

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA  
BIENNI 2001-2003

***Producció d'un inhibidor del VIH-1  
en plantes de tabac i d'arròs***

Memòria presentada per Marc Castellet Llerena per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

el director de tesi

l'autor

el tutor

M<sup>a</sup>Dolors Ludevid Múgica

Marc Castellet Llerena

Albert Ferrer Prats

Barcelona, Juny de 2006

## ***Capítol I***



*En aquest capítol es descriuen els resultats obtinguts en l'expressió constitutiva en plantes de tabac del fàrmac T-20 fusionat a diferents seqüències de  $\gamma$ -zeïna. S'analitza la capacitat d'acumulació de les diferents proteïnes de fusió així com la seva estabilitat en teixit vegetatiu. Mitjançant experiments de fraccionament subcel·lular i immunolocalització es determina el compartiment cel·lular on s'acumulen aquestes proteïnes. D'altra banda, es desenvolupa un sistema de purificació de T-20 a partir de fulles de tabac que permet, finalment, avaluar l'activitat del T-20 produït en plantes.*



## CAPÍTOL I:

**PRODUCCIÓ DE T-20 EN PLANTES DE TABAC****1. Acumulació de T-20 en fulles de tabac mitjançant fusió amb dominis de  $\gamma$ -zeïna**

Per tal que un sistema d'expressió en plantes pugui representar una alternativa per a la producció d'una proteïna terapèutica, és necessari assolir nivells alts d'acumulació d'aquesta proteïna en el teixit vegetal. És per aquest motiu que s'ha plantejat l'estratègia de fusionar el fàrmac T-20 a diferents seqüències de  $\gamma$ -zeïna per a la seva expressió en plantes de tabac; d'aquesta manera es pretén provocar una retenció de les proteïnes de fusió al RE augmentant la seva estabilitat i, consegüentment, el seu grau d'acumulació.

En aquest apartat s'estudia la capacitat d'acumulació de les diferents proteïnes de fusió sense aprofundir en la seva localització subcel·lular. Primer de tot, i amb l'objectiu de facilitar la comprensió dels resultats, es detalla l'estructura de les proteïnes de fusió expressades en tabac. A continuació, és descriu l'obtenció de línies transgèniques que expressin les quatre proteïnes de fusió. La capacitat d'acumulació de les diferents fusions s'analitza tant en aquestes línies estables com en plantes transformades de forma transitòria. Per últim, s'avalua l'estabilitat de la proteïna de fusió en un procés de dessecació de la fulla de tabac.

**1.1. Disseny de les proteïnes de fusió****1.1.1. Optimització de codons de la seqüència del T-20**

Degut a que el T-20 correspon a una petita regió (108 nucleòtids) de la glicoproteïna gp41 del VIH-1, es va pensar que la millor opció per obtenir la seva seqüència de DNA era per síntesi d'oligonucleòtids. Tot i ser una seqüència relativament curta, es va creure convenient optimitzar la composició dels seus codons per a l'expressió en plantes. Adaptant la seqüència de DNA de la proteïna recombinant al model d'utilització de codons de l'espècie en què es vol expressar, es pot incrementar la taxa de traducció i augmentar el nivell d'acumulació de proteïna (Rouwendal i col., 1997).

En espècies vegetals existeixen certes diferències en la utilització de codons entre monocotiledònees i dicotiledònees, presentant les primeres una proporció més

alta de guanina i citosina en la tercera base dels seus codons (Wada i col., 1992). Com que en aquest treball es vol expressar el fàrmac T-20 tant en plantes de tabac com d'arròs, s'ha utilitzat un compromís entre el model d'utilització de codons d'aquestes dues espècies per a dissenyar la seqüència codificant del T-20. En la figura 16 podem veure les diferències entre la seqüència del T-20 dissenyada per a l'expressió en plantes i la que s'obtidria si l'adequessim a l'expressió en cèl·lules humanes. Les seqüències resultants, dissenyades utilitzant l'aplicació informàtica *Backtranslation* (Entelechon), presenten una divergència a nivell de nucleòtids del 26%.

