les GAs per part d'aquest receptor activaria la via de transducció responsable de mediar la resposta a aquestes hormones via la proteïna heterotrimèrica G, la qual és un bon candidat per a percebre el senyal produït pel receptor. Missatgers secundaris com el  $Ca^{2+}$ , la calmodulina (CaM), el cGMP, el pH i una cascada de fosforilació de proteïnes serien aleshores les responsables de transmetre aquesta resposta al citosol. Els resultats obtinguts amb els mutants *dl* d'arròs (deficients en la proteïna heterotrimèrica G), mostraren que hi hauria també una via alternativa a la de la proteïna G, menys sensible a les GAs que aquesta, doncs els mutants *dl*, malgrat mostrar una reducció en la sensibilitat a les GAs, no són totalment insensibles a aquestes hormones. L'anàlisi de mutants amb una resposta alterada a GAs ha suggerit que *SLY1* i possiblement *PKL* possiblement actuen com a activadors en la via de senyalització de les GAs, però el seu paper exacte i posició en la via no s'ha pogut encara determinar. La via acabaria amb l'activació dels gens que codifiquen pels factors de transcripció implicats en la inducció dels gens regulats per GAs, com el *GAMyB* de civada, que s'uneix al promotor del gen *-amilasa* activant la seva transcripció. Apart del gen *-amilasa*, altres gens regulats per GAs són per exemple els gens *GAST-1/GASA* de tomàquet i *Arabidopsis*, els gens  *$\gamma$ -TIP (Tonoplast Intrinsic Protein)* d'*Arabidopsis* amb una funció en l'elongació cel.lular, l'*expansina* d'arròs, els gens de biosíntesi de les GAs, i alguns dels gens activadors de la floració i de la formació dels tricomes com *LEAFY* i *GLABROUS1* d'*Arabidopsis*.

D'altre banda, la similitud de *GAI* i *RGA* amb factors reguladors de la transcripció i la seva localització nuclear, suggereix que aquestes proteïnes tindrien una funció reguladora de l'expressió gènica, actuant com a reguladors negatius de la resposta a GAs, o bé directament o bé a través de la interacció amb altres proteïnes. Com hem vist

---

anteriorment, el lloc d'acció de SPY es localitzaria abans que els de GAI i RGA en la via de transducció del senyal de GAs, doncs el fenotip del mutant *gai* es suprimit per la mutació *spy*. D'altre banda, la funció de SPY es requerida per a l'activitat de GAI i RGA. Tots tres gens juguen un paper important en la via de resposta de les GAs, tant en el referent a l'elongació i creixement de la planta com en la regulació per retroalimentació negativa dels gens biosintètics, que com hem vist abans semblarien estar regulats per la mateixa via de transducció que les respostes d'elongació i creixement de la planta.

L'existència de llocs rics en Ser i Thr propers a residus Pro, Val o residus acídics (aquests residus comprenen llocs de modificació típics per OGTs) a les proteïnes GAI i RGS suggereixen que SPY podria actuar sobre aquestes proteïnes, modificant-les mitjançant la transferència d'un grup GlcNAc, per tal de regular la seva activitat. A l'igual que SHI, GAI i RGA, SPY actua com a un regulador negatiu de la via de senyalització de les GAs. Per tant, la funció de SPY podria ser la de activar o estabilitzar GAI i RGA, o la de facilitar en absència de GAs la localització nuclear d'aquestes proteïnes, per medi d'una alteració en les interaccions proteïna-proteïna en que participen i/o competint per a la seva fosforilació. En presència de GAs, s'inhibiria l'activitat SPY, i per tant el senyal activador dels repressors GAI i RGA. Aquestes proteïnes serien aleshores inactivades per fosforilació o per activació d'una N-acetilglucosaminasa que trauria els grups GlcNAc dels residus de Ser i Thr, deixant-los accessibles per a ser fosforilats.

S'ha vist que SHI, PKL i GAMBYB són proteïnes nuclears. Per tant, aquestes proteïnes podrien estar interaccionant amb les proteïnes GAI i RGA també nuclears, formant un complex proteic responsable de reprimir SHI o activar PKL o GAMBYB, en presència de GAs. Estudis d'epistàsia, conjuntament amb estudis bioquímics i estudis derivats de l'anàlisi de nous mutants o de la caracterització de components addicionals de la via, permetran en un futur conèixer millor la relació entre aquests diferents components així com identificar components nous en la via, completant així la via que aquí es presenta.

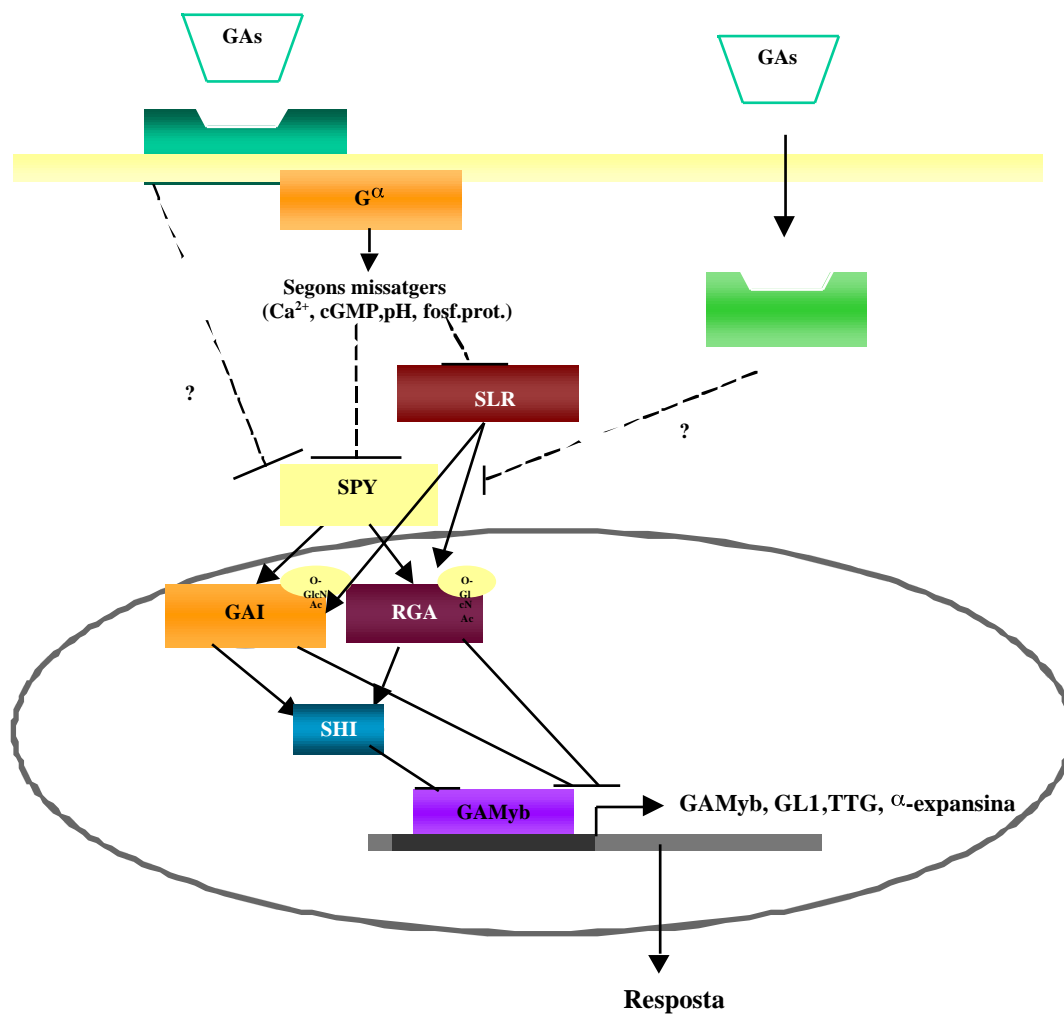


Figura 11. Model esquemàtic de la transducció de senyal de GAs.



## **2. OBJECTIUS**

---

## OBJECTIUS

---

Els resultats obtinguts en experiments d'empelts entre plantes induïdes i no induïdes per a la tuberització van posar de manifest l'existència d'un senyal inductor de la tuberització que era produït a les fulles de les plantes induïdes i transportat als estolons per a induir la formació de tubèrculs. La naturalesa exacta d'aquest senyal inductor és encara desconeguda tot i que, d'ençà que es va demostrar la seva existència, s'han realitzat multitud d'estudis per a la seva caracterització. S'ha demostrat que PHYB és el fitocrom responsable del control fotoperiòdic de la tuberització. Aquest fotoreceptor actua inhibint la formació de tubèrculs en condicions no inductores de LD o de SD+NB, ja que controla la síntesi d'un senyal inhibidor transmissible que en condicions no-inductores bloqueja la tuberització. S'ha demostrat que les hormones giberel·lines tenen un efecte inhibitori sobre el procés de tuberització. Durant la formació de tubèrculs, el contingut de GAs disminueix a la punta de l'estoló, havent-se observat que les condicions que afavoreixen la tuberització es correlacionen amb una disminució en el contingut de GAs de la planta. D'altra banda, la observació que les plantes antisentit pel PHYB, a més de tuberitzar en LD, mostren un fenotip allargat, semblaria indicar que PHYB té un efecte regulador sobre la síntesi o l'acció de les GAs. Així doncs, PHYB podria, en condicions no inductores, inhibir la tuberització a través de la regulació de la biosíntesi o de la sensibilitat a les GAs, o també estimulants el transport a l'estoló de les GAs sintetitzades a les fulles, o bé d'algun regulador de la biosíntesi de GAs, sent aquest el possible senyal transmissible inhibidor de la tuberització regulat per PHYB. Per altre part, els resultats actuals indiquen que la inducció de la tuberització ve determinada no només per un únic senyal sinó per un balanç entre senyals inductors i inhibidors diferents, sent el producte d'aquest balanç el responsable de la inducció o no de la formació de tubercles.

Per tal d'obtenir evidència sobre quina podria ser la naturalesa dels estímuls inductor e inhibidor de la tuberització, al nostre laboratori es van comparar, mitjançant la tècnica de “RT-PCR *Differential Display*”, els patrons d'expressió de mRNAs a fulles de plantes de patatera *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (estrictament fotoperiòdiques per a la formació de tubèrculs), crescudes en condicions inductores (SD) i no-inductores (SD+NB) per a la tuberització. Aquests estudis van portar a l'aïllament del clon de cDNA *PHOR1*, que codifica un missatger que s'expressa més abundantment a les fulles de plantes crescudes en condicions inductores de la tuberització (SD). Les plantes transgèniques portadores d'una construcció antisentit pel gen *PHOR1* varen mostrar un fenotip semi-nan característic, degut a la reducció en les distàncies dels entrenusos, en SD aquestes plantes formaren tubèrculs abans i donaren un nombre major de tubèrculs que les plantes salvatges. El fenotip de les plantes antisentit recordava a l'observat en les plantes transgèniques portadores d'una construcció antisentit pel gen *StGA20ox1* que codifica l'enzim GA 20-oxidasa (Carrera *et al.*, 2000), pel que ens plantejarem si *PHOR1* podria estar actuant com un regulador de les GAs. Estudis teòrics predeien, d'altre banda, que *PHOR1* podria correspondre a una proteïna associada a la membrana cel.lular, amb un domini central integrat dins la membrana plasmàtica. Aquesta predicció resultava força encoratjadora ja que suggeria que *PHOR1* podria correspondre a un intermediari en la via de transducció del senyal associat al receptor de GAs, o amb una funció molt propera al receptor. Tenint en consideració aquests antecedents, ens vàrem plantejar d'obtenir dades experimentals sobre la proteïna que ens permetessin determinar quina era la seva funció tant en relació a les hormones GAs com al control fotoperiòdic de la tuberització.

Ens vàrem plantejar doncs els següents objectius parcials:

1. Determinar la localització subcel.lular de la proteïna *PHOR1* mitjançant immunodetecció amb anticossos específics i/o transformació de cèl.lules de tabac amb una fusió a la proteïna fluorescent GFP (*green fluorescent protein*).

Amb aquesta finalitat es varen obtenir antisèrums específics en front de les meitats N-terminal i C-terminal de la proteïna, els quals van ser utilitzats en assajos *western* per a detectar la proteïna en diferents fraccions subcel.lulars i també en estudis de microscopia electrònica.



---

Per altre banda, es van transformar cèl.lules BY2 de tabac amb la construcció  $2x35S$ -PHOR1:GFP, detectant la localització subcel.lular fluorescència emesa per la proteïna fluorescent GFP. Es varen preparar diferents deleccions de la proteïna, per tal d'estudiar quines regions són les que determinen la localització subcel.lular de PHOR1.

2. Estudiar quina relació existeix entre el fenotip que presenten les plantes antisentit pel gen *PHOR1* i les GAs.

A tal fi es va determinar l'efecte de l'aplicació de GAs sobre el fenotip semi-nan de les plantes trangèniques amb nivells d'expressió reduïts de PHOR1. Es van obtenir corbes dosi-resposta a diferents concentracions de  $GA_3$  tant a les plantes antisentit com a les plantes salvatges, per tal de determinar la capacitat de resposta a les GAs de les plantes amb nivells reduïts d'expressió de la proteïna PHOR1. S'analitzaren els nivells endògens de GAs en aquestes plantes, així com els nivells d'expressió dels transcrits *StGA20ox1* i *StGA2ox*, els quals són negativa i positivament regulats per  $GA_1$ .

3. Obtenir plantes trangèniques de patatera que sobre-exprimin la proteïna de fusió PHOR1:GFP.

Aquestes plantes van ser utilitzades per a confirmar la localització subcel.lular de la proteïna "*in vivo*", mitjançant l'anàlisi de la fluorescència emesa per la proteïna PHOR1:GFP. Al mateix temps, es va estudiar el fenotip d'aquestes plantes, quan a l'allargament de la tija, per tal de confirmar que PHOR1 tenia una funció en la senyalització de GAs.

4. Identificar mitjançant experiments de "doble-híbrid" a llevat, proteïnes que interaccionin específicament amb PHOR1.

Es va utilitzar una llibreria de cDNA de tomàquet fusionada al domini GAL4AD, la qual s'havia pre-transformat a una soca de llevat compatible amb la soca portadora de la construcció PHOR1-GAL4BD. Les dues soques es van conjuguar i els diploids es creixeren en medi selectiu. Els clons de cDNA aïllats es van comparar amb les seqüències dipositades als bancs de dades i es determinà el patró d'expressió dels missatgers corresponents a aquests clons en plantes induïdes i no-induïdes per a la

## OBJECTIUS

---

tuberització, per tal de obtenir noves dades que donin idea sobre la possible funció i mecanisme d'acció de PHOR1.

### **3. MATERIALS I MÈTODES**

---

# MATERIALS I MÈTODES

---

## 1. Material vegetal

S'han emprat plantes de patatera *Solanum tuberosum* ssp *andigena* de la línia 7540 controls i transgèniques portadores de una construcció antisentit pel cDNA *PHORI* (Monte, 1998), plantes *Solanum demissum* i plantes del mutant nan *gal*, mantenint-les *in vitro* en medi MS (Murashige i Skoog, 1962) amb un 2% de sacarosa. Quan les plantes presentaren arrels ben desenvolupades es van passar a terra, afegint 1 part de sorra per 3 parts de terra per a un millor drenatge. Tant *in vitro* com a terra les plantes es creixeren a 22°C, sota un dels tres tipus de fotoperíode: LD (no formen tubercles), SD (tuberitzen) o SD+NB (no tuberitzen). El LD correspon a 16h de llum i 8h de fosc, el SD 8h de llum i 16h de fosc, i el SD+NB és igual que el SD però amb una interrupció de 15 minuts del període de fosc amb llum blanca a la meitat de la nit.

## 2 Soques bacterianes i plasmidis

Les soques bacterianes i plasmidis emprats es presenten a la Taula 1:

**Taula 1. Soques bacterianes i vectors de clonació.**

Soques bacterianes i plasmidis	Utilització	Referència o font
<i>E. coli</i> K-12 DH5	Subclonatge de fragments de DNA	Hannahan (1983)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Infecció de fags	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expressió de proteïnes	Stratagene
<i>A. tumefaciens</i> GV2260, C58:C1 Rif <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup>	Soca d'Agrobacteri per a la transformació de plantes. És portadora dels gens de virulència en un plasmidi (Cb <sup>r</sup> )	Simoens <i>et al.</i> (1986)
pGEM-T-easy Amp <sup>r</sup>	Plasmidi pel clonatge de productes de PCR	Promega
pBSK(-)/pBKS(-) Amp <sup>r</sup>	Plasmidi pel clonatge de fragments de DNA	Stratagene
pET-28 Km <sup>r</sup>	Vector d'expressió de proteïnes	Novagen
PET-23 Amp <sup>r</sup>	Vector d'expressió de proteïnes	Novagen
pZEX Amp <sup>r</sup>	Vector d'expressió de proteïnes fusionades a la proteïna GST. Derivat del pGEX-2T	Pharmacia
pBin19 Km <sup>r</sup>	Vector binari per a la transformació de plantes	Bevan <i>et al.</i> (1984)
PUC-GFP S65C/T Amp <sup>r</sup>	pUC amb el doble promotor 35S de CaMV, la <i>green fluorescent protein</i> (GFP) i el terminador PA 35S. Vector d'expressió de proteïnes fusionades a la GFP a cèl.lules vegetals	Reichel <i>et al.</i> (1996)
PCAMBIA 1304 Km <sup>r</sup>	Vector binari amb el promotor 35S del CaMV, les proteïnes GFP i GUS (fusionades en fase) i el terminador PA Nos. Vector d'expressió de proteïnes fusionades a GFP i GUS per a cèl.lules vegetals	CAMBIA

### 3. Extracció i anàlisi de RNA.

#### 3.1 Extracció de RNA pel mètode del tampó Z6.

S'ha extret el RNA total de plantes de patata *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* pel mètode del tampó Z6, descrit per Logemann *et al.* (1987). Aquest tampó desnaturalitzant permet inactivar les ribonucleases endògenes durant el procés d'extracció del mRNA del teixit i preservar la qualitat del RNA. Alhora, la degradació del mRNA extret s'evita tractant amb l'inhibidor de RNAses DEPC, tant l'aigua dels tampons emprats en la precipitació així com la dels utilitzats en la purificació posterior del mRNA. El DEPC és incompatible amb el tampó Tris. En aquells casos en que el tampó conté Tris, s'ha de tractar abans l'aigua i els recipients a utilitzar i preparar el tampó en condicions lliures de RNAses. El material vegetal es congela directament en N<sub>2</sub> líquid i es guarda a -80°C fins a ser utilitzat. El teixit pre-triturat i congelat en N<sub>2</sub> líquid es col·loca a l'interior d'un tub eppendorf ocupant unes 2/3 parts del volum del tub.

1. Es refreda l'èmbol de l'homogenitzador amb N<sub>2</sub> líquid i es tritura el teixit per tal d'aconseguir una pols fina. S'afegeixen 200 µL de tampó Z6 i 20 µL de β-mercaptoetanol. Es continua triturant fins a descongelar el teixit vegetal.
2. S'addicionen 200 µL més de tampó Z6 i es continua l'homogenització del teixit.
3. S'afegeixen 400 µL de la mescla fenol/CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílic (25:24:1), s'agita vigorosament amb el vòrtex i es deixa en gel. Centrifugar a 4°C durant 30 a 45 min a 13,000 rpm.
4. Al sobrenadant aquós transferit a un altre tub, s'afegeix una dècima part d'àcid acètic 1M i un volum d'etanol al 100%. Es deixa precipitant el RNA a -20°C o/n o bé 30 minuts a -80°C. Es centrifuga durant 15 minuts a 13,000 rpm a temperatura ambient.
5. Es descarta el sobrenadant i es renta el precipitat amb 500 µL d'etanol 70%.
6. Es centrifuga de nou i es descarta el sobrenadant. S'afegeixen 200 µL d'acetat sòdic 3M pH 5,2, s'agita vigorosament al vòrtex per tal de desprendre el pellet de les parets i disgregar-lo. És important rentar bé el pellet amb la solució d'acetat sòdic, per tal d'eliminar els polisacàrids que co-precipiten amb el RNA.
7. Després de centrifugar, es descarta el sobrenadant i es renta novament el precipitat amb 500 µL d'etanol 70%.

8. Es resuspèn el sediment en 100 µL d'aigua tractada amb DEPC. Es pot escalfar a 65°C durant 5 minuts per tal d'acabar de dissoldre el sediment i es centrifuga dos minuts. Es passa el sobrenedant a un altre tub i es mesura la concentració al UV en espectrofotòmetre ( $1\text{OD}_{260}=40\ \mu\text{g/mL}$ ; la relació  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ha de ser entre 1,8-2,0).
- H<sub>2</sub>O tractada amb DEPC: S'afegeixen 500 µL de DEPC, prèviament dissolts en 5 mL d'etanol 100%, en 500 mL d'aigua Milli-Q. S'agita durant 2 hores-o/n i s'autoclava 20 min dues vegades per tal d'eliminar completament el DEPC. Totes les solucions que no contenen Tris, fora del tampó Z6, s'han de preparar amb H<sub>2</sub>O tractada amb DEPC.
- Tampó Z6: 8 M Clorhidrat de guanidini, 20mM MES pH 7, 20mM EDTA.

### 3.2 Purificació de RNA poli A+ amb partícules magnètiques

La purificació del RNA missatger a partir de RNA total s'ha fet utilitzant partícules magnètiques Dynabead oligo (dT)<sub>25</sub> (Dyna, Oslo), basant-se en la presència d'una seqüència poliadenilada en l'extrem 3' de la majoria de mRNAs eucariòtics. El RNA poli (A<sup>+</sup>) es captura i purifica utilitzant esferes magnètiques portadores d'un poli (T)<sub>25</sub> complementari, amb una capacitat de 50 µg mRNA/ml Dynabeads. Amb aquest mètode es pot aïllar 1 µg de poli A<sup>+</sup> (el RNA missatger representa entre 1-5% del RNA total) fent servir 100 µl de Dynabeads, depenent del teixit o tipus cel·lular.

1. En un tub col·locar 75 µg de RNA total en un volum final de 100 µl d'aigua DEPC.
2. Incubar 2 minuts a 65°C.
3. Mentrestant, resuspendre les Dynabeads per agitació al vòrtex.
4. Prendre 200 µl de Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub>, capturar-les amb l'imant i rentar amb 2x Binding buffer. Resuspendre en 100 µl de 2x Binding buffer.
5. Barrejar les Dynabeads en 100 µl de 2x Binding buffer amb el RNA total i deixar 15-30 minuts a temperatura ambient amb agitació suau.
6. Separar el sobrenedant en l'imant i rentar les esferes magnètiques tres cops amb 1 ml de Washing buffer.
7. Separar de nou el sobrenedant i eluir el RNA poliA<sup>+</sup> de les Dynabeads amb 10-20 µl de Elution buffer escalfant 2' a 65°C.

9. Mesurar la concentració d'una dilució 1/10 del RNA poliA<sup>+</sup> a l'espectrofotòmetre (OD<sub>260</sub>).

En tots els casos on es vol separar el sobrenedant de les Dynabeads, col·locar el tub en el suport magnètic del Kit (DynaL MPC), durant 30 segons, temps suficient per a que totes les partícules s'adhereixin a la paret del tub orientada cap a l'imant.

- 2x Binding buffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA.
- Washing buffer: 10 mM Tris-HCL, 0,2 M LiCl, 1 mM EDTA
- Elution buffer: 20 mM EDTA.

### **3.3 Anàlisi de RNA per northern blot i transferència a una membrana de niló.**

S'ha seguit el mètode descrit per Lehrach *et al.* (1977). Per a l'electroforesi de RNA s'han emprat gels del 1,2% d'agarosa-formaldehid. Les mostres es preparen barrejant 30 µL de formamida desionitzada, 9 µL de solució de formaldehid 37,5%, 6 µL del tampó 10xMEN, 1µL d'una solució 1mg/mL de BrEt i 15-30 µg de RNA total ó 0,5-2 µg poli(A<sup>+</sup>) RNA en 30 µL d'aigua. Les mostres es desnaturalitzen 15 min a 65°C i es mantenen en gel fins al moment de carregar-les.

**Preparació del gel:** Es fonen 1,8 g d'agarosa en 111 mL d'aigua, es deixa refredar fins a aproximadament 65°C i s'afegeix 15mL de tampó 10xMEN i 24mL de solució de formaldehid al 37,5%. S'aboca en el motlle del gel al que s'ha posat la pinta per formar els pous i es deixa refredar. Un cop solidificat el gel es cobreix per sota dels pous amb un tros de paper plàstic per evitar l'evaporació del formaldehid. El tampó d'electroforesi és 1xMEN, que s'afegeix fins al nivell del gel, sense arribar a cobrir-lo. S'afegeix tampó de càrrega d'electroforesi que conté xilècianol i blau de bromfenol en un dels pous per veure l'evolució de l'electroforesi.

Tampó 10xMEN: 200 mM MOPS pH 7, 50 mM acetat sòdic, 10 mM EDTA. Equilibrar amb NaOH.

### **3.4 Transferència a membrana de niló.**



Després de l'electroforesi, el gel de RNA es renta amb aigua durant 10 min, per tal d'eliminar l'excés de formaldehid. Es fotografia en un transil·luminador UV i es procedeix a transferir el RNA a una membrana de niló, per capil·laritat i en presència d'un tampó d'elevada força iònica (10xSSC).

1. Es col·loca el gel invertit en un tros de paper Whatman 3MM, que fa de pont per a l'absorció per capil·laritat del tampó de transferència d'alta força iònica 10xSSC. El paper ha estat prèviament mullat amb el tampó i el gel també s'ha submergit en aquest tampó. S'eliminen les bombolles amb l'ajut d'una vareta de vidre.
2. Humitejar la membrana de niló de la mida del gel en aigua i col·locar-la sobre el gel, eliminant les bombolles de la manera descrita anteriorment.
3. Humitejar un paper Whatman 3MM de la mida del gel, col·locar-lo sobre la membrana de niló i eliminar les bombolles.
4. Afegir dos papers Whatman 3MM secs a sobre i una pila de papers absorbents.
5. Es col·loca un vidre a sobre i un pes per a fer pressió sobre el gel. Es deixa o/n a temperatura ambient.
6. Es retira la membrana de niló, i es fixa el DNA a la membrana durant 2h a 80°C.

La correcta transferència del RNA es pot comprovar a l'UV.

#### **4 Hibridació d'àcids nucleics.**

La hibridació dels àcids nucleics es realitza segons el mètode descrit per Amasino (1986). La utilització de polietilenglicol (PEG) en el tampó d'hibridació incrementa la velocitat d'hibridació i la presència de formamida redueix la  $T_m$  de l'híbrid DNA-RNA, permetent realitzar la hibridació a una temperatura de 42°C (en lloc de 65°C). El procediment seguit ha estat el següent:

1. Humitejar en aigua la membrana de niló a la que s'han transferit i fixat els àcids nucleics.
2. Prehibridar en tampó d'hibridació a 42°C durant 1h.

3. Col·locar solució d'hibridació (10-25 ml) en un altre recipient i afegir la sonda marcada radioactivament i prèviament desnaturalitzada (5min a 95°C).
  4. Transferir la membrana del recipient de prehibridació al que conté el tampó amb la sonda. Hibridar o/n a 42°C.
  5. Rentar la membrana en la solució de rentat. El primer rentat es fa a 42°C i la resta a 65°C, fins que en el líquid de rentat no es detecti presència de radioactivitat (3-5 rentats de 10-15 min cadascun).
  6. Segellar la membrana en un bossa de plàstic.
  7. Exposar la membrana a una pel·lícula d'autoradiografia dins d'un *cassette* amb pantalles amplificadores. Guardar a un congelador de -70°C. El temps d'exposició depèn del senyal del filtre.
- Tampó d'hibridació: Solució A: 50 mL fosfat sòdic 1M pH 7,2 , 14 g de SDS, 400 µL de EDTA 0,5M pH 8, 20 mL H<sub>2</sub>O i quan està tot dissolt afegir 10 mL NaCl 5M. Solució B: 20 g de PEG-6000 en 40 mL H<sub>2</sub>O. Es dissolen a 60°C i es barregen les dues solucions. S'afegeix 80mL de formamida desionitzada i 2mL de DNA d'esperma de salmó sonicat i desnaturalitzat. La solució es pot guardar a -20°C.
  - DNA d'esperma de salmó: es dissol DNA d'esperma de salmó a una concentració de 10mg/mL en aigua, per agitació o/n a 4°C. Es sonica durant 15min per trencar el DNA. Es passa varis cops per una xeringa per tal de disminuir la viscositat de la solució. Es desnaturalitza 10min a 100°C i es guarda a -20°C.
  - Solució de rentat: 3xSSC i 0,5%SDS.

## 5 Marcatge radioactiu de DNA

### Random-Priming:

Basat en el mètode descrit per Feinberg i Vogelstein (1983), es va utilitzar el kit comercial de la casa Boehringer i s'han seguit les indicacions del fabricant. S'utilitzen hexanucleòtids (2 µl ) de seqüència a l'atzar, que hibriden amb les seqüències de DNA del nostre fragment a marcar. Un cop reconegudes les seqüències, la polimerasa (1 µl Klenow U) omple els forats amb els nucleòtids afegits a la reacció (3 µl dA,T,GTPs + 2

$\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol)), incubant 30 minuts a 37°C. Es purifica la sonda en columna de Sephadex G-50 amb tampó 1xTE pH 7,4 i 0,1% SDS.

## 6 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

Per tal d'amplificar fragments de DNA s'ha emprat el mètode de PCR (Mullis *et al.* 1986), fent servir oligonucleòtids específics i DNA plasmídic com a substrat.

### 6.1 Reacció en cadena de la polimerasa

En cada cicle de PCR hi ha tres etapes que precisen de temperatures diferents i es duen a terme en l'aparell de PCR o termociclador, el qual permet una transició molt ràpida d'una temperatura a una altra. Les tres etapes de cada cicle són:

1. Desnaturalització del DNA en presència dels oligonucleòtids encebadors. Es realitza a una temperatura alta, de generalment 94°C.
2. Hibridació dels oligonucleòtids a les seqüències complementàries del DNA motlle a amplificar. Es realitza a la temperatura  $T_m$  de l'oligonucleòtid, que ve donada per la seqüència i llargada d'aquest. La situació ideal es que estigui compresa entre 45-65°C.
3. Un cop els oligonucleòtids s'han unit al DNA, actua la DNA polimerasa termoestable (High Expand Taq DNA polimerasa) sintetitzant les cadenes de DNA complementàries en direcció 5' a 3', amb activitat exonucleàsica en direcció 3' a 5' "proofreading" per corregir els possibles errors en l'activitat anterior. Aquesta etapa es realitza a 68-72°C.

L'amplificació de bandes es va realitzar emprant 5  $\mu\text{L}$  10x Tampó Expand HF amb  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  dNTPs 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleòtid 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  High Expand Taq DNA polimerasa 2.6 U finals (Boehringer), 0,075-0,1  $\mu\text{g}$  de cDNA prèviament desnaturalitzat i aigua fins a 50  $\mu\text{L}$ . Les condicions de PCR van ser: (94°C 30s,  $T_m$  de

l'oligonucleòtid 30s i 68°C 4 min) x30 cicles + (72°C 10 min) x1 cicle. La concentració de Mg<sup>2+</sup> de treball va ser de 1,5 mM final.

## 6.2 Oligonucleòtids emprats en l'amplificació per PCR i construccions

Per a l'obtenció de moltes de les construccions utilitzades es va fer servir la tècnica de PCR conjuntament amb oligonucleòtids específics, dissenyats per amplificar l'insert desitjat. Moltes d'aquestes construccions estaven pensades per a expressar la proteïna a estudiar, PHOR1, fusionada a una altre proteïna com la GFP. Per aquesta raó era necessària una fusió en fase, que només es podia aconseguir mitjançant aquesta tècnica. Els oligonucleòtids es van dissenyar de tal manera que presentessin una diana de restricció als seus extrems 5' per facilitar la lligació al vector oportú de manera que quedessin en fase. Per a altres construccions es va fer servir una PCR inversa, utilitzada per deleccionar regions concretes de l'insert *PHOR1*, utilitzant un oligonucleòtids específics amb una diana de restricció al seu extrem 5'. El fragment, producte d'aquesta PCR inversa, es relliga i s'amplifica a *E. coli*. Les construccions en les que es va fer servir la tècnica de la PCR per a obtenir l'insert a clonar es marquen amb un asterisc i les que es van aconseguir per PCR inversa amb dos asteriscs.

### \* Obtenció dels plàsmids pET23a/NT i pET28a/CT:

Mitjançant la tècnica de PCR, utilitzant uns oligonucleòtids específics i el plàsmid pBluescriptSK(-)/*PHOR1* com a DNA motlle, es van amplificar, per separat les fragments que codificaven pel domini N-terminal (posició 17-412 de *PHOR1*) i pel domini C-terminal (posicions 728-1432 de *PHOR1*) de la proteïna PHOR1. Aquests oligonucleòtids específics contenen als seus extrems 5' les dianes de restricció (*Bam*HI) i (*Hind*III) per facilitar la seva clonació en fase als vector d'expressió pET23a i pET28a de Novagen, respectivament, digerits amb *Bam*HI i *Hind*III. D'aquesta manera es van aconseguir els plàsmids pET23a/NT i pET28a/CT.

Els oligonucleòtids utilitzats per amplificar l'extrem N-terminal de la proteïna PHOR1 foren:

VA6 (posicions 17-31 de *PHOR1* 5'-CGCGGATCCGTGAGAAATAGGAGA-3') i

VA7 (posicions 388-412 de *PHOR1* 5'-GGGAAGCTTGTTCACCAGAACA-3')

Mentre que els oligonucleòtids utilitzats per a amplificar l'extrem C-terminal de PHOR1 van ser els que segueixen:

VA8 (posicions 728-742 de *PHOR1* 5'-CGCGGATCCGTATTCACTAGCACG-3') i

VA9 (posicions 1416-1432 de *PHOR1* 5'-GGGAAGCTTGCAGAATTCCTTTTCATT-3').

Les condicions de les PCRs van ser (95°C 5 minuts; 1 cicle. 94°C 30 segons, 61°C 1 minut, 72°C 30 segons; 25 cicles. 72°C 10 minuts, 1 cicle).

### **\* Obtenció del plàsmid pET28a/PHOR1:**

Mitjançant la tècnica de PCR, utilitzant uns oligonucleòtids específics i utilitzant el plàsmid pBluescriptSK(-)/*PHOR1* com a DNA motlle, es va amplificar el fragment corresponent a la regió codificant per la proteïna PHOR1 (posició 17-1432 de *PHOR1*). Es van utilitzar els oligonucleòtids específics VA6 i VA9 que contenen als seus extrems 5' les dianes de restricció *Bam*HI i *Hind*III, respectivament per facilitar la seva clonació en fase als vector d'expressió pET28a de Novagen, digerit amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Hind*III. D'aquesta manera es van aconseguir el plàsmid pET28a/*PHOR1*.

### **\* Obtenció del plàsmid pUC2X35S-PHOR1-GFP:**

Per a poder portar a terme aquesta clonació es va amplificar la regió codificant per la proteïna PHOR1 (posició 17-1432 de *PHOR1*) amb uns oligonucleòtids específics que contenen la diana de restricció *Bsp*HI als seus extrems 5' i utilitzant el plàsmid

pBluescriptSK(-)/*PHOR1* com a DNA motlle. La diana de restricció *Bsp*HI dona lloc a un extrem protuberant compatible amb l'extrem protuberant que es crea al digerir amb l'enzim de restricció *Nco*I (la diana *Nco*I del vector pUC/GFP S65C/T inclou l'ATG d'inici de la proteïna GFP). Mitjançant la lligació del producte de PCR digerit amb *Bsp*HI al vector pUC/GFP S65C/T digerit amb *Nco*I es va aconseguir el plàsmid pUC-2X35S-PHOR1-GFP.

Els oligonucleòtids específics utilitzats per amplificar la regió codificant per a la proteïna PHOR1 foren:

VA16 (posicions 15- 31 de *PHOR1*) 5'-TCATGATTGGTGAGAAATAGGAGA-3' i

VA17 (posicions 1247-1262 de *PHOR1*) 5'-TCATGAGCATAATGTGAGTAGT-3'

Les condicions de PCR van ser (94°C 2 minuts, 1 cicle; 94°C 15 segons, 55°C 30 segons, 72°C 1 minut, 10 cicles; 94°C 15 segons, 55°C 30 minuts, 70°C 1 minut (Amb una extensió de 5 segons per cada cicle), 20 cicles; 72°C 7 segons, 1 cicle).