aa	Y	T	S	L	I	H	S	L	I	E	E	S	Q	N	Q	Q	E
pDNA	TAC	ACA	TCA	CTG	ATC	CAC	TCT	TTA	ATT	GAA	GAA	TCC	CAG	AAC	CAA	CAG	GAG
hDNA	TAT	ACT	TCC	CTT	ATT	CAT	TCA	CTG	ATC	GAA	GAG	TCT	CAG	AAC	CAA	CAA	GAG

K	N	E	Q	E	L	L	E	L	D	K	W	A	S	L	W	N	W	F
AAA	AAC	GAA	CAG	GAG	CTT	CTG	GAG	TTG	GAC	AAG	TGG	GCA	AGC	CTC	TGG	AAT	TGG	TTC
AAG	AAT	GAG	CAA	GAA	CTC	CTT	GAG	CTG	GAC	AAG	TGG	GCT	TCT	TTG	TGG	AAC	TGG	TTC

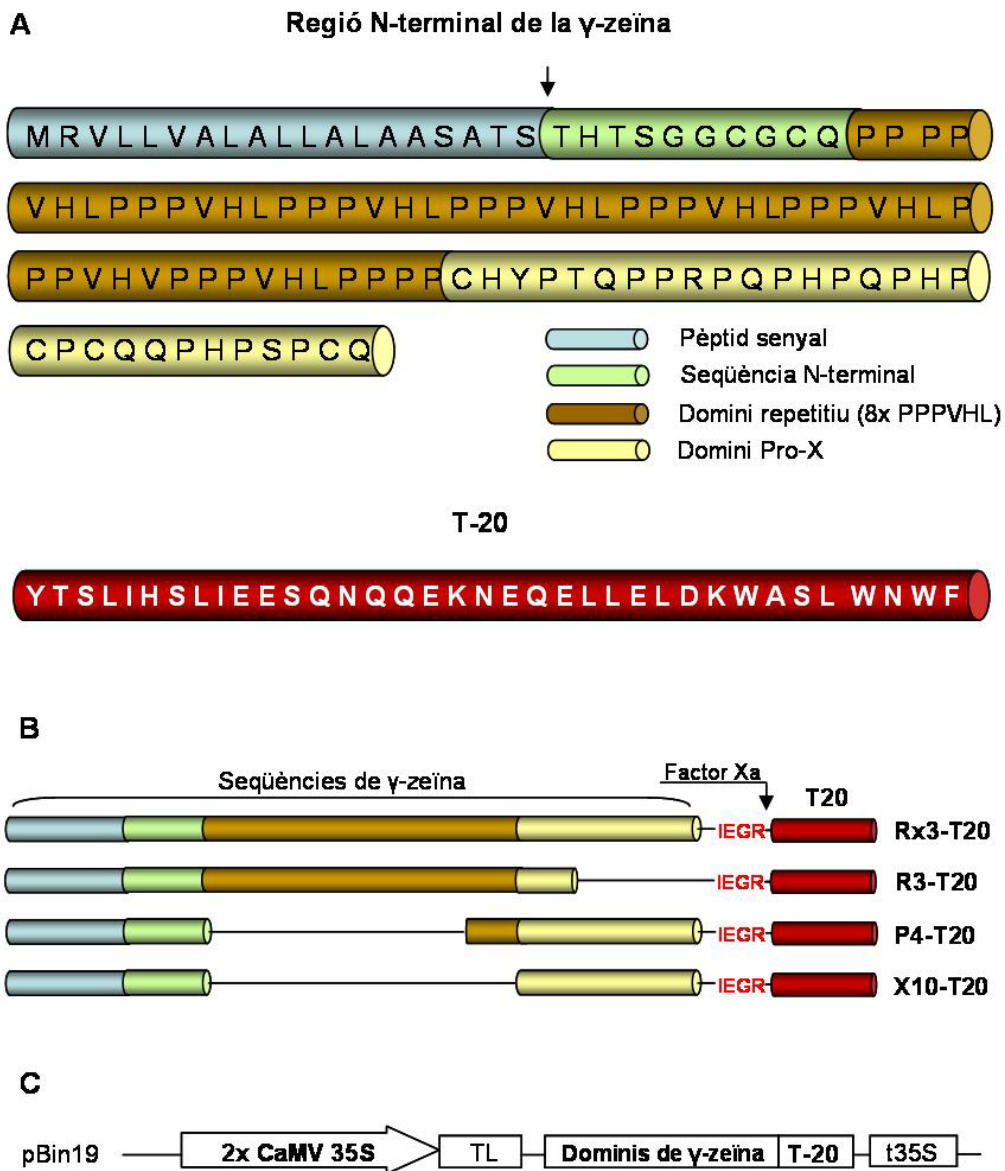
**Figura 16. Optimització de codons de la seqüència del T-20.** Seqüències de DNA obtingudes fent servir el model d'utilització de codons de plantes (pDNA) i d'humans (hDNA) a partir de la seva seqüència aminoacídica (aa).