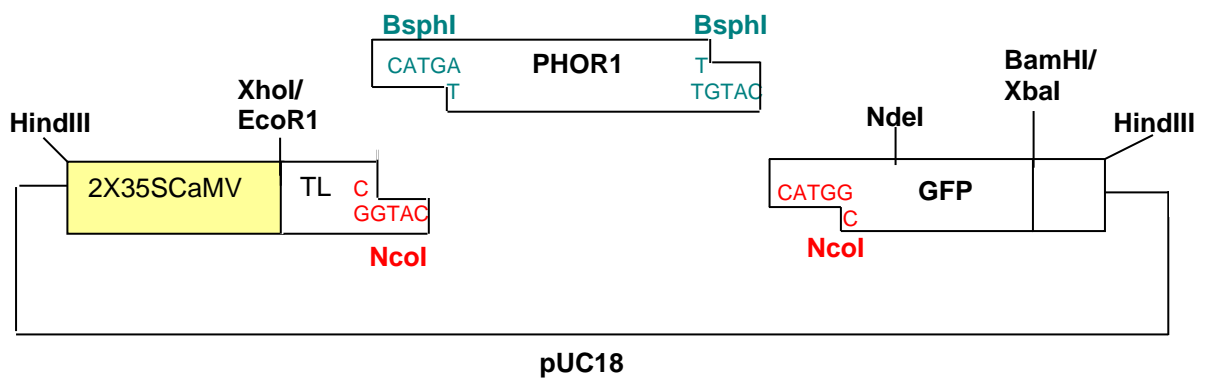


Figura 1. Mapa del vector pUC/GFP S65C/T digerit amb *Nco*I i lligat al fragment PHOR1 aconseguit mitjançant amplificació per PCR amb els oligonucleòtids VA16 i VA17 per a obtenir el plàsmid pUC-2X35S-PHOR1-GFP.

### **Obtenció del plàsmid *pBin19-2X35S-PHOR1-GFP*:**

Mitjançant digestió amb *Hind*III del vector *pUC-2X35S-PHOR1-GFP* es va alliberar el “cassette” sencer *2X35S-PHOR1-GFP* que posteriorment es va lligar al plàsmid *pBin19* digerit amb *Hind*III, obtenint-se el plàsmid *pBin19-2X35S-PHOR1-GFP*.

**\*\* Obtenció dels plàsmids *pUC-2X35S-CPI-GFP* i *pUC-2X35S-ARM-GFP*:**

Aquest plàsmids es van aconseguir deleccionant diferents dominis del gen *PHORI* mitjançant PCR inversa amb uns oligonucleòtids específics, utilitzant com a DNA motlle el vector *pUC-2X35S-PHORI-GFP*. A l'extrem 5' d'aquests oligonucleòtids es va incloure la diana de restricció *NotI*. Els fragments resultants de la PCR inversa van ser digerits amb l'enzim de restricció *NotI*, relligats i transformats a *E. coli*. Amb aquesta estratègia es va aconseguir deleccionar els dominis mantenint la pauta de lectura.

Els oligonucleòtids dissenyats per deleccionar els diferents dominis de *PHORI* foren:

Per la delecció del domini *CPI* i l'obtenció de la construcció *ArmR-GFP* en el vector *pUC-GFP S65C/T*:

VA20 (posició 41-56 de *PHORI*): 5' ATAAGAATGCGGCCGCAAAGGCTGGGAACG-3'  
i VA21 (posició de *PHORI* 257-270): 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCGTCGAG  
CTCACC-3'

Per la delecció del domini *ArmR* i obtenció de la construcció *CPI-GFP* en el vector *pUC-GFP S65C/T*:

VA22 (posicions 509-524) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCGATAACAACCAAATC-3' i  
VA23 (posicions 1178-1192) 5' ATAAGAATGCGGCCGCCGCGTGGTGAATAAT-3'

Les condicions de PCR van ser (94°C 2 minuts, un cicle; 94°C 15 segons, 50°C 30 segons, 68°C 4 minuts, 25 cicles; 68°C 5 minuts).

**Obtenció del plàsmid *pUC2X35S-CPI-GFP-GUS*:**

Aquesta construcció es va obtenir per digestió del vector *pUC-2X35S-CPI-GFP* amb *NdeI/XbaI*, i lligació del fragment *GFP-GUS*, alliberat del vector *pCAMBIA103* per digestió amb els enzims de restricció *NdeI/NheI* (aquest últim es compatible amb *XbaI*).

**\*\* Obtenció del plàsmid *pUC2X35S-PHOR1(-SSS)-GFP*:**

Aquest plàsmid es va obtenir per delecció del gen *PHOR1* mitjançant PCR inversa utilitzant uns oligonucleòtids específics i el vector *pUC-2X35S-PHOR1-GFP* com a DNA motlle. Mitjançant aquesta estratègia es va aconseguir deleccionar la regió rica en Ser situada entre els dominis CPI i ARM de PHOR1, obtenint el plàsmid *pUC-2X35S-PHOR1(-SSS)-GFP*. Als extrems 5' d'aquests oligonucleòtids es va incloure la diana de restricció *SalI*. El fragment resultants de la PCR inversa es van digerir amb l'enzim de restricció *SalI*, relligar i transformar a *E. coli*.

Els oligonucleòtids utilitzats per a la delecció de la regió rica en Ser foren :

VA28 (posicions 265-249 de PHOR1) 5'-ACGCGTCGACCGGCTGATGCTGAATCC-3' i

VA29 (posicions 305-323 de Phor1) 5'-ACGCGTCGACGTTACAAAGTCGGAAGTTG-3'

Les condicions de PCR van ser (94°C 2 minuts, un cicle; 94°C 15 segons, 50°C 30 segons, 68°C 4 minuts, 25 cicles; 68°C 5 minuts) Es va fer servir la Taq polimerasa Pow.

**\* Obtenció del plàsmid *pAS2-1/PHOR1*, *pAS2-1/CPI* i *pAS2-1/ARM***

Per a poder portar a terme aquestes construccions es va amplificar la regió codificant del gen *Phor1* (posicions 17-1432 de *Phor1*) i aquest gen amb els seus dominis Armadillo i CPI deleccionats, utilitzant els plàsmids *pUC2X35S-Phor1-GFP*, *pUC-2X35S-CPI-GFP* i *pUC-2X35S-ARMADILLO-GFP*, respectivament, com a DNA motlle i utilitzant en tots els casos dos oligonucleòtids específics VA24 i VA25 amb una diana de restricció (*BamHI*) i una diana (*PstI*), respectivament, als seus extrems 5'.. Es van dissenyar amb aquestes dianes per facilitar la lligació del fragment resultant al vector *pAS2-1* (digerit amb aquestes mateixos enzims de restricció) i quedar en fase darrera del gen que codifica pel domini d'unió al DNA de GAL4, aconseguir el plàsmid *pAS2-1/PHOR1*, *pAS2-1/ARM* i *pAS2-1/CPI*, respectivament.

Els oligonucleòtids específics utilitzats són:



VA24 (posició 14–31 de *PHORI*) 5'-CGCGGATCCAAATGGTGAGAAATAGGAGA-3' i  
VA25 (posició 1250–1270 de *PHORI*) 5'-AAAACTGCAGTCAGTAGGGCATAATGTGAGT-  
3'

Les condicions de PCR van ser (94°C 5 minuts, un cicle; 94°C 30 segons, 50°C 2 minuts, 72°C 2 minuts, 25 cicles i 72°C 7 minuts).

## 7 5' RACE

Aquesta és una tècnica ràpida amb la que es pot aconseguir amplificar fragments de DNA que es troben a la regió 5' que manca en els clons parcials de cDNA. En el nostre cas es va aïllar el clon parcial *TH53* degut a que la proteïna codificada per aquest clon es capaç d'interaccionar específicament amb *PHORI* en experiments de doble híbrid a llevat (veure 24). Es van dissenyar dos oligonucleòtids a la regió 5' del clon parcial de cDNA de *TH5*, dirigits cap a 5', i utilitzant el RNA missatger d'arrels de *S. demissum* (on per experiments *northern* es va veure que hi havia una forta expressió de *TH53*) i el kit de GibcoBRL 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0. (Life Technologies, GibcoBRL), amplificant un fragment de 800 pb que corresponia a l'extrem 5' del cDNA de *TH53*, que ens va permetre conèixer la seqüència completa del missatger *TH53*. Es va seguir en tot moment el protocol de Life Technologies, GibcoBRL.

Els oligonucleòtids utilitzats són:

GSP1: 5'-AACCTCGGCAATCCATCA-3'

GSP2: 5'-GTATCGGCGGCAAATCGT-3'

## 8 Expressió i purificació de proteïnes recombinant a *E.coli*.

### 8.1 Expressió:

S'ha emprat el vector d'expressió pET-28a i pET-23a (Novagen) i el pZEX, els quals es van transformar en la soca BL21 d' *E.coli*, que expressa la T7 polimerasa sota control d'un promotor induïble per IPTG. Es creix un cultiu exponencial de la soca BL21 transformada amb el plasmidi d'expressió, i s'indueix l'expressió de la proteïna amb 0,4-1 mM IPTG durant 1-3 hores a 30 o 37°C, segons els nivells assolits d'acumulació de la proteïna.

El procediment va ser el següent:

1. Es subclona la regió codificant de la proteïna en el vector d'expressió. Es transforma la soca de *E.coli* DH5 , i es comprova la presència i la correcta orientació de l'insert. El plasmidi recombinant es manté sempre en aquesta soca ja que en la soca BL21 s'observen amb relativa freqüència recombinacions del plasmidi.
2. Es transforma la soca BL21 amb la construcció d'expressió.
3. Es creix un cultiu de les cèl·lules BL21 que porten el plasmidi d'expressió, fins a  $OD_{600}=0,5-0,8$ .
4. Es recull una mostra (1 mL) per al control del patró proteic abans de la inducció.
5. S'indueix l'expressió de la proteïna amb IPTG a una concentració final de 0,4-1mM.
6. S'agafa mostra cada 30 min per analitzar l'evolució de la inducció.

### Anàlisi:

Per tal de visualitzar l'evolució de l'expressió de la proteïna recombinant es corre un gel de proteïnes amb les diferents mostres que s'han agafat. Les proteïnes se separen per electroforesi en SDS-PAGE al 12,5% d'acrilamida (Laemmli, 1970), en un aparell mini-protean TMII de Biorad. Després de l'electroforesi es poden tenyir les proteïnes amb blau de Coomassie o bé es pot transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa per a detectar la proteïna recombinant per *western*. El procediment és el següent:

## MATERIALS I MÈTODES

---

1. Les mostres que s'han agafat (1mL) es centrifuguen 2 min 13,000 rpm. El sediment de bacteris es resuspèn en 2xTM (200 µL) més un 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
2. Els gels de proteïnes consten de dues parts. Una part superior que apila totes les proteïnes en el mateix front i una part inferior que és la fase separadora. La composició de aquestes dues parts és la següent:

**Taula 2.** Preparació de gels de proteïnes SDS-PAGE.

2 gels 0,75mm de gruix	Inferior 12,5%	Superior 3%
Acril/Bisacril (30:0,8)	4,15 mL	0,3 mL
Tampó inferior	2,5 mL	-
Tampó superior	-	0,75 mL
Aigua	3,35 mL	1,95 mL
Temed	5,1 µL	3 µL
APS (15%)	40,2 µL	30 µL

Es barregen tots els components menys el Temed i l'APS que s'addicionen just abans d'abocar el gel. Un cop s'ha abocat la fase inferior (5 cm d'alçada), s'afegeix 1 mL d'aigua a sobre per tal que la fase inferior quedi recta i separada de l'aire (això afavoreix la polimerització). Després que el gel ha polimeritzat es treu l'aigua, s'aboca la fase superior (1,5 cm) i es col·loca la pinta.

3. Quan el gel superior ha polimeritzat es treu la pinta, i es col·loca el gel vertical en la cubeta d'electroforesi. S'afegeix 1x tampó de recorregut, a la part interior fins que cobreixi els pous i a la part exterior fins que cobreixi l'elèctrode inferior i 1 cm del gel.
4. Es desnaturalitzen les mostres 5' a 95°C, es posen en gel i es centrifuguen 2 min a 13,000 rpm. El marcador de pes molecular també es desnaturalitza a 95°C.
5. Es carreguen 10 µL de cada mostra i 2 µL del marcador de pesos moleculars.
6. Es sotmet el gel a un voltatge de 150V, connectant el pol positiu a la part inferior del gel.

7. Un cop corregut, el gel es pot tenyir amb blau de Coomassie . Si la inducció és prou forta, això ja es suficient per a detectar la proteïna recombinant.
8. En cas de que la inducció de la proteïna sigui dèbil i no es detecti per tinció amb blau de Coomassie, el gel es transfereix a una membrana per a la posterior detecció *western*.

### **Transferència:**

9. Prèviament a la transferència s'ha d'equilibrar el gel i els papers en el tampó de transferència durant 30-45 min. Per a la membrana de niló 10 min és suficient.
10. S'ha emprat l'aparell horitzontal de Biorad. S'humitegen les dues tapes que fan d'elèctrode amb el tampó de transferència. Es col·loca a sota un paper de transferència (Gel blotting paper, GB004 Schleicher& Schuell) de mida més gran que el gel. Després es col·loca la membrana de nitrocel·lulosa (0,45 µm Schleicher& Schuell), el gel i a sobre un altre paper. Al col·locar-los s'eliminen les bombolles amb ajut d'una vareta de vidre. Es transfereix per aplicació de corrent durant 15-30 min a 10-15V. L'elèctrode positiu és l'inferior, de manera que les proteïnes carregades negativament (pel SDS) migren cap aquest en direcció a la membrana.
11. Es comprova que la transferència ha anat bé, per tinció del gel amb blau de Coomassie i tinció de la membrana amb roig de Ponceau. En la membrana es marquen les bandes corresponents al marcador de pes molecular. La tinció amb roig de Ponceau es pot eliminar rentant amb aigua.

### **Immunodetecció de proteïnes amb una cua de 6-10 Histidines expressades en el vector pET:**

12. La inducció de la proteïna recombinant es comprova amb el kit Indiana<sup>TM</sup> HisProbe-HRP (Pierce), que permet la detecció específica de seqüències de sis o més histidines, tal com les incorporades en la proteïna recombinant expressada en el vector pET-28.
13. Per al revelat luminescent s'utilitza el kit ECL d'Amersham.

**Immunodetecció amb anticossos específics:**

14. Bloquejar la membrana amb 10% llet Molico (Nestle) en PBS-T a temperatura ambient durant 1 hora amb agitació suau.
15. Rentar tres cops amb PBS-T durant 5 minuts a temperatura ambient i agitació suau.
16. Incubar amb l'anticòs primari dil.luït en 1XPBS a 4°C durant tota la nit i amb agitació suau.
17. Rentar 3 cops amb PBS-T durant 10 minuts a temperatura ambient amb agitació suau.
18. Incubar amb l'anticòs secundari anti-ratolí o anti-conill marcat amb peroxidasa peroxidasa, dil.luït 1/15.000-1/20.000 en PBS-T, a temperatura ambient durant 45 minuts- 1 hora.
19. Rentar 3 cops amb PBS-T a temperatura ambient durant 15 minuts i agitació suau.
20. Rentar tres cops amb PBS-0,3% T a temperatura ambient durant 10 minuts i agitació suau.
21. Revelar amb el kit d'ECL d'Amersham Pharmacia Biotec.

- 2xTM: Tris-HCl pH 6.8 125mM, glicerol 20%, SDS 4%, blau de bromofenol 0.04%, 2 -ME 10%
- Tampó Inferior: Tris-HCl 1.5M pH 8.8, SDS 0.4%
- Tampó Superior: Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 0.4%
- 10xTampó de recorregut: Glicina 1.92M, Tris 0,25M, SDS 1%. (El pH ha de quedar entre 8.3-8.7)
- Blau de Coomassie: TCA 50%, Coomassie blue 0.45%
- Roig de Ponceau: Roig de Ponceau 0.1%, àcid acètic 1%
- Tampó de transferència: Glicina 39mM, Tris 48 mM, pH 9,2 (20% metanol)
- Marcadors de pes molecular (Sigma): 66 kDa (albúmina bovina), 45 kDa (albúmina d'ou), 36 kDa (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa de múscul de conill), 29 kDa (anhidrasa carbònica d'eritròcits bovins), 24 kDa (tripsinògen de pancrees boví), 20,1 kDa (inhibidor de tripsina de soja), 14,2 kDa ( -lactoalbúmina de llet bovina).
- Tampó PBS-T: PBS1X, 0,1% Tween 20.
- Tampó PBS- 0,3% T. PBS1X, 0,3% Tween 20.
- PBS20X: 32 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na. H<sub>2</sub>O, 168 mM PO<sub>4</sub> Na<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O, 3 M NaCl. Filtrar.

## **8.2 Purificació de proteïnes recombinants mitjançant cromatografia d'afinitat en columnes de Ni<sup>2+</sup>:**

Els extrems N terminal (posicions 10-206 de *PHOR1*) i C terminal (posicions 721-1423 de *PHOR1*) de la proteïna PHOR1 van ser clonats en els vectors d'expressió pET23a i pET28a, respectivament, de manera que quedessin en fase amb la cua de 6-10 Histidines del vector, fusionades al seu extrem N terminal i C terminal, respectivament, amb l'objectiu de poder-les purificar més tard mitjançant una columna de Ni<sup>2+</sup> que uneix específicament proteïnes amb cues de més de 6 Histidines. Després de induir la expressió de la proteïna a la soca BL21 d'*E. coli* es necessari estudiar en quina fracció es troba la proteïna per procedir a la purificació en condicions natives o desnaturalitzants en presència de 6M Urea. Es va seguir el procediment descrit pel pET System Manual (Novagen).

### **Fracció soluble i insoluble de proteïnes:**

1. Centrifugar el cultiu a 5,000 rpm. durant 5 minuts
2. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 1/10 del volum inicial del cultiu de 50 mM Tris-HCl pH8, 2 mM EDTA. Afegir-hi 100 µg/ml Lisozim (preparar una solució mare a 10 mg/ml) i 1% Triton X-100 (fer servir una solució mare al 10% Triton X-100).
3. Incubar a 30°C durant 15 minuts.
4. Sonicar 2 cops amb pulsos de 10 segons, mantenint les mostres en gel.
5. Centrifugar a 12,000 rpm. durant 15 minuts a 4°C.
6. Recollir el sobrenedant i carregar en un gel 10 µl de mostra a la que s'ha afegit 10 µl de 2x TM i un 10% de 2 -mercaptoetanol.
7. Resuspendre el sediment en 1/100 del volum inicial del cultiu de 1x TM i carregar en un gel 1 µl + 19 µl 1x TM més un 10% de 2 -mercaptoetanol.

La fracció proteica soluble queda en el sobrenedant i la insoluble en el sediment.

### **Extracció:**

Les proteïnes recombinants expressades van resultar ser a la fracció insoluble. Es per aquesta raó que l'extracció proteica es va fer en condicions desnaturalitzants, utilitzant solucions que contenien 6 M Urea (solubilitzen els cosos d'inclusió). Prèviament però, es va fer una extracció en condicions no desnaturalitzant per tal de rentar la mostra de proteïnes solubles.

1. Centrifugar el cultiu a 5,000 rpm. durant 5 minuts.
2. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 40 ml de tampó d'unió per a cada 100 ml de cultiu. Afegir-hi 0,5 mg/ml de Lisozim.
3. Incubar a 30°C durant 15 minuts.
4. Congelar i descongelar en nitrògen líquid de 2 a 3 cops.
5. Afegir 50-100 µg/ml de DNAsaI (solució mare 5 mg/ml)
6. Incubar en gel durant 20 minuts i sonicar.
7. Ultracentrifugar a 35,000 rpm. durant 15 minuts.
8. Resuspendre el sediment en 20 ml/100ml de cultiu de 1X tampó d'unió
9. Ultracentrifugar de nou a 35,000 rpm. durant 15minuts.
10. Resuspendre el sediment amb 5ml/100 ml de cultiu amb 1x tampó d'unió + 6M Urea.
11. Incubar en gel durant 1 hora.
12. Ultracentrifugar a 35,000 rpm. durant 20 minuts.
13. Recollir el sobrenedant que ara correspon a la fracció de proteïnes insolubles.

### **Purificació de proteïnes recombinants en condicions desnaturalitzants:**

Prendre 500 µl de reïna de Ni<sup>+2</sup> (His Bind<sup>R</sup> metal chelation resin, Novagen) per a cada 5 mg de proteïna a purificar i deixar compactar en una columna de cromatografia (Poly-Prep, Bio-Rad).

1. Afegir 3 ml/ml columna d'aigua desionitzada estèril.
2. Rentar amb 5 ml/ml columna de 1X tampó de càrrega.
3. Equilibrar amb 3 ml/ml columna de 1X tampó d'unió + 6M urea.

4. Passar la mostra proteica corresponent a la fracció insoluble de proteïnes, dos cops per la columna.
5. Rentar amb 10 ml/ml de columna amb 1X tampó d'unió + 6M urea.
6. Rentar amb 6 ml/ml columna de 1X tampó de rentat 20 mM imidazol + 6M urea.
7. Rentar amb 6 ml/ml columna de 1X tampó de rentat 40 mM imidazol + 6M urea.
8. Rentar amb 6 ml/ml columna de 1X tampó de rentat 60 mM imidazol + 6M urea.
9. Eluir amb 6 ml/ml columna de 1X tampó d'elució 300 mM imidazol + 6M urea.
10. Eluir amb 6 ml/ml columna de 1X tampó d'elució 1 M imidazol + 6M urea.

Recollir els rentats i fraccions d'elució de la columna en fraccions separades iguals a 1 volum de la columna, i analitzar totes les fraccions per electroforesi, tenyint el gel amb blau de Coomassie. Es va comprovar que les proteïnes recombinants quedaven retingudes totalment a la reina després de passar dos cops la mostra per la columna i que era suficient rentar les columnes amb 1X tampó de rentat 20mM imidazol + 6 M urea i eluir amb 1X tampó d'elució 300 mM imidazol + 6M urea per recuperar tota la proteïna retinguda a la columna.

#### **Renaturalització de les proteïnes recombinants extretes i purificades en condicions desnaturalitzants:**

Per a l'obtenció d'anticossos que reconguin la proteïna nativa cal que la proteïna presenti el seu plegament natural, alhora que es convenient eliminar l'urea de les mostres per a l'immunització dels conills. Amb aquest objectiu es va procedir a l'eliminació de l'agent desnaturalitzant de les proteïnes recombinants extretes i purificades en condicions desnaturalitzants. L'eliminació d'urea i plegament de la proteïna es va fer per diàlisi successives, disminuint progressivament la concentració d'urea des de 6M fins 0M, canviant el tampó de diàlisi cada 12 hores i disminuint a cada canvi la concentració d'urea en 1M.

Durant el procés de diàlisi es va observar que les proteïnes s'agregaven i precipitaven durant el canvi de tampó de diàlisi de 2 M a 1 M urea. La mostra dialitzada en presència de 0M urea es va centrifugar a 1,000 rpm. durant 10 minuts a 4°C. L'anàlisi per electroforesi en gel SDS-PAGE va mostrar però que al sobrenedant corresponent a les



proteïnes recombinant solubilitzades, no es detectaven quantitats apreciables de les proteïnes recombinants.

- **Solucions:** Totes les solucions es dilueixen fins 1X amb aigua desionitzada i estèril, afegint 6 M urea i els inhibidors de proteases a la concentració de (1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina A, 1 mM PMSF) abans del seu us. Mantenir a 4°C.
- **8X tampó d'unió:** 40 mM imidazol, 4M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7,9.
- **8X tampó de rentat:** 480 mM imidazol, 4M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7,9.
- **4X tampó d'elució:** 4 M imidazol, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7,9.
- **8X tampó de càrrega:** 400 mM NiSO<sub>4</sub>.
- **Tampó de diàlisi:** 1X PBS

### **8.3 Purificació de proteïnes recombinants fusionades a la proteïna GST mitjançant cromatografia d'afinitat en columna de glutatió-*Sepharose*:**

Les proteïnes expressades a llevat que en experiments de doble híbrid (veure 27), mostraren interaccionar específicament amb la proteïna PHOR1, van ser clonades al vector pZEX de manera que quedessin en fase amb la proteïna GST fusionada al seu extrem N terminal. D'aquesta manera es va poder purificar la proteïna recombinant mitjançant una columna glutatió-*Sepharose* (Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B resin, Amersham Pharmacia Biotech AB) que uneix la proteïna GST.

Després de tres hores d'inducció de l'expressió de la proteïna recombinant a la soca d'*E. coli* BL21, amb 1 mM IPTG, es va comprovar l'expressió de la proteïna i si restava a la fracció soluble, procedint a la seva extracció i unió a la reïna en condicions natives.

#### **Extracció:**

1. Centrifugar el cultiu a 5,000 rpm. durant 5 minuts.
2. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediments en 10 ml de tampó NENT/200 ml de cultiu.
3. Sonicar en gel fins que perdi la viscositat.
4. Centrifugar a 10,000 rpm. durant 15 minuts a 4°C.
5. Recuperar el sobrenedant (fracció proteica soluble).

#### **Purificació:**

1. Compactar 2 ml de la reïna glutatió-*Sepharose* per a cada 5 mg proteïna a purificar (el rendiment aproximat era de 2,5 µg proteïna de fusió/ml de cultiu).
2. Equilibrar la columna amb 5 ml/ml columna de tampó NENT.
3. Passar dos cops la mostra per la columna.
4. Rentar un cop amb 5 ml/500 µl de columna amb NENT.
5. Rentar un cop amb 5 ml/500 µl de columna amb NENT 0,7 M NaCl.
6. Rentar un cop amb 5 ml/500 µl de columna amb NENT.
7. Equilibrar la reïna amb 10 ml/500 µl de columna de tampó *pull-down*.

- **Solucions:**

- Tampó NENT: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP40.
- Tampó *pull-down*: 20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,2% Nonidet P40, 100 µM PMSF.

## **9 Obtenció de sèrum immune de conills contra les proteïnes recombinants purificades.**

### **9.1 Obtenció de les proteïnes recombinants desnaturalitzades a partir del gel SDS-PAGE:**

Les proteïnes recombinants NT i CT van resultar ser insolubles i no va ser possible la seva re-naturalització mitjançant diàlisi successives, així que es va procedir a la immunització dels conills directament amb les proteïnes desnaturalitzades les quals es van extreure directament d'un gel de poliacrilamida.

1. El sediment obtingut per centrifugació de la diàlisi amb 0M urea es va resuspendre en 1 ml de 1X PBS i es va carregar en un gel preparatiu de proteïnes, 500 µl de la suspensió de proteïna + 500 µl 2XTM amb un 10% de 2-mercaptoetanol.
2. Un cop corregut el gel, rentar amb aigua desionitzada 3 a 4 cops
3. Tenyir amb 0,05% Coomassie blue dissolt en aigua, durant 10 minuts a temperatura ambient.

4. Rentar amb aigua fins aconseguir veure la banda on es localitza la proteïna.
5. Retallar la banda, rentar-la amb aigua fins que perdi el color blau del Coomassie i tallar-la a trossets petits.
6. Congelar els trossos amb N<sub>2</sub> líquid i triturar-los.
7. Liofilitzar durant 24-48 hores.
8. Afegir 1ml de 1X PBS al pols liofilitzat i agitar suaument durant 1 hora a temperatura ambient.
9. Fer passar la mostra a través d'un tub eppendorf al que s'ha fet un forat a la base per centrifugació, recollint el líquid en un segon tub.
10. Carregar diferents dilucions de la mostra amb igual volum de 2xTM+ 2 - mercaptoetanol, juntament amb un patró de concentració coneguda de la proteïna, per tal de quantificar la concentració de la proteïna purificada del gel preparatiu.

### 9.2 Immunització de conills:

L'animal seleccionat per a l'obtenció d'anticossos va ser el conill (*Oryctolagus cuniculus*) de la varietat *New Zealand White*. Es va fer aquesta selecció perquè aquests conills són fàcils de mantenir i manipular al laboratori, perquè les injeccions i extraccions sanguínies són ben tolerades per l'animal i perquè la quantitat de sèrum que s'obté és molt superior al de ratolins, rates o hèmsters (Harlow *et al.*, 1988).

Un cop els conills van tenir dos mesos i ja estaven aclimatats a l'estabulari es va realitzar la primera extracció de sang (sèrum pre-immune ó control negatiu). Les extraccions de sang es van fer de la vena marginal de la part interna de l'orella ja que és de fàcil accés i amb poques terminacions nervioses. Quatre dies després es va fer la primera immunització (dos dels conills es van injectar amb la proteïna NT i dos amb la CT). Després de 30 dies es van tornar a immunitzar, i 20 dies després de la segona immunització es va fer una extracció de 20 ml de sang de cada conill. Passats 30 dies els conills es van immunitzar de nou i es va extreure sang, fins a un total de 4 extraccions sanguínies.

### Immunització:

L' adjuvant utilitzat per les immunitzacions va ser el de Freund. Existeixen dues formes d'aquest adjuvant: el complet o CFA i l'incomplet o IFA. Les diferències entre amdòs és que CFA conté *M. Tuberculosis* mortes per calor, capaces de provocar una resposta immune forta i prolongada, però que alhora pot produir granulomes al conill. Per evitar aquest problema i d'altres derivats dels seus efectes secundaris, només s'utilitzà CFA a la primera immunització (que és la que dóna una resposta immunitària, en general, molt baixa), mentre que a la resta d'immunitzacions s'utilitzà IFA. L'administració de l'antígen és subcutànea (Harlow *et al.*; 1988).

1. En un tub col·locar 100 µg de proteïna purificada en un volum final de 500 µl de PBS.
2. Afegir 500 µl d'adjuvant i vortejar fortament fins la formació d'una emulsió. A la primera immunització l'adjuvant de Freund utilitzat és el complet (CFA) i a la resta l'incomplet (IFA).
3. Injectar subcutàneament de 100 µl en 100 µl d'innòcul a diferents llocs del conill, fins a injectar tota la mostra.

#### **Obtenció del sèrum:**

1. Incubar la sang del conill, extreta i posada dins d'un tub amb gel separador, a 37°C durant 1 hora, per a que aquesta coaguli.
2. Guardar tota la nit a 4°C perquè el coàgul es contragui.
3. Centrifugar a 5,000 rpm. durant 30 minuts a 4°C.
4. Aliquotar el sobrenedant en tubs de 1,5 ml i congelar a -80°C. Un cop es descongela la mostra millor no tornar a congelar-la, sinó que es pot guardar la resta a 4°C amb 0,03% azida sódica.

## **10 Preparació d'extractes proteics nuclears a partir de fulles de patatera.**

Amb l'objectiu de testar la localització subcellular de la proteïna PHOR1, mitjançant la tècnica de *western* vam procedir a l'extracció de nuclis i posterior extracció de proteïnes nuclears.

La preparació d'extractes proteics nuclears, a partir de fulles de patatera es basa en la tècnica descrita per Prat y col (1989). Pel fraccionament d'aquestes es va utilitzar el mètode desenvolupat per Echeverría y col. (1994). Per a la preparació dels extractes proteics i per tal d'evitar la degradació de les proteïnes es van utilitzar inhibidors de proteases en els tampons i es va treballar a la cambra freda (4°C).

### 10.1 Aïllament de nuclis

1. Triturar 100 g de teixit fresc amb 300 ml de tampó 1A, en un morter a 4°C.
2. Filtrar l'homogeneïtzat a través de dos capes de Miracloth (Calbiochem) i dos de niló de 80µm de grossor de porus (Schweizer Seidengazerfabrik).
3. Centrifugar durant 5 minuts a 250 g i a 4°C. Transferir el sobrenedant a un altre tub i centrifugar novament 5 minuts a 350g. Resuspendre el sediment de nuclis en 200 ml de tampó 0.5A1, amb l'ajut d'un pinzell rodó. Resuspendre el segon precipitat de nuclis amb 100 ml de solució 0.5A1. Ajuntar tots dos volums.
4. Centrifugar durant 5 minuts a 300 g a 4°C. Repetir el procés de rentat un cop més i resuspendre els nuclis en 50 ml de tampó 0.5A2.
5. Observar els nuclis al microscopi òptic per tinció amb blau de metilè..

### 10.2 Extracció de proteïnes nuclears

1. Centrifugar durant 5 minuts a 350 g i 4°C. Separar amb cura el sobrenedant.
2. Resuspendre els nuclis amb 4 ml de tampó de lisis i afegir 400 µl (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M. Agitar lentament en un agitador magnètic.
3. Transferir el lisat a un homogeneïtzador Dounce, i homogeneïtzar retraient l'èmbol 10 cops. Aquest procés permet trencar les molècules de DNA, disminuint la viscositat de la mostra.

4. Transferir el lisat a un got de precipitats. Agitar sobre gel durant 1 hora, amb l'ajut d'un agitador magnètic.
5. Centrifugar durant 15 minuts a 15,000 rpm en un rotor JA-20 (Beckman) a 4°C.
6. Ultracentrifugar durant 1 hora a 35,000 rpm en un rotor 50Ti (Beckman) a 4°C.
7. Transferir el sobrenedant a un altre got de precipitats. Afegir-hi 0.37 g/ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lentament i en agitació sobre gel, amb l'ajut d'un agitador magnètic. Mantenir en agitació durant 1 hora.
8. Centrifugar durant 30 min a 35,000 rpm en un rotor 50Ti (Beckman) a 4°C. Resuspendre el precipitat de proteïnes en 5 ml de tampó TpII-100.
9. Dialitzar front a tampó D durant tota la nit.
10. Centrifugar 10 min a 13,000 g i al·liqüotar l'extracte proteic en fraccions de 200 µl. Congelar amb N<sub>2</sub> líquid i guardar a -80°C.

- **Solucions:** Mantenir totes les solucions a 4°C, i afegir-hi 10 ml/L -mercaptoetanol i inhibidors de proteases a la concentració de (1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina A, 1 mM PMSF), abans del seu us. Al tampó D no se l'hi afegeix -mercaptoetanol.
- **Tampó 1A:** 1 M Hexilenglicol (Aldrich), 10 mM PIPES pH 6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM Espermina, 1 mM Espermidina, 0,6% Nonidet P40 (Sigma), 0.25M Sacarosa.
- **Tampó 0.5A1:** Igual a l'anterior però amb 0.5 M Hexilenglicol.
- **Tampó 0.5A2:** Igual que l'anterior però sense Nonidet P40.
- **Tampó de lisis:** 110 mM KCl, 15 mM HEPES pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.
- **Tampó D:** 20 mM HEPES pH 7.9, 10% Glicerol, 0.2 mM EDTA pH 8, 0.1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P40.

## 11 Preparació d'extractes proteics corresponents a la fracció microsomal

Amb l'objectiu d'aïllar proteïnes associades a membrana, es va procedir a l'enriquiment, a partir de fulles de patatera, de la fracció membranosa derivada de microsomes i membrana plasmàtica.

El protocol es basa en la tècnica descrita per Laubert *et al.* (1997), introduint les modificacions al procediment descrites per Baldet *et al.* (1992). Per a la preparació dels extractes proteics, i amb la finalitat d'evitar la degradació de proteïnes, es va afegir inhibidors de proteases a tots els tampons i es treballà a la cambra freda (4°C).

### 11.1 Aïllament de la fracció microsomal

1. Homogeneïtzar les mostres fresques (en el nostre cas 3 g de fulles de patatera *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* línia 7540, a les que prèviament s'havia tret el pecíol i nervi central) en un morter, amb 25 mL de tampó d'extracció a 4°C.
2. Filtrar l'homogeneïtzat a través de dos capes de Miracloth (Calbiochem) i dos de niló de 80µm de grossor de porus (Schweizer Seidengazerfabrik).
3. Centrifugar durant 10 minuts a 300 g a 4°C.
4. Abocar el sobrenedant a un altre tub de centrífuga i centrifugar durant 20 minuts a 12,000 rpm. en un rotor JA-10 a 4°C. El sediment (P300) comprès pels cloroplastes i la fracció nuclear crua es resuspèn en 300 µl de tampó I.
5. Abocar el sobrenedant a un tub de centrífuga i centrifugar durant 60 minuts a 35,000 rpm. a 4°C en un rotor SW40Ti (Beckman). El sediment (P12.000) comprès pels mitocondris es resuspèn en 2 ml de tampó I.
6. Recollir el sobrenedant (S35,000) i el sediment (P35,000) i resuspendre aquest últim en 500 µl de tampó I. El sediment P35.000 correspon a la fracció microsomal i el sobrenedant S35.000 correspon a les restes citosòliques.

En tots el casos els sediments es van resuspendre amb el tampó I i es van sonicar fins a desaparèixer la viscositat. Centrifugar durant 2 minuts a 13,000 rpm. a 4°C i recuperar el sobrenedant.

- **Solucions:** Mantenir totes les solucions a 4°C, i afegir-hi inhibidors de proteases a la concentració de (1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina A, 1 mM PMSF), abans del seu us.
- **Tampó d'extracció:** 12 % Sacarosa, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM DTT.
- **Tampó I:** 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM NaCl, 1% SDS i 5% -mercaptoetanol.

## 12 Extracció de proteïnes totals de planta

Les mostres de proteïna es van preparar mitjançant una extracció en 2 fases a partir de material de fulla de patatera congelat amb N<sub>2</sub> líquid i triturat en morter. En la primera fase s'extreuen les proteïnes solubles utilitzant un tampó fosfat, i en la segona fase s'extreuen les proteïnes insolubles i les integrades o associades a membrana amb un tampó similar al tampó de mostra descrit per Laemmli (1970) per als gels SDS-PAGE, però amb un percentatge inferior de SDS i sense glicerol ja que aquests components interfereixen en la lectura de proteïnes en l'assaig Bradford. Per a la preparació d'extractes proteics, i amb la finalitat d'evitar la degradació de les proteïnes, es va utilitzar inhibidors de proteases a tots els tampons.