Les seqüències de DNA de  $\gamma$ -zeïna utilitzades per a la construcció de les diferents fusions provenen del clonatge del cDNA de la  $\gamma$ -zeïna de blat de moro (Prat i col., 1985). Per tant, hem considerat que la composició dels codons seria adequada per a la seva expressió heteròloga en plantes. Tot i així, si s'adaptessin al model d'utilització de codons de tabac, segurament es podria incrementar la taxa de traducció de les proteïnes de fusió en aquesta espècie.

### 1.1.2. Dominis de $\gamma$ -zeïna fusionats a T-20

L'estratègia emprada per acumular T-20 en plantes consisteix en la fusió del fàrmac a diferents seqüències de  $\gamma$ -zeïna per provocar la seva retenció en el RE i obtenir alts nivells d'acumulació de les proteïnes recombinants. Com s'ha descrit anteriorment, la capacitat de retenció al RE ve determinada per la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna, la qual engloba diversos dominis rics en prolina (Geli i col, 1994).

Per tal de determinar quina seqüència de  $\gamma$ -zeïna confereix una major acumulació de T-20, s'han dissenyat quatre proteïnes de fusió que contenen diferents dominis N-terminals de  $\gamma$ -zeïna fusionats al fàrmac T-20 (Fig. 17 A i B). Totes quatre fusions contenen el pèptid senyal de la  $\gamma$ -zeïna per a direccionar la proteïna cap al RE i una seqüència N-terminal curta. La proteïna de fusió Rx3-T20 conté la regió N-terminal



**Figura 17. Estructura de les proteïnes de fusió expressades en plantes de tabac.**

(A) Seqüències aminoacídiques de la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna i del T-20. La fletxa indica el punt de tall teòric del pèptid senyal de direccionalment a reticle.

(B) Esquema del dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna fusionats al T-20. En vermell s'indica la diana de digestió per a la proteasa Factor Xa introduïda per poder alliberar el T-20 en el procés de purificació.

(C) Construcció plasmídica utilitzada per a l'expressió constitutiva de les proteïnes de fusió en plantes de tabac.

sencera, incloent un domini repetitiu, format per vuit repeticions de la seqüència PPPVHL, i el domini anomenat Pro-X, que conté l'alternança de prolina amb un altre aminoàcid. En les altres fusions s'han eliminat un o part d'aquest dominis. Així, la fusió R3-T20 conté el domini repetitiu sencer però li manca el domini Pro-X, mentre que en



X10-T20 s'ha conservat el Pro-X però s'ha omès el domini repetitiu. Existeixen indicis que l'agregació i acumulació de la  $\gamma$ -zeïna pot estar fortament influenciada per l'estructura del domini repetitiu (Kogan i col., 2001). Per determinar si una sola repetició dels aminoàcids