### 12.1 Extracció de proteïnes:

1. Homogeneïtzar el teixit congelat i prèviament triturat amb 500 µl de tampó S.
2. Centrifugar durant 10 minuts a 13,000 rpm. a 4°C.
3. Guardar el sobrenedant (S1) en gel i homogeneïtzar el sediment amb 250 µl de tampó I.
4. Sonicar 5 segons a baixa potència per trencar el DNA que podria interferir en la separació en gels SDS-PAGE.
5. Centrifugar durant 10 minuts a 13,000 rpm. i a 4°C.
6. Recuperar el sobrenedant (S2).

2 µl d'aquests sobrenedants es poden utilitzar per mesurar la concentració de proteïnes mitjançant l'assaig Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad), seguint les instruccions del fabricant.

- **Solucions:** Mantenir totes les solucions a 4°C, i afegir-hi inhibidors de proteases a la concentració de (1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina A, 1 mM PMSF), abans del seu us.



- Tampó S: 100 mM fosfat sòdic pH 7.2 , 5% 2 - mercaptoetanol.
- Tampó I: 50 mM Tris-HCl pH 6.8 o 7.2, 10 mM NaCl, 1% SDS, 5% 2 -mercaptoetanol.

### 13 Immunodetecció

Per a la immunodetecció de la proteïna PHOR1 s'ha utilitzat un sèrum immune de conill contra el domini NT de la proteïna, a una dilució 1/2000. En tots els casos s'ha utilitzat entre 10 i 40 µg d'extracte proteic, i el revelat s'ha realitzat mitjançant luminiscència seguint les instruccions del fabricant (ECL, Amersham).

### 14 Traducció i transcripció *in vitro*

Les proteïnes PHOR1, CPI i ArmR, utilitzades com a proteïnes presa als experiments de *pull-down* (veure 30), es van sintetitzar mitjançant transcripció i traducció *in vitro* utilitzant el kit TNT<sup>R</sup> (Coupled Reticulocyte Lysate System de Promega). Amb aquesta finalitat, l'insert *PHOR1* i les diferents delecions d'aquest gen es van clonar al vector pET28a, que inclou un promotor T7 RNA polimerasa, adequat per a la transcripció en aquest sistema. Es van seguir les instruccions del fabricant, utilitzant com a aminoàcid marcat <sup>35</sup>S-metionina. La reacció es va dur a terme en un volum final de 50 µl, que contenen 2 µg de DNA plasmídic, 20 pmol (20 µCi) de <sup>35</sup>S-Met i l'extracte TNT<sup>R</sup> RNA polimerasa T7. La reacció es va incubar a 30°C durant 1,5 hores, i es va comprovar el marcatge de la proteïna en un gel SDS-PAGE al 20%, carregant 5 µl de la reacció de TNT amb 5 µl de 2xTM + 10% de -mercaptoetanol. Un cop corregut el gel, aquest es va assecar al buit i s'exposà a una pel·lícula d'autoradiografia a temperatura ambient durant tota la nit.

## 15 Transformació transitòria de cèl·lules de *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY2).

Amb l'objectiu d'estudiar *in vivo* la localització subcel·lular de la proteïna PHOR1 es va transformar de manera transitòria cèl·lules de tabac *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2, mitjançant la tècnica de bombardeig de partícules d'or recobertes amb el DNA d'interès (en el nostre cas pUC-2x35S-PHORI-GFP).

### 15.1 Creixement de la suspensió cel·lular de *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2:

1. Fer créixer la suspensió de cèl·lules BY2 de tabac en un flascó Erlenmeyer de 250 ml contenint 50 ml de medi NT, mitjançant incubació a 28°C amb agitació (150 rpm.).
2. Subcultivar les cèl·lules cada 7 dies mitjançant transferència de 5 ml del cultiu anterior (aquest volum pot variar depenent de la densitat de cèl·lules) a 50 ml de medi NT fresc.
  - Medi NT: 5 g/L sals Murashige and Skoog (Duchefa), 1 mg/ L timentina, 200 mg/ L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 mg/L 2,4D, 100 mg/L inositol, 30 g/L sacarosa. Ajustar a pH 5,8 i autoclavar.  
Per a medi sòlid afegir 2 g/L de Gelrite (Duchefa) abans d'autoclavar.

### 15.2 Transformació transitòria de les cèl·lules BY2

#### Preparació de les partícules d'or:

1. Pesar 60 mg de les partícules d'or d'1 µm de diàmetre (BIO-RAD).
2. Rentar amb un 1 ml d'etanol absolut de qualitat HPLC.
3. Barrejar durant 10 minuts.
4. Centrifugar durant 1 minut a 10,000 rpm..
5. Rentar quatre cops amb 50% glicerol estèril.
6. Barrejar durant 1 minut.

7. Centrifugar durant 1 minut a 10,000 rpm..
8. Resuspendre el sediment en 1 ml de glicerol 50% estèril.
9. Barrejar durant 1 minut.
10. Repartir en al·liqüotes de 50 µl.
11. Guardar a -20°C.

### **Precipitació del DNA sobre les partícules d'or:**

1. Preparar una barreja de DNA (2 µg) amb H<sub>2</sub>O estèril en un volum final de 10 µl.
2. Sonicar les partícules d'or durant 3 minuts.
3. Resuspendre bé les partícules amb el vortex i afegir 15 µl d'aquestes al DNA.
4. Agitar al vortex durant 10 minuts.
5. Sense deixar d'agitar afegir 25 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M.
6. Agitar al vortex durant 10 segons.
7. Sense deixar d'agitar, afegir 10 µl d'espermidina 0,1 M.
8. Agitar al vortex durant 30 segons.
9. Incubar la barreja durant 15-30 minuts en gel.
10. Un cop el DNA ha precipitat sobre les partícules d'or, descartar el sobrenedant.
11. Afegir 500 µl d'etanol HPLC absolut.
12. Agitar al vortex durant 20 segons.
13. Deixar en gel durant 5-10 minuts i treure el sobrenedant.
14. Afegir 180 µl d'etanol HPLC absolut.
15. Descartar el sobrenedant i afegir novament 180 µl d'etanol HPLC.
16. Agitar al vortex durant 20 segons.
17. Deixar en gel durant 10 minuts i descartar de nou el sobrenedant
18. Resuspendre el precipitat de partícules d'or recobertes amb el DNA en 12,5 µl d'etanol HPLC absolut.
19. Mantenir en gel i no trigar molt de temps en bombardejar, per evitar l'agregació de les partícules.

### **Transformació de les cèl·lules de tabac BY-2:**

1. El dia anterior al bombardeig, filtrar al buit 4 ml de la suspensió de cèl·lules BY-2 (3-4 dies després del seu últim subcultiu) sobre papers de filtre rodons (HAWP04700, Millipore), prèviament autoclavats i assecats. Abans de filtrar les cèl·lules humitejar els filtres amb 2 ml de medi NT líquid.
2. Transferir els filtres a una placa de petri amb medi NT sòlid (2 g/L de Gelrite) e incubar tota la nit a 28°C en fosc.
3. 2 hores abans del bombardeig transferir els filtres a un medi NT sòlid amb 0,2 M manitol (cèl·lules control), NT sòlid 0,2 M manitol + 50 µm GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) i NT sòlid + 0,2 M Manitol + 5 mg/L ancimidol (ancymidol) e incubar com abans.
4. Procedir al bombardeig utilitzant l'accelerador de partícules de sobrepressió d'heli (PDS-1000/He; BIO-RAD). Bombardejar cada filtre dos cops amb 8 µl de partícules d'or recobertes amb el DNA.
5. 2 hores després del bombardeig transferir els filtres a un medi NT sòlid sense manitol (cèl·lules control), NT + 50 µm GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) i NT sòlid + 5 mg/L ancimidol (ancymidol)
6. Incubar a 28°C en fosc durant 2-18 hores abans de l'anàlisi al microscopi, fent servir epifluorescència i els filtres adequats per a GFP

## 16 Transformació estable de cèl·lules BY2

Amb l'objectiu de fer l'estudi de la cinètica de localització de la proteïna de fusió PHOR1::GFP es van transformar cèl·lules BY2 de manera estable, per infecció amb una soca d'*Agrobacterium tumefaciens* prèviament transformada amb un vector binari pBin19 que conté la construcció 2x35S-PHOR1-GFP. Els calls obtinguts es van analitzar al microscopi òptic i també per *western*, per immunodetecció amb un sèrum comercial anti-GFP de conill. Es van seleccionar 3 calls, que mostraven nivells alts, nivells intermedis i nivells baixos d'expressió de la proteïna de fusió PHOR1::GFP. Amb aquests es feren els estudis de cinètica de migració al nucli, en cèl·lules tractades amb GA<sub>3</sub> i ancimidol, analitzant la fluorescència corresponent a la proteïna GFP a les 2h, 4h, 6h, 8h i 24h després del tractament.

### 16.1 Transformació estable de cèl·lules de tabac BY-2

1. Infectar 4 ml d'un cultiu de cèl·lules de tabac BY2 (3 dies després del seu últim subcultiu) amb 100 µl del cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens* transformat amb la construcció d'interès (pBin19-2x35S-PHOR1-GFP) crescut fins a una  $DO_{600} = 0.8$  (veure 19). La infecció es fa a una placa de petri estèril de 4 cm de diàmetre .
2. Incubar durant 2 dies a 28°C en fosc.
3. Recollir les cèl·lules infectades i fer 3 rentats amb 5 mL de medi NT líquid.
4. Centrifugar durant 10' a 200 g a temperatura ambient.
5. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules amb 5 mL de medi NT líquid amb 100 mg/L de timentina (Duchefa).
6. Plaquejar 2x2 ml de les cèl·lules sobre medi NT sòlid que conté 100 mg/L timentina i 100 mg/L kanamicina.
7. Incubar durant 2-3 setmanes a 28°C a les fosques.
8. Després de 2-3 setmanes comencen a aparèixer uns calls grocs. Quan aquests tenen entre 1-2 mm de diàmetre es poden passar a un medi sòlid NT fresc que conté 100 mg/L timentina i 100 mg/L kanamicina.
9. Incubar durant aproximadament 2 setmanes més a 28°C en fosc.
10. Quan el calls tenen aproximadament 0,5 cm de diàmetre, passar-los a un medi fresc i canviar-los cada 2-3 setmanes.
11. Analitzar els calls al microscopi òptic sota llum UV i els filtres adequats. Preparar extractes proteics totals dels calls i analitzar-los per *western* mitjançant immunodetecció amb un sèrum comercial anti-GFP o amb el sèrum anti-PHOR1.

### 16.2 Obtenció de suspensions cel·lulars a partir dels calls transformats

Un cop analitzats els calls es varen obtenir suspensions cel·lulars dels calls que expressaven nivells elevats, nivells intermedis i nivells baixos de la proteïna de fusió PHOR1:GFP.

1. Disgregar un call d'aproximadament 0.5 cm en 50 ml de medi NT líquid +100 mg/L timentina i 50 mg/L kanamicina en un flascó Erlenmeyer de 250 ml.
2. Incubar durant 2 setmanes a 28°C, en agitació a 150 rpm., i a les fosques.
3. Fer un subcultiu a 50 ml de medi NT líquid fresc amb 100 mg/L timentina i 50 mg/L kanamicina, en un flascó Erlenmeyer de 250 ml. Per a calcular el volum necessari per al subcultiu, deixar sedimentar les cèl·lules en un tub Falcon de 50 ml durant 30 minuts. Si el cultiu ha crescut be, dels 50 ml de cultiu, uns 20-35 ml han de ser cèl·lules sedimentades.
4. Tornar a resuspendre les cèl·lules i passar 5 ml a 50 ml de medi fresc.
5. L'estadi idoni per a fer els estudis de localització és 3 dies després del subcultiu.

### **16.3 Tractament de la suspensió cel·lular amb GA3 i ancimidol**

1. Dividir el cultiu en 3 flascons Erlenmeyer de 100 ml. Tractar un d'ells amb 50 µM GA3 i l'altre amb 5 mg/L d'ancimidol, deixant l'altre Erlenmeyer sense tractar (control).

### **16.4 Extracció de proteïnes totals dels calls transformats**

Amb l'objectiu de comprovar, mitjançant *western*, que la proteïna de fusió PHOR1::GFP expressada als calls corresponia al pes molecular esperat, es va procedir a l'extracció de proteïnes totals i posterior immunodetecció dels extractes amb un anticòs policlonal anti-GFP comercial de conill (Molecular Probes).

#### **Extracció de proteïnes totals de calls:**

1. Congelar en N<sub>2</sub> líquid els calls dins d'un tub eppendorf.
2. Liofilitzar la mostra durant 7-10 hores.
3. Homogeneïtzar la mostra en 100 µl de tampó I.

4. Centrifugar durant 20 minuts a 13,000 rpm. a 4°C.
5. Recuperar el sobrenedant i utilitzar 2 µl per a mesurar la concentració de proteïnes mitjançant assaig Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad).
6. Carregar 40 µg de l'extracte proteic per carril i transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa per a detectar la proteïna de fusió mitjançant anàlisi *western*.

### **16.5 Immunodetecció de la proteïna de fusió PHOR1::GFP**

Per a la immunodetecció de la proteïna de fusió PHOR1:GFP s'ha utilitzat un sèrum immune de conill anti-GFP (Molecular Probes) a una dilució 1/2000. En tots els casos s'ha utilitzat 40 µg de l'extracte proteic. El revelat de l'assaig *western* s'ha realitzat per luminiscència, seguint les instruccions del fabricant (ECL, Amersham).

## **17 Microscopia òptica i confocal**

Les cèl·lules BY2 transformades s'han analitzat en un microscopi òptic Zeiss Axiophot amb epifluorescència. Per a la detecció de la fluorescència específica de la GFP s'han utilitzat els filtres Zeiss de 450-490 nm, FT510 i LP520.

Per a la microscopia confocal es va utilitzar un microscopi confocal Olympus (Fluoview FV300 confocal laser scanning microscope) del servei de Microscopia de la Universitat Central de Barcelona.

## **18 Microscopia electrònica e immunocitoquímica**

Per tal de comprovar la localització subcel·lular de la proteïna PHOR1 a cèl·lules de patatera ó a les cèl·lules BY2 transformades, es van realitzar experiments d'immunocitoquímica utilitzant arrels i fulles de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, ó els calls

transformats que sobre-expressaven fortament la proteïna de fusió PHOR1:GFP. Aquests experiments es van fer amb l'ajut de la Dra. Ludevid del Departament de Genètica Molecular del CID-CSIC de Barcelona i el Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Per tal d'aturar de manera ràpida les activitats enzimàtiques que donarien lloc a la degradació dels teixits, i evitar l'aparició d'artefactes degut a la difusió de pèptids i proteïnes fora de la cèl·lula, ó fora dels orgànuls cel·lulars, els teixits es van fixar de la següent manera:

### **18.1 Fixació i inclusió**

1. Tallar els teixits en trossos d'aproximadament 1 mm<sup>3</sup> i fixar-los en una solució al 2% paraformaldehid i 2.5% glutaraldehid en un tampó 20 mM, fosfat sòdic pH 7.2.
2. Infiltrar mitjançant l'aplicació del buit durant aproximadament 1 hora. El paraformaldehid és un fixador suau però amb gran poder de penetració en el teixit. Per contra, el glutaraldehid és un fixador fort però amb baix poder de penetració, per això la barreja de tots dos té grans avantatges.
3. Rentar tres cops, els trossos de teixit amb tampó fosfat sense deixar que les mostres s'assequin.
4. Deshidratar amb diferents series d'etanol, la primera al 30% s'incuba durant 30 min a 0°C, mentre que les següents, al 50%, 70% i 90%, d'etanol s'incuben cadascuna durant 1 hora a -20°C. Fer una última deshidratació amb etanol al 100% durant 2 hores a -20°C.
5. Incloure les mostres per infiltració a -20°C amb concentracions creixents de la reïna Lowicryl K4M: Lowicryl/etanol 1:3 durant 1 hora; Lowicryl/etanol 1:1, 1 hora; Lowicryl/etanol 2:3, 1 hora; Lowicryl 100% durant tota la nit i després d'un canvi deixar 24 hores més en aquesta mateixa solució.
6. Polimeritzar amb llum ultraviolada els trossos de teixit en petites càpsules de gelatina, deixant-los 2 dies a -20°C i dos dies més a temperatura ambient.
7. Fer talls semifins dels teixits i un cop seleccionades les regions que interessin realitzar talls ultrafins, els quals es col·loquen sobre reixetes d'or per a la incubació amb els anticossos.



### 18.2 Incubació amb els sèrums de conill:

Els talls de fulles i arrels de patatera *S. tuberosum* ssp. *andigena* es van incubar amb una dilució 1/500-1/1000 del sèrum immune de conill en front del domini NT de PHOR1 (veure 9).

Els talls de cèl·lules BY-2 de tabac transformades amb la construcció de sobre-expressió *pBin19-2x35S-PHOR1-GFP* es van incubar amb un sèrum comercial de conill anti-GFP (Molecular Probes) a una dilució 1/500-1/1000.

1. Tractar les reixetes amb HCl 0.1 M durant 10 min per treure tot el glutaraldehid possible de la mostra.
2. Rentar 4 x 10 min amb PBS.
3. Incubar amb una solució de bloqueig (PBS1X, 0.1% tween-20, 1% ovoalbúmina) durant 1 hora a temperatura ambient dins una petita cambra humida.
4. Passar les mostres a una nova solució de bloqueig que conté l'anticòs primari e incubar tota la nit a 4°C, també en cambra humida.
5. Rentar 3 x 10 min amb PBS1X, 0.5% tween-20.
6. Incubar amb Proteïna-A conjugada amb partícules d'or de 15 nm (G-5652 de Sigma) a una dilució 1/60 en solució de bloqueig, durant 1 hora a temperatura ambient.
7. Rentar 3 x 10 min amb PBS1X, 0.1% tween-20.
8. Rentar 3 x 10 min amb PBS 1X i 6 x 10 min amb aigua MilliQ.
9. Assecar les reixetes sobre paper de filtre amb el teixit a la cara superior.
10. Contrastar i visualitzar al microscopi electrònic de transmissió Phillips EM 301.

### 19 Transformació de *Solanum tuberosum* ssp *andigena*.

Per a la transformació estable de plantes de patatera es van infectar fulles amb cultius de la soca de *Agrobacterium tumefaciens* C58:C1 que porta el plasmid de virulència GV2260 segons el mètode descrit per Rocha-Sosa *et al.* (1989). *A. tumefaciens* és un bacteri gram negatiu que infecta diferents espècies de plantes tant monocotiledònies

com dicotiledònies. El T-DNA que conté la construcció d'interès, s'integra al genoma de la planta per un procés de transferència per al que es requereix els gens de virulència (*vir*) presents al plasmid GV2260. Al posar en contacte el bacteri i la fulla a la que s'ha provocat una ferida, el bacteri infecta el teixit. En aquest període de contacte el bacteri transfereix al teixit el plasmid Ti i el T-DNA s'integra al material genètic del teixit, transcrivint-se més tard com si fos un gen propi de la planta.

Per a la transformació estable de plantes es varen transformar cèl·lules competents de la soca *C58:C1* (Höfgen i Willmitzer, 1988) amb un plasmid binari portador de la construcció que es volia introduir a la planta. Es varen infectar les fulles seccionades i aquestes es cultivaren en un medi selectiu que a més inclou les hormones vegetals necessàries per a induir calls indiferenciats i més tard regenerar les plantes transgèniques. A continuació es detalla el procediment seguit per a la obtenció de plantes transgèniques.

### **19.1 Preparació i transformació de cèl·lules competents d'*Agrobacterium* de la soca *C58:C1***

#### **Procediment de preparació de cèl·lules competents d'*A.tumefaciens* de la soca *C58:C1*:**

1. Es creix un cultiu o/n de la soca *C58:C1* d'*A. tumefaciens* en medi YEB amb 100 µg/mL de rifampicina i 100 µg/mL de carbenicilina, a 28°C.
2. Amb 2 mL d'aquest cultiu s'inocula 200 mL de medi YEB/Rif/Cb. S'incuba a 28°C amb agitació fins a una  $DO_{600} = 0.5-1.0$ .
3. Es refreda el cultiu en gel 10 min.
4. Es centrifuga 20 min a 3,000 rpm a 4°C.
5. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el sediment de cèl·lules en 20 mL de 1xTE pH 7.5, prèviament atemperat a 4°C.
6. Es centrifuga 20 min a 3,000 rpm a 4°C. Es renta de nou amb 1xTE per tal d'eliminar la major part dels polisacàrids de la paret cel·lular d'*A. tumefaciens*, que podrien interferir amb la penetració del DNA plasmídic a l'interior de la cèl·lula.
7. Es resuspèn les cèl·lules en 20 mL de medi YEB fresc i s'aliquota en volums de 0,5 mL.

8. Es congelen les cèl·lules immediatament en N<sub>2</sub> líquid i es guarden a -80°C un màxim de 1 any.

L'eficiència de transformació de les cèl·lules competents d'*A. tumefaciens* és molt inferior que la d' *E. coli*. Així cal emprar aproximadament 1 µg de plasmid per transformació.

### **Procediment de transformació:**

1. Es descongelen les cèl·lules competents en gel
2. S'afegeix 1-2 µg de DNA plasmídic i s'agita suaument.
3. S'incuba 5 min en gel.
4. Seguidament s'incuba 5 min en N<sub>2</sub> líquid.
5. Es passa a un bany o bloc d'incubació ajustat a 37°C, i s'incuba 5 min.
6. S'afegeix 1 mL de medi YEB i s'incuba amb agitació 2-4 h a 28°C.
7. Es plaqueja la totalitat del cultiu en plaques de medi YEB + rifampicina + kanamicina (25 µg/ml, selecciona la presència del plasmid binari).
8. S'incuben las plaques 2-3 dies a 28°C
9. S'analitzen las colònies mitjançant una minipreparació de DNA per a comprovar la presència del plasmid binari.

La diferència en les mini-preparacions de DNA plasmídic d'*A.tumefaciens* respecte a les de *E. coli*, radica en què després de sedimentar les cèl·lules, cal eliminar l'excés de polisacàrids de la paret mitjançant un rentat amb 1 mL de STE (es resuspèn el sediment de bacteris en aquest tampó i es centrifuga de nou). A partir d'aquí es segueix el protocol estàndard per a la preparació de plasmid d'*E.coli*.

- **STE:** 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 i 1 mM EDTA.
- **YEB:** 5 g/L extracte de carn, 1 g/L extracte de llevat, 5 g/L peptona, 5 g/L sacarosa, 2 mM MgSO<sub>4</sub>. S'ajusta a pH 7,2 i per a plaques s'afegeix 13g/L d'agar. S'autoclava 20min.

### **19.2 Infecció de *Solanum tuberosum* ssp *andigena*.**

1. S'empren plantes de patata de 3-4 setmanes crescudes *in vitro* en medi MS amb 2% de sacarosa (2MS).
2. Es col·loca 10 mL de 2MS líquid en una placa de Petri. Es recullen les fulles tallant-les pel pecíol i es fa un tall al mig, travessant el nervi central però sense arribar als extrems de la fulla. Es talla la resta de pecíol a la base de la fulla.
3. Es col·loquen aproximadament 50 fulles, amb l'anvers de la fulla cap amunt en una placa de Petri.
4. S'afegeix 30-50 µL de cultiu a  $D.O_{600}=0.8$  d'*Agrobacterium tumefaciens*, crescut amb rifampicina i kanamicina. S'agita suaument durant 10 min.
5. S'incuben les fulles durant 2 dies en foscor a 22°C.

### 19.3 Regeneració de plantes transgèniques de patatera.

1. Es treuen les fulles del medi d'infecció i es transfereixen a plaques amb medi d'inducció de calls, que conté una elevada concentració d'auxines.
  2. Es deixen una setmana, transcorreguda la qual es transfereixen a plaques amb medi d'inducció de tiges, que conté una concentració elevada de citoquinines. Les fulles es canvien a medi fresc cada 7-10 dies fins a l'aparició de plàntules.
  3. Quan les plàntules tenen 1-2 cm, es poden tallar i transferir a gerres amb medi 2MS que conté 250 mg/l claforan i 50 mg/l kanamicina, per tal de mantenir la pressió selectiva e inhibir el creixement d' *A. tumefaciens*.
- MS: 4.7 g/L sals Murashige and Skoog (Duchefa), 20 g/L sacarosa, 0,5 g/L MES. S'ajusta a pH 5,8 amb KOH i s'afegeix 2 g/L de Gelrite (per a medi sòlid).
  - MG: És idèntic al medi MS però en comptes de 20 g/L de sacarosa porta 16g/L de glucosa.
  - CIM: medi 2MG, suplementat amb NAA, BAP, kanamicina i claforan segons s'indica a la Taula 2
  - SIM: medi 2MG, suplementat amb NAA, BAP, zeatin ribòsid, GA<sub>3</sub>, kanamicina i claforan segons s'indica a la Taula 2

Les hormones i els antibiòtics que es dissolen en aigua, s'esterilitzen per filtració a través de membranes de 0.22 µm de diàmetre. En canvi els que es dissolen en DMSO o etanol, s'utilitzen directament sense filtrar. En qualsevol cas, les solucions d'antibiòtics i hormones es guarden a -20°C, i s'addicionen al medi després d'autoclavar i un cop atemperat a 55°C.

**Taula 3.** Hormones i antibiòtics emprats per a la regeneració de plantes.

Compost	Stock	Medi d'inducció de calls (CIM)	Medi d'inducció de tiges (SIM)
claforan	250 mg/ml	250 mg/l	250 mg/l
cefotaxima sódica	en aigua		
kanamicina	50 mg/ml	50 mg/l	50 mg/l
monosulfat	en aigua		
NAA	5 i 1 mg/ml	5 mg/l	0.02 mg/l
àcid -naftalenacètic	en DMSO		
BAP	1 mg/ml	0.1 mg/l	-
benzilaminopurina	en etanol		
GA <sub>3</sub>	1 mg/ml	-	0.02 mg/l
àcid giberèlic	en etanol		
ZR	2 mg/ml	-	2 mg/l
zeatin ribòsid	en DMSO		

## 20 Tractaments amb GA<sub>3</sub>

El tractament amb àcid giberèlic (GA<sub>3</sub>) per l'estudi de la resposta (allargament dels entrenusos de les plantes de patatera), s'ha fet vaporitzant les plantes, cada dos dies, amb diferents concentracions de GA<sub>3</sub> ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M GA<sub>3</sub>). Les diferents concentracions s'aconseguien per dilució d'una solució mare 1M GA<sub>3</sub> en etanol, en 50 ml d'aigua que contenia 0,01% Triton X-100 com a surfactant.

## 21 Determinació de giberel·lines.

Les GAs de plantes de patatera *S. tuberosum* ssp *andigena* control i GA<sub>3</sub> van ser extretes, purificades i quantificades mitjançant GC-MS (García-Martínez et al., 1991)

amb el mateix procediment descrit per Carrera et al., 2000 i amb la col·laboració del Dr. Jose-Luis Garcia-Martínez de l'Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes, Universitat Politècnica de València-CSIC. L'extracció es va fer a partir de l'àpex i les tres primeres fulles de les plantes crescudes en condicions de dia llarg (LD), quan tenien 6 fulles d'alçada.

El material vegetal objecte de determinació de GAs es congela en N<sub>2</sub> líquid i es tritura finament. S'afegeix un volum de metanol (MeOH) 80% fred equivalent a 10mL/g de pes fresc (PF) i s'homogeneïtza al Polytron. S'addicionen les GAs deuterades que serveixen per estimar les pèrdues de GAs durant l'extracció i purificació i també GAs radioactives que serveixen de patró per a les GAs a analitzar, i també s'utilitzen per a seguir la presència de GAs en els diferents passos d'extracció. Es deixa en metanol o/n a 4°C, i al dia següent es filtra en Büchner amb paper de filtre. S'extreu dos cops més el residu sòlid amb 5 volums de metanol durant 30 min, i es filtra. Es combinen els extractes i s'elimina el MeOH en rotavapor al buit.

#### **Purificació per partició entre dissolvents:**

S'ajusta el volum amb aigua fins a 20 mL, s'ajusta a pH 3 amb HCl 3N, i s'extreu tres cops amb un volum d'acetat d'etil. Es combina les fases orgàniques i s'extreu amb una 1/6 part de NaHCO<sub>3</sub> al 5%. Es combinen les fraccions aquoses, es porta a pH 3 amb HCl 3N, i s'extreu de nou tres cops amb un volum d'acetat d'etil. La fracció orgànica àcida es porta a sequedat.

#### **Purificació en columna d'intercanvi iònic i cartutx Sep-Pack:**

El residu sec es dissol en 5mL d'aigua a pH 8, i es carrega en columna de QAE Sephadex A-25 (Pharmacia), prèviament equilibrada amb aigua pH 8. Es renta amb 15mL d'aigua pH 8, i s'elueixen les GAs amb 20 mL d'àcid fòrmic 0,2N. L'eluit de la columna es passa per un cartutx Sep-Pack (Varian), prèviament equilibrat amb metanol/aigua (1:1) que s'ha ajustat a pH 3 amb àcid fòrmic 0,2N. Es renta amb 10 mL d'aigua a pH 3, i s'elueixen les GAs amb 5mL de metanol 80%. Es porta a sequedat en rotavapor i es resupèn en 500µL de metanol 10%.

### **Fraccionament de les GAs per HPLC:**

Per a la separació de les GAs s'ha emprat un cromatògraf Hewlett.Packard 1050 amb una columna de fase inversa Nova Pack C<sub>18</sub> de 4µm (Millipore). S'utilitza un gradient lineal del 10% al 100% metanol (contenint 50mL/L d'àcid acètic) en 40 min, emprant un flux de 1mL/min. Les fraccions es combinen segons el temps de retenció de les GAs radioactives i es porten a sequedat.

### **Preparació de derivats i quantificació:**

Es dissol el residu sec en 500mL de MeOH, i es metila amb diazometà durant 15min. Es porta a sequedat, i es transfereix a vials, obtenint els trimetilsilil-derivats per addició de 10mL de MSTFA i incubació a 90°C durant 30 min. Les GAs es quantifiquen per GC-MS (cromatògraf de gasos HP5890 i detector de masses HP5971, de Hewlett Packard). Els nivells de GAs s'obtenen calculant la relació de les parelles de ions predominants seleccionats (Hedden, 1987). Aquestes parelles foren: per GA<sub>1</sub>(506/508), GA<sub>4</sub>(284/286), GA<sub>19</sub>(418/420), GA<sub>29</sub>(506/508), GA<sub>9</sub>(298/300),GA<sub>44</sub>(432/434), GA<sub>20</sub>(418/420).

## **22 Metodologia general.**

### **23.1 Medis i solucions generals.**

Alguns medis i solucions són emprats de manera general:

- **Medis de cultiu:**

LB: 10g/L de Bactotripton, 5g/L d'extracte de llevat i 10g/L de NaCl. Ajustar pH a 7 amb NaOH.

2YT: 16g/L Bactotripton, 10g/L d'extracte de llevat i 10g/L de NaCl. Ajustar pH a 7 amb NaOH.

Per a medi sòlid s'afegeix 15g/L d'agar.

• **Solucions:**

Fenol saturat: es fon el fenol a 60°C i s'equilibra un cop amb un volum de 1 M Tris-HCl pH 8 i varies vegades amb un volum de TE, fins que el pH de la fase aquosa és superior a 7,5. S'afegeix un 0,1% d'hidroxiquinoleina (p/v) i 0,1 volums TE amb un 0,2% de -mercaptoetanol. Es guarda a 4°C protegit de la llum.

Fenol /CHCl<sub>3</sub> /alcohol isoamílic (25:24:1): es barregen els components en proporció 25:24:1 i es permet la separació de les fases. Es guarda a 4°C protegit de la llum.

Solució de RNAsa A lliure de DNAsa: es dissol 10 mg/mL de RNAsa A en una solució 10mM Tris-HCl pH 7,5 i 15 mM NaCl. S'incuba 15 min a 100°C. Es deixa refredar a temperatura ambient i es guarda en al·liqüotes de 1 mL a -20°C.

1xTE: es prepara a partir d'una solució 1 M Tris-HCl al pH desitjat, i d'una solució 0,5 M EDTA pH 8. La concentració final de la solució és 10 mM Tris i 1mM EDTA.

50xTAE: 2M Tris-acetat pH 8,1 i 0,1 M EDTA.

10xTBE: 0,89 M Tris base, 0,89 M àcid bòric, 20mM EDTA.

**22.2 Antibiòtics.**

A continuació es detallen els antibiòtics emprats, així com altres productes també utilitzats per al creixement de bacteris.

**Taula 4.** Relació de dosis d'antibiòtics i d'altres productes emprats per al creixement de bacteris.

Antibiòtic	Stock	Dissolvent	Concentració de treball
ampicilina	50 mg/ml	50% etanol	100 µg/ml
kanamicina	25 mg/ml	aigua	50 µg/ml
tetraciclina	12,5 mg/ml	etanol	12,5 µg/ml
X-gal	20 mg/ml	N-N-dimetilformamida	40 µg/ml
IPTG	23.8 mg/ml	aigua	23.8 µg/ml



---

rifampicina	50 mg/ml	DMSO	100 µg/ml
-------------	----------	------	-----------

---

Els medis de selecció es suplementen amb els antibiòtics necessaris, després d'atemporar el medi a 55°C. Les solucions mare es poden guardar a -20°C. El X-gal s'ha de protegir de la llum.

### **22.3 Preparació de DNA plasmídic.**

L'extracció de DNA plasmídic s'ha realitzat per lisi alcalina segons el mètode descrit per Birnboim i Doly (1979) amb modificacions posteriors de Sambrook *et al.* (1989). Aquest mètode s'ha utilitzat tant en mini-preparacions com per a maxi preparacions a major escala (els valors indicats entre parèntesi). El procediment és el següent:

1. S'inocula 1 colònia bacteriana (pre-cultiu de 2-5 mL) en 2 mL(200 mL) de medi LB amb l'antibiòtic adient. S'incuba o/n amb agitació a 37°C.
2. Es centrifuga el cultiu 2 min a 13,000 rpm (10 min a 5,000 rpm).
3. Es resuspen el sediment de bacteris en 100 µL (2,5 mL) de Solució I.
4. S'afegeixen 200 µL (5 mL) de Solució II, i es barreja suaument amb el vòrtex.
5. S'incuba 5 min (10 min) en gel.
6. S'afegeixen 150 µL (3,75 mL) de Solució III i s'agita amb el vòrtex.
7. S'afegeixen 400 µL (10 mL) de la mescla fenol/ CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (25:24:1).
8. S'agita en el vòrtex i es centrifuga 10' a 13,000 rpm (15 min a 7,000 rpm) a temperatura ambient.
9. Es transfereix el sobrenedant a un tub nou i s'afegeixen 2,5 volums d'etanol.
10. Es centrifuga 10' a 13,000 rpm (15 min a 7,000 rpm).
11. Es descarta el sobrenedant i es renta el precipitat de DNA+RNA amb etanol 70%.
12. Es centrifuga 5 min 13,000 rpm (5 min a 7,000 rpm) i es descarta el sobrenedant.
13. S'asseca lleugerament el precipitat i es dissol en 50 µL (1 mL) de 1xTE amb RNAsa 100 µg/mL.

Per a maxi-preparacions de DNA plasmídic és convenient purificar el DNA abans d'afegir-hi 1xTE amb RNAsa. A partir del punt 12 es segueix aquest procediment:

14. S'asseca el precipitat i es dissol en 1mL de 1xTE.
15. S'afegeix un volum de LiCl 5M a 4°C, i s'incuba 15 min en gel, per tal de precipitar la major part del RNA.
16. Es centrifuga 5 min a 13,000rpm.
17. Es recupera el sobrenedant i s'afegeix 2,5 volums d'etanol 100%.
18. Es centrifuga 10 min a 13,000 rpm i es renta el precipitat amb etanol 70%.
19. S'asseca lleugerament el sediment de DNA i es dissol en 1 mL de 1xTE amb RNAsa 100 µg/mL.

Després d'incubar amb el 1xTE amb RNAsa es pot fer un pas addicional de purificació tant per a mini-preparacions com per a maxi-preparacions:

20. S'afegeix 1/10 part de solució III.
21. S'extreu amb un volum de la mescla fenol/ CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (25:24:1)
22. S'agita en el vòrtex i es centrifuga 10 min a 13,000 rpm.
23. Es recupera el sobrenedant i s'eliminen les restes de fenol per extracció amb la mescla CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílic (24:1).
24. S'agita en el vòrtex i es centrifuga 5 min a 13,000 rpm.
25. Es recupera el sobrenedant i s'afegeixen 2,5 volums d'etanol 100%.
26. Es centrifuga 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambient.
27. Es renta el precipitat amb etanol 70% i es centrifuga 5 min a 13,000rpm
28. S'asseca el sediment i es dissol en 50 µL (400 µL) de 1xTE.
  - Solució I: 25mM Tris·HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8.
  - Solució II: 200mM NaOH, 1% SDS.
  - Solució III: 3M Acetat potàsic, ajustar a pH 4,8 amb àcid acètic.

#### **22.4 Transformació d'E.coli.**

Per a la transformació d'*E.coli* s'han emprat cèl·lules competents de la soca de *DH5α*.. La permeabilització de les cèl·lules amb clorur de calci i clorur de rubidi permet crear

un estat de competència de manera que són capaces d'acceptar DNA plasmídic exògen, que incorporen com a element de replicació autònoma. A continuació es detalla la seva preparació i transformació:

### **Preparació de les cèl·lules competents *DH5α* (Hannahan *et al.* 1983):**

Convé que les cèl·lules de partida siguin recents i vigoroses, per la qual cosa es bo de fer dues incubacions successives en medi líquid i placa:

1. S'inoculen 4 o 5 colònies aïllades de la soca *DH5α* en 50 mL de medi 2YT.
  2. S'incuba amb agitació (300 rpm) a 37°C fins que  $DO_{600} = 0,5$  (2-3h)
  3. Es refreda el cultiu en gel durant 10 min.
  4. Es centrifuga 10 min a 4.000 rpm a 4°C.
  5. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn les cèl·lules en 15 mL TBF1.
  6. S'incuba 10 min en gel.
  7. Es centrifuga 10 min a 5,000 rpm a 4°C.
  8. Es decanta el sobrenedant i s'inverteix el tub durant 1 min, per tal d'eliminar totalment les restes del tampó TBF1.
  9. Es resuspèn el sediment en 2 mL de TBF2 fred.
  10. S'aliqüota les cèl·lules en fraccions de 100 µL en tubs eppendorf estèrils i es congelen en N<sub>2</sub> líquid. Es poden guardar a -80°C durant 1 any.
- **TBF1**: 30 mM CH<sub>3</sub>COOK pH 5.8 (equilibrar amb AcOH 2N) 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 15% glicerol.
  - **TBF2**: 10 mM MOPS pH 7.0 (equilibrar amb NaOH 10N) 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% glicerol.

Ambdues solucions s'esterilitzen per filtració a través de membranes de 0.22 µm de diàmetre de por.

### **Transformació de les cèl·lules competents *DH5α*:**

1. Es descongela en gel un tub de cèl·lules competents.
  2. S'afegeix el DNA i es barreja bé.
  3. S'incuba 30 min en gel. (El DNA se situa al voltant de la paret bacteriana).
  4. S'incuba durant 2 min a 42°C sense moviment. (El DNA travessa la membrana bacteriana).
  5. Es transfereix ràpidament en gel i s'incuba durant 10 min més.
  6. S'afegeixen 800 µL de medi SOB i s'incuba amb agitació durant 1h a 37°C.
  7. Es plaquen 200 µL del cultiu per placa en medi LB i l'antibiòtic selectiu.
  8. S'incuben les plaques o/n a 37°C.
- **SOB:** 20 g/L Bactotripton, 5g/L extracte de llevat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl. S'ajusta a pH 7. S'autoclava i s'afegeix a partir d'una solució mare estèril, la sal de magnesi a una concentració final de 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

### **22.5 Enzims de restricció.**

En les digestions amb enzims de restricció s'ha emprat el protocol que es descriu a continuació seguint els procediments establerts per Sambrook *et al.* (1989) i Ausubel *et al.* (1991).

1. S'afegeix el DNA a digerir en un tub de manera que la seva concentració final estigui entre 0,1-0,5 µg/µL.
2. S'afegeix 1/10 del volum final de 10x tampó de digestió.
3. S'afegeix 1xTE fins al volum final.
4. S'addiciona 1-2 U d'enzim per µg de DNA. (Per a DNA genòmic s'empren 5-10 U d'enzim/µg de DNA).
5. S'incuba 1h a la temperatura de digestió òptima de l'enzim en qüestió. (Per a DNA genòmic s'allarga el temps de digestió).

### **23.6 Enzims de modificació.**

#### **Fragment Klenow de la DNA polimerasa:**

Els extrems protuberants generats per alguns enzims de restricció es poden transformar en extrems roms mitjançant l'activitat 5'-3' polimerasa del fragment Klenow de la DNA polimerasa d'*E.coli* (Promega). El procediment és el següent:

1. En un tub es col·loquen entre 0,5 i 2 µg del fragment de DNA amb els extrems protuberants.
2. S'afegeix 4 µL de 10xTampó Klenow (subministrat per la casa comercial o el tampó M de Boehringer), 10 µL dNTPs 2mM, 2 µL de 5U/µL de fragment Klenow i aigua fins a 40 µL.
3. Es mescla bé i es sotmet a un pols de centrífuga.
4. S'incuba la reacció durant 20 min a 20°C.
5. S'extreu amb la mescla fenol/ CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (25:24:1).
6. S'elimina la resta de fenol amb CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (24:1).
7. Es precipita el DNA amb etanol i es resuspen en 10 µL de 1xTE pH 7,4.

### **Pfu**

La Pfu DNA polimerasa permet modificar tant els extrems 5' com els 3' protuberants (generats per alguns enzims de restricció o be presents als productes de PCR degut a l'activitat terminal transferasa de la Taq polimerasa), ja que la Pfu té activitat polimerasa 5' 3' i també exonucleasa 3' 5'. Procediment:

1. En un tub es col·loquen entre 0,5 i 2 µg del fragment de DNA amb els extrems protuberants.
2. S'afegeix 10 µL de 10xTampó Pfu (subministrat per la casa comercial), 1 µL dNTPs 10mM, 1 µL Pfu 2,5U/µL i aigua fins a 100µL.
3. Es mescla bé i es sotmet a un pols de centrífuga.
4. S'incuba la reacció durant 30 min a 72°C.
5. S'extreu amb la mescla fenol/ CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (25:24:1).
6. S'elimina la resta de fenol amb CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (24:1).
7. Es precipita el DNA i es resuspèn en 10 µL de 1xTE pH 7,4.

### **Fosfatasa alcalina**

En clonatsges difícils en que el vector linearitzat es relliga fàcilment, es aconsellable d'emprar fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de vedella (CIP) (Promega) per tal de defosforilar els extrems 5' protuberants o roms del vector. Procediment:

1. Es mesclen en un tub 1 µg del DNA plasmídic linearitzat, 10 µL de 10xTampó CIP (subministrat per la casa comercial), 1U de CIP per cada 2 pmols d'extrems de vector i aigua fins a 100 µL. Es sotmet a un pols de centrífuga.
2. S'incuba 30 min a 37°C.
3. S'extreu amb la mescla fenol/CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílic (25:24:1) i després amb CHCl<sub>3</sub>/ alcohol isoamílic (24:1).
4. Es precipita el DNA i es resuspèn en 50 µL de 1xTE pH 7,4.

### **22.7 Lligació**

La lligació de fragments de DNA a vectors linearitzats s'ha realitzat ajustant la proporció molar entre el vector i el fragment a 1:5. El procediment seguit és:

1. En un tub es mesclen: 100-200 ng del fragment a lligar, 50-100 ng del vector, 2µL de 10xTampó de lligació , 0,5 µL DNA lligasa 5U/µL i aigua fins a 20 µL. Es fa un pols de centrífuga.
2. S'incuba o/n a 16°C.

### **22.8 Electroforesi en gels d'agarosa:**

L'electroforesi en gels d'agarosa permet la separació dels àcids nucleics segons la seva llargària al ser sotmesos a un camp elèctric que els obliga a travessar la malla formada pel gel d'agarosa, retardant la migració de les molècules més grans. Aquest sistema és adequat per a la separació de molècules de DNA de mida entre 100 y 20,000 pb, variant el percentatge d'agarosa segons la mida del DNA a separar (s'utilitza una concentració

d'agarosa menor a major llargària del DNA). S'ha seguit el mètode descrit per Sambrook *et al.* (1989).

1. Es pesa l'agarosa necessària per a obtenir el percentatge desitjat (entre 0,8-2 % segons la mida del DNA a separar).
  2. S'afegeix el volum adequat de tampó 1xTBE (o 1xTAE).
  3. Es fon l'agarosa al microones, i es comprova que la fusió sigui completa
  4. Es deixa atemperar a 50°C i s'afegeix 5 µL de bromur d'etidi (10mg/mL) per cada 100 mL de volum total.
  5. S'aboca en un motlle adient per a gels, en el que s'ha col·locat la pinta per formar els pous i es deixa refredar.
  6. Un cop solidificat se submergeix el gel en el tampó d'electroforesi 1xTBE (ó 1xTAE).
  7. Les mostres a les que s'ha addicionat 1/5 volum del tampó de càrrega, es carregen dins dels pous del gel.
  8. S'aplica un camp elèctric al gel de 70-150 V. El DNA està carregat negativament i migra cap a l'elèctrode positiu.
- 10xTampó de càrrega: 0,25% Blau de bromfenol, 0,25% xil.lè cianol FF, 50% glicerol, en 1xTE pH 7,4.

### **22.9 Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa.**

La purificació dels fragments de DNA a partir de gels d'agarosa s'han realitzat mitjançant el kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band purification Kit de Amersham Pharmacia, Biotech (*procedure B*). Es va seguir en tot moment les instruccions del fabricant.

### **22.10 Seqüenciació**

La determinació de les seqüències de DNA s'ha realitzat mitjançant seqüenciació automàtica, emprant el sistema Applied Biosystems de Pharmacia (Automated Laser Fluorescence).

### **22.11 Tractament de les seqüències i programes informàtics**

El tractament i comparació de les seqüències s'ha realitzat amb el paquet de programes del GCG que inclou el programa FASTA per a la recerca en els bancs de dades (Pearson i Lipman 1988) i el PILEUP per alineaments de seqüències (Feng i Doolittle 1987). Disponible on-line via internet es va emprar el programa BLAST per a la recerca en bancs de dades <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. També s'han emprat els programes de Microsoft Office 98, Adobe Photoshop 5.0 i Corel Draw 8.0.

## **23 Doble Híbrid**

Amb l'objectiu d'aïllar i caracteritzar proteïnes que interaccionessin amb PHOR1 es van realitzar experiments de doble híbrid a llevat. Per aquests experiments, en primer lloc es va fusionar la regió codificant del gen *PHOR1* al domini d'unió al DNA (DNA-BD) de GAL4, en el plasmid pAS2-1 i es va transformar la soca de llevat MATa PJ69-2A. Per una altra part, es va preparar una llibreria de cDNA de fulles de *S. demissum*, la qual es va inserir com a fusió al domini d'activació (AD) de GAL4, en el vector pGAD424. La llibreria de cDNA es va escindir del fag  $\lambda$ -ZAP (Stratagene), i es va amplificar, pre-transformant amb aquesta llibreria la soca haploïd compatible MAT<sup>-</sup> Y187. Un cop es va comprovar la correcta expressió de la proteïna de fusió PHOR1::GAL4BD a la soca PJ69-2A, es va procedir a la conjugació d'aquesta soca amb la soca compatible pre-transformada amb la llibreria de cDNA, obtenint diplòids que contenen els dos plasmids. Aquests diplòids es van fer créixer en un medi selectiu sense leucina, sense triptofan, sense adenina i sense histidina, per tal de seleccionar aquells diplòids que expressaven una proteïna de la llibreria capaç de interaccionar amb la proteïna PHOR1. Els falsos positius es van descartar fent mitjançant assaig de l'activitat  $\lambda$ -galactosidasa



(lacZ) i co-transformació amb els controls negatius. Els plasmids que en aquests assaigs varen donar els resultats esperats es van portar a seqüenciar.

### 23.1 Soques de llevat i plasmids

Soques de llevat	Genotip	Gens marcadors per a la selecció	Referències
PJ69-2A	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, Ura3-52, his3-200, gal4a, gal80a, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2	His3, Ade2, Trp1, Ura3, Leu2	James <i>et al.</i> , 1994
Y187	MAT , ura3-52, his3-200, Ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4a, gal80a, met <sup>r</sup> , URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	LacZ, Trp1, Leu2	Harper <i>et al.</i> , 1993
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, Ura3-52, his3-200, gal4a, gal80a, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL <sub>TATA</sub> -lacZ.	His3, Ade2, LacZ, Trp1, Ura3, Leu2	

- Les seqüències reguladores GAL1 i GAL2 (UASs) són sensibles al activador de la transcripció GAL4.
- trp1, his3, gal4 i gal80 són totes elles mutacions; leu2-3,112 és una doble mutació.
- El gen ade2-101 ha estat substituït per recombinació en la soca Y187 per tal de poder dur a terme la selecció amb la construcció GAL2-ADE2

Plasmidis	Descripció	Referències
PAS2-1	GAL4(1-47) DNA-BD, TRP1, Amp <sup>r</sup> , CYH <sup>S2C</sup> 8,4 Kb Alts nivell d'expressió de proteïnes.	Modificat per CLONTECH a partir del vector descrit per Harper <i>et al.</i> (1993)

---

PGAD424	GAL4 (768-881) AD, LEU2, Amp <sup>r</sup> , 6,659 Kb Baixos nivells d'expressió de proteïnes.	Bartel <i>et al.</i> (1993) Chien <i>et al.</i> (1991).
---------	--	--

---

### 23.2 Transformació de llevats

La soca de llevat PJ69-2A va ser transformada amb el plasmid pAS2-1 on s'havia inserit la regió codificant del gen *PHOR1*, ó els diferents dominis: *CPI* (10-270) i *ArmR* (posicions 509-1192), en fase al domini d'unió al DNA (BD) de GAL4. El protocol de transformació va ser el descrit al MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manual de CLONTECH (protocol PT3061-1, versió PR82033). Les cèl·lules transformades es seleccionaren en un medi selectiu SD sense triptòfan.

La soca de llevat Y187 es va transformar amb la llibreria de cDNAs de fulles de *S. demissum* fusionada al domini activador de la transcripció de GAL4, en el plasmid pGAD424. La llibreria pre-transformada es va plaquejar en un medi selectiu SD sense leucina, fent un nombre de transformacions suficients per a obtenir  $1 \times 10^6$  cèl·lules transformades independents. Les cèl·lules transformades es van recollir de les plaques amb medi SD líquid sense leucina, es van concentrar per centrifugació i es van dissoldre en el volum apropiat de medi SD menys leucina, al·liquotant-les i guardant-les a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es va descongelar una de les al·liqüotes en gel i es va determinar el seu títol. El títol de la llibreria pre-transformada fora de  $2 \times 10^8$  cfu/ml.

La soca diplòid PJ69-2A/Y187 es va obtenir per conjugació entre les soques PJ69-2A i Y187 i selecció en un medi SD sense uracil i sense metionina. Aquesta soca diplòid i la soca haploïd AH109 es van co-transformar amb els plasmidis pAS2-1/*Phor1*, pAS2-1/*CPI* i pAS2-1/*ArmR* i el clons positius obtinguts de la llibreria, per tal de comprovar la especificitat de la interacció detectada. La co-transformació es va plaquejar en un medi selectiu SD sense triptòfan i sense leucina, en el que només creixen les cèl·lules transformades amb tots dos plasmidis.

#### Procediment:

1. Preparar un cultiu de les soques de llevat, inoculant varies colònies d'un cultiu en placa (fer servir plaques fresques i picar colònies que facin de 2-3 mm de diàmetre) en 50 ml\* o 150 ml\*\* de medi YPD-A. Barrejar be amb el vòrtex per dispersar les cèl·lules.
2. Incubar a 30°C i en agitació a 250 rpm. durant tota la nit, fins que el cultiu arribi a la fase estacionària ( $DO_{600} > 1,5$ ).
3. Diluir el cultiu saturat en un volum final de 300 ml\* o 1 L\*\* de medi YPD-A fresc de manera que la  $DO_{600}$  final del cultiu sigui de 0,2-0,3.
4. Incubar a 30°C durant 3 hores en agitació a 250 rpm. fins que el cultiu arribi a una  $DO_{600} = 0,5$  (creixement en fase exponencial).
5. Centrifugar a 2000 rpm. durant 5 minuts a temperatura ambient.
6. Descartar el sobrenedant i rentar les cèl·lules amb 25-50 ml\* o 500 ml\*\* d'aigua estèril o TE1X. Barrejar be amb el vòrtex.
7. Centrifugar de nou a 2000 rpm. durant 5 minuts a temperatura ambient.
8. Descartar el sobrenedant.
9. Resuspendre les cèl·lules amb 1,5 ml\* ó 8 ml\*\* de 1XTE/LiAc
10. Afegir en un tub la barreja: 0,1 mg\* o 20 mg\*\* de DNA "carrier" (10 mg/ml de DNA d'esperma de salmó sonicat i bullit durant 20 minuts per desnaturalitzar) i el DNA plasmídic\*\*\* a transformar.
11. Afegir 100  $\mu$ l\* ó 8 ml\*\* de cèl·lules de llevat competents (pas 9) ben barrejades amb el vòrtex.
12. Afegir 600  $\mu$ l\* o 60 ml\*\* de PEG/LiAc.
13. Barrejar amb el vòrtex durant 2 minuts e incubar a 30°C durant 30 minuts, en agitació a 200 rpm..
14. Afegir 70  $\mu$ l\* o 7 ml\*\* de DMSO, barrejant be per inversió.
15. Incubar a 42°C durant 15 minuts.
16. Incubar en gel durant 1-2 minuts.
17. Centrifugar les cèl·lules a 14000 rpm. durant 5 segons a temperatura ambient.
18. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules amb 0,5 ml\* o 10 ml\*\* de 1XTE.
19. Plaquejar en plaques de medi selectiu SD adequades per a la selecció de la transformació.

\*En el cas de transformació amb 1 ó 2 plasmidis.

\*\*En el cas de la transformació amb la llibreria.

\*\*\*Per la transformació amb DNA plasmídic fer servir 0,1 µg de plasmid. Per la transformació de la llibreria fer servir 0,1-0,2 mg de la llibreria en pGAD424.

- Medi YPD-A: 20 g/L peptona de Difco, 10 g/L extracte de llevat, 20g/L Agar (per plaques, medi sòlid). Afegir 950 ml d'aigua i ajustar el pH a 5,8, autoclavar i un cop el medi s'hagi refredat afegir 2% glucosa (50ml de glucosa 40%) i adenina.
- Medi SD: 6,7 g/L Yeast nitrogen base sense Uracil, Adenina, i els aminoàcids Metionina,, Triptòfan, Leucina i Histidina, i 20 g/L d'agar (només per plaques, medi sòlid). Afegir 850 ml d'aigua i ajustar el pH a 5,8. Autoclavar i un cop el medi s'hagi refredat (55°C) afegir 2% glucosa i Uracil, Adenina ó els aminoàcids que calguin (Uracil, L-Triptòfan, L-Metionina, Adenina i L-Histidina s'afegeixen a 200 mg/L i L-leucina a 100 mg/L)
- Solució 1XTE/LiAc: 1ml 10XTE, 1ml 10XLiAc i 8 ml d'H<sub>2</sub>O.
- Solució PEG/LiAc: 1ml 10XTE, 1ml 10XLiAc i 8 ml 40 % PEG 3350.
- 40% PEG 3350: Polietilenglicol 3,350; Sigma #P-3640. Preparar amb aigua desionitzada i estèril. Si és necessari, escalfar a 50°C perquè es dissolgui. Filtrar.
- 100% DMSO: Dimetil sulfòxid; Sigma #D-8779.
- 10XTE: 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH7,5. Autoclavar.
- 10XLiAc: 1 M Acetat de liti; Sigma ·L-6883, ajustar el pH a 7,5 amb acid acètic dil.luit i autoclavar.

### 23.3 Preparació d'extractes proteics de llevat

Per comprovar la correcta expressió de les proteïnes PHOR1 i els diferents dominis CPI i ARM fusionats al domini d'unió al DNA (BD) de GAL4 en les soques PJ69-2A i AH109, es va preparar extractes proteics de les soques transformades amb les construccions pAS2-1/*Phor1*, pAS2-1/*CPI* i pAS2-1/*ArmR*, segons el mètode urea/SDS seguint les indicacions del Yeast protocol Handbook de CLONTECH (protocol PT3024-1, versió PR7X265).

1. Fer créixer les soques PJ69-2A i AH109 transformades amb les construccions pAS2-1/*Phor1*, *CPI* o *ArmR* en 5 ml de medi selectiu líquid SD-T a 30°C durant tota la nit. Fer créixer les soques sense transformar en 10 ml de medi YPD-A.
2. Transferir 5 ml del pre-cultiu a 50 ml de medi YPD fresc.
3. Incubar a 30°C i 250 rpm. durant 2-3 hores fins a una DO<sub>600</sub> = 0,4-0,6.

4. Centrifugar el cultiu a 14000 rpm. durant 5 minuts a 4°C.
5. Descartar el sobrenedant i afegir 50 ml d'H<sub>2</sub>O freda (guardar durant uns minuts a -20°C).
6. Centrifugar a 14000 rpm. durant 5 minuts a 4°C.
7. Congelar les cèl·lules en nitrogen líquid (es pot guardar a -80°C).
8. Afegir 100 µl de Cracking buffer per cada 10-15 ml de cultiu.
9. Incubar a 60°C durant 2 minuts.
10. Afegir 80 µl de esferes de vidre (425-600 µm Glass Beads; Sigma #G-772) per cada 10-15 ml de cultiu.
11. Incubar a 70°C durant 10 minuts
12. Barrejar fort en el vòrtex durant 1 minut.
13. Centrifugar a 14000 rpm. durant 5 minuts a 4°C.
14. Recuperar el sobrenedant i guardar-lo en gel.
15. Afegir 50-100 µl de cracking buffer al sediment de cèl·lules.
16. Incubar a 100°C durant 3-5 minuts.
17. Barrejar al vòrtex durant 1 minut.
18. Centrifugar a 14000 rpm. durant 5 minuts a 4°C.
19. Recuperar el sobrenedant i barrejar-lo amb l'anterior.

20-40 µl dels extractes proteics de llevat es van carregar en un gel de proteïnes SDS-PAGE al 12,5% i es va transferir a una membrana de niló. L'anàlisi de la proteïna es va fer per *western* utilitzant una dilució 1/2000 de l'anticòs monoclonal de ratolí contra el domini d'unió al DNA de GAL4 (IgG<sub>2a</sub> GAL4-BD; RK5C1 mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology) a 0,2 mg/ml.

- Cracking buffer: 8M Urea 5% w/v SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml de blau de bromfenol. Afegir 10 µl β-mercaptoetanol/ml de Cracking buffer, inhibidor de proteases i 50 µl/1ml 100 mM PMSF (0,1742 g PMSF/10 ml isopropanol).

### 23.4 Conjugació ó “mating”

La conjugació de soques de llevat de diferent sexe: MATa X MAT es va fer sobre plaques YPD-A. En el nostre cas es va creuar la soca de llevat MATa PJ69-2A

transformada amb la construcció pAS2-1/*Phor1* amb la soca de llevat MAT Y187 pre-transformada amb la llibreria de cDNA de fulles de *S. demissum* en pGAD424-AD. Després de 8 hores de conjugació es recolliren les cèl·lules i es va titular el nombre de diplòids, calculant l'eficiència de conjugació. Es va plaquejar  $10 \times 10^6$  cèl·lules diplòids en un medi selectiu SD-L-T-A-H per a seleccionar aquells clons que codifiquen per proteïnes capaces de interaccionar amb la proteïna PHOR1-GAL4BD.

#### Procediment:

1. Posar un pre-cultiu d'una colònia PJ69-2A transformada amb la construcció pAS2-1/*Phor1* en 50ml de medi SD sense Triptòfan a 30°C i 250 rpm. durant tota la nit.
2. Plaquejar 1 ml de la soca MAT Y187 pre-transformada amb la llibreria de cDNA en pGAD424AD (el títol de la llibreria pre-transformada era de  $2 \times 10^8$  cfu/ml). Diluir-la abans amb 4 ml de YPD-A i plaquejar 1 ml sobre 5 plaques grans.
3. Incubar a 30°C durant 1:30-2 hores.
4. Verificar la  $DO_{600}$  del pre-cultiu (ha de ser  $> 0,8 DO_{600}$  i  $< 1,5 DO_{600}$ ). Centrifugar a 2000 rpm. durant 5 minuts a temperatura ambient i resuspendre les cèl·lules en un volum final de 5 ml.
5. Després de les 2 hores, plaquejar sobre la llibreria X ml de pre-cultiu corresponent a 4 cops la  $DO_{600}$  de la llibreria plaquejada ( $1U DO_{600}=10^7$  cfu).
6. Incubar a 30°C durant 4-8 hores.
7. Recollir les cèl·lules de les plaques amb 5 ml de YPDA líquid+50 µg/ml kanamicina /placa i rentar 4 cops amb 5ml addicionals.
8. Centrifugar les cèl·lules a 2000 rpm a 4°C. Descartar el medi i dissoldre el sediment de cèl·lules en 40 ml de medi SD-L-T-A-H.
9. Fer dilucions (de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) i plaquejar 100 µl de les dilucions en medi SD-L, medi SD-T, i medi SD-L-T, per tal de calcular l'eficiència de la conjugació.
10. Un cop determinat el nombre de diplòids, plaquejar  $10 \times 10^6$  cfu sobre 10 plaques grans amb medi SD-L-T-A-H. Només creixeran aquelles soques de llevat diplòids transformades amb clons de cDNA que codifiquen per proteïnes capaces de interaccionar amb la proteïna PHOR1 fusionada al BD de GAL4.

A les plaques SD-T creixen totes les cèl·lules portadores del plasmid pAS2-1/*Phor1*. El nombre d'aquestes cèl·lules ha de ser 4 cops més elevat que el de les cèl·lules que

creixen en el medi SD-L (cèl·lules portadores del plasmid pGAD424-AD/libreria). Al medi SD-L-T creixen els diploïds, portadors d'ambdós plasmidis.

Càlcul de l'eficiència de conjugació:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de colònies/ml crescudes al medi SD-L-T}}{\text{n}^\circ \text{ de colònies/ml crescudes al medi SD-L}} \times 100 = \% \text{ eficiència de conjugació}$$

$\text{n}^\circ \text{ de colònies/ml} = \text{n}^\circ \text{ de colònies crescudes a la placa} \times \text{pel factor de dilució/0,1 ml plaquejats}$

- YPD-A: Medi YPD més 200 mg/L Adenina.
- SD-T-L-A-H: Medi SD sense triptòfan, sense leucina, sense adenina i sense histidina.

### 23.5 Aïllament del DNA plasmídic de llevat

Per a l'aïllament del DNA plasmídic pGAD-AD/cDNA de les cèl·lules diploïds resultants de la conjugació que creixien en medi SD-L-T-A-H i donaven coloració blava en l'assaig  $\alpha$ -galactosidasa sobre placa, es va procedir en primer lloc a "curar-les" del plasmid pAS2-1*Phor1*, fent-les créixer en medi SD-L.

#### **Enriquiment en el plasmid pGAD424-AD:**

Aquest és el mètode més llarg però més segur per aïllar el DNA plasmídic desitjat a partir de soques de llevat que contenen una barreja de dos plasmidis. En créixer les cèl·lules amb només una de les seleccions, el plasmid no seleccionat disminueix en un 10-20%/ generació.

1. Fer créixer 1 colònia que conté la barreja dels dos plasmidis en 3 ml de medi SD-L a 30°C i 250 rpm. durant 24h.
2. Diluir el cultiu anterior 1/100 en 3 ml de medi SD-L, i créixer a 30°C i 250 rpm. durant 24h.
3. Repetir el pas 2 durant dos cops més.

4. Plaquejar 100 µl d'una dilució  $10^{-2}$  del darrer cultiu en medi SD-L i incubar a 30°C fins que apareguin les colònies (2-3 dies).
5. Comprovar que aquestes colònies ja no creixen en medi SD-T.

**Extracció del DNA plasmídic de soques de llevat que han segregat el plasmid d'interès:**

1. Fer créixer una colònia en medi SD-L líquid a 30°C i 250 rpm. durant tota la nit.
2. Centrifugar 500 µl del cultiu a 14,000 rpm. durant 5 minuts
3. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment de cèl·lules en 50 µl de medi SD-L o aigua.
4. Afegir 10 µl de solució de liticasa (5 unitats/µl en 1XTE buffer) i barrejar amb el vòrtex.
5. Incubar a 37°C durant una hora.
6. Afegir 10 µl de 20% SDS i barrejar amb el vòrtex durant 1 minut.
7. Congelar a -20°C, descongelar novament a temperatura ambient i agitar amb vòrtex, per completar la lisis de les cèl·lules.
8. Repetir el pas anterior 1-2 cops si és necessari.
9. Afegir 200 µl de Tampó TE pH 7.
10. Afegir 200 µl de fenol: cloroform: alcohol isoamílic (25:24:1).
11. Barrejar amb vòrtex durant 1 minut.
12. Centrifugar a 14,000 rpm. durant 10 minuts.
13. Transferir la fase aquosa a un altre tub.
14. Afegir 8 µl de 10 M acetat d'amoni i 500 µl de 100% etanol.
15. Deixar a -70°C durant 1 hora.
16. Centrifugar a 14,000 rpm. durant 10 minuts
17. Rentar el sediment amb 70% etanol.
18. Centrifugar a 14,000 rpm. durant 10 minuts.
19. Resuspendre el pellet en 20 µl d'H<sub>2</sub>O.
20. Transformar la soca d'*E. coli* DH5 amb 1 µl de plasmid (veure 23.4). La transformació es plaquejarà en medi LB+ Ampicilina.



21. L'extracció del DNA plasmídic d'*E. coli* es realitzarà per lisis alcalina d'un cultiu del bacteri transformat amb aquest vector (Veure 23.3). Procedir a la co-transformació del plasmidi recuperat amb els controls corresponents per descartar si és un fals positiu.

En tots els casos els cultius es fan a partir de colònies fresques (de 2-4 dies) de 2-4 mm. La colònia s'agafa amb una nansa estèril es passa a 100-500 µl de TE estèril i s'agita fort al vòrtex fins a disgregar be les cèl.lules.

### **23.6 Assaig $\beta$ -galactosidasa**

Aquest assaig es va portar a terme amb les soques diplòids obtingudes per conjugació que havien crescut en el medi selectiu SD-L-T-A-H. Les soques que donen coloració blanca a l'assaig  $\beta$ -galactosidasa sobre placa, es descarten com a falsos positius. Les que donen coloració blava s'agafen com a possibles positius i es procedeix a l'aïllament del DNA plasmídic pGAD424-AD.

Posteriorment, es fa l'assaig  $\beta$ -galactosidasa en medi líquid, ja que es més sensible i quantitatiu.

#### **Assaig $\beta$ -galactosidasa sobre filtres**

1. Sobre una placa amb medi sòlid SD-L-T-A-H col·locar un filtre estèril (Whatman#5) i repicar a sobre les colònies diplòids obtingudes per conjugació que han crescut en medi SD-L-T-A-H.
2. Incubar a 30°C durant 3 dies.

3. Amb l'ajut d'unes pinces retirar el filtre que conté les colònies del medi i congelar en nitrogen líquid durant 10 segons.
4. Descongelar a temperatura ambient durant 10 segons i repetir els passos 3 i 4 tres o quatre cops més.
5. Preparar el Tampó Z/X-gal i afegir 2,5 ml a una placa estèril de 150 mm on s'ha col·locat un retall de paper de filtre rodó. Descartar el líquid no absorbit pel paper de filtre.
6. Col·locar el filtre Whatman un cop s'ha congelat i descongelat 4-5 cops sobre el paper de filtre amb el tampó Z/X-gal.
7. Incubar a 30°C de 30 segons a 8 hores, observant periodicament per veure quines colònies adquireixen abans coloració blava.

- Tampó Z: 16.6g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,5 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,75 g/L KCl, 0,246 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el pH a 7 i autoclavar. Guardar a temperatura ambient.
- Tampó Z/Xgal: 100 ml Tampó Z, 0,27 ml -mercaptoetanol ( -ME; Sigma #M-6250), 1,67 ml solució X-gal.
- Solució X-gal: Disoldre 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosid (X-GAL; # 8060-1) en N,N-dimetilformamida (DMF) a una concentració de 20 mg/ml. Guardar a -20°C.

### **Assaig $\beta$ -galactosidasa líquid**

1. Inocular les colònies en 5 ml del cultiu líquid selectiu SD adequat e incubar a 30°C i 250 rpm. durant tota la nit.
2. Transferir 2 ml del pre-cultiu de la nit a 8 ml de medi YPD.
3. Incubar a 30°C durant 3-5 hores a 250 rpm. fins a que les cèl·lules estiguin en la fase exponencial ( $\text{DO}_{600} = 0,5-0,8$ ).
4. Disoldre 4 mg/ml d'ONPG en Tampó Z i mantenir en agitació durant 1-2 hores.
5. Agitar amb el vòrtex el cultiu un cop arribi a la fase exponencial per dispersar be les cèl·lules, i passar 1,5 ml de cultiu a tres eppendorf.
6. Centrifugar a 14,000 rpm. durant 30 segons a temperatura ambient.
7. Descartar el sobrenedant i afegir al sediment de cèl·lules 1,5 ml de tampó Z. Barrejar amb el vòrtex fins a resuspendre les cèl·lules.
8. Centrifugar a 14,000 rpm. durant 30 segons.

## MATERIALS I MÈTODES

---

9. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 300 µl de tampó Z (el factor de concentració serà 1,5/0,3= 5).
10. Transferir 100 µl de la suspensió de cèl·lules a un nou eppendorf.
11. Congelar les cèl·lules en nitrogen líquid durant 1 minut.
12. Descongelar a 37°C durant 1 minut.
13. Repetir els passos 11 i 12 tres o 4 cops més barrejant amb el vòrtex entre mig per trencar be les cèl·lules.
14. Preparar dos tubs amb 100 µl de tampó Z (Blancs).
15. Afegir 700 µl de Tampó Z + -mercaptoetanol, a les reaccions i als blancs.
16. Immediatament després afegir 160 µl d'ONPG a les reaccions i els blancs.
17. Incubar a 30°C de 30 segons a 8 hores.
18. Un cop es tornen groges, les reaccions s'aturen afegint 400 µl d'1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a les reaccions i als blancs.
19. Centrifugar les reaccions a 14,000 rpm. durant 10 minuts, per precipitar les restes cel·lulars.
20. Transferir el sobrenedant a les cubetes de l'espectrofotòmetre.
21. Calibrar l'espectrofotòmetre amb els blancs i llegir les reaccions a DO<sub>420</sub>. Les DOs han d'estar entre 0,02-1.

Unitats -galactosidasa (1 unitat de -galactosidasa es defineix com la quantitat d'enzim capaç d'hidrolitzar 1 µmol de *0-nitrofenol β-D-galactopiranosid* per minut i per cèl·lula (Miller,1972; Miller,1992)):

$$1000 \times OD_{420}$$

---

(temps d'incubació X (0,1 ml X factor de concentració= 5) X DO<sub>600</sub> d'1 ml del cultiu)

- Tampó Z+ -mercaptoetanol: 100ml Tampó Z i 270 µl -mercaptoetanol.
- ONPG: 4 mg *0-nitrofenil βD-galactopiranosida*/ml en tampó Z, ajustar el pH a 7 i deixar dissoldre 1-2 hores a temperatura ambient. Cal preparar-ho fresc cada cop que es vol fer la reacció.

## 24 PULL-DOWN

Aquest és un mètode *in vitro* per demostrar les interaccions proteïna-proteïna. En el nostre cas es va utilitzar per confirmar la interacció de la proteïna PHOR1 ó els seus dominis CPI i ArmR amb les proteïnes codificades pels clons identificats en els experiments de doble híbrid. El mètode consisteix en expressar i purificar les dues proteïnes per separat, retenir una de les proteïnes sobre una columna d'afinitat que farà de suport, i fer passar l'altre per la columna, de manera que només si existeix interacció entre ambdues proteïnes la segona quedarà retinguda a la columna. Per una banda es van expressar a *E. coli* les proteïnes identificades com a proteïnes de fusió a la GST, i aquestes es van passar sense eluir-les per una columna de glutatió-*Sepharose* (Pharmacia) (Veure 8.3 ), de manera que la proteïna quedava retinguda a la columna. Per un altre banda es van sintetitzar la proteïna PHOR1 i els dominis CPI i ArmR per transcripció-traducció *in vitro* en el sistema TNT (Veure 14). A partir d'aquí el procediment va ser el següent.

1. En un tub de 0,5 ml afegir 1-5 µg de la proteïna de fusió immobilitzada a la columna glutatió-*Sepharose* (Pharmacia) i afegir reina lliure fins a un volum final de 90 µl.
2. Deixar sedimentar la reina en gel i descartar el sobrenedant.
3. Afegir 180 µl de tampó d'unió.
4. Incubar durant 1 hora a 4°C amb rotació suau.
5. Deixar sedimentar la reina en gel i descartar el sobrenedant.
6. Afegir la transcripció-traducció *in vitro* (TNT) marcada radioactivament (Veure 14).
7. Incubar a 4°C durant tota la nit amb rotació suau.
8. Traspasar a un tub d'1,5 ml i deixar sedimentar en gel.
9. Retirar el sobrenedant i rentar amb 1ml de Tampó Ripa.
10. Barrejar be i després deixar sedimentar en gel.
11. Retirar el sobrenedant. És important treure be tot el sobrenedant.
12. Repetir els pasos 9-11 de quatre a 8 cops.
13. Afegir 20 µl 1XTM+ -mercaptoetanol i escalfar a 95°C durant 5 minuts.
14. Carregar tot en un gel de proteïnes SDS-PAGE.
15. Tenyir el gel de proteïnes amb blau de Coomassie i destenyir amb metanol:acètic (30%:70% v/v). Això és necessari per comprovar que tots els carrils estan carregats

amb la mateixa concentració de proteïna fusionada a la GST, per tal de comparar els resultats de la interacció.

16. Assecar el gel de proteïnes al buit amb calor durant 1 hora.

17. Exposar el gel assecat a una pel·lícula d'autoradiografia dins d'un cassette. Guardar a temperatura ambient. El temps d'exposició depèn del senyal de marcatge en la reacció TNT.

- Tampó d'unió: 20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0,2 % Nonidet P40, 100 µM PMSF.
- Tampó Ripa: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 % Nonidet P40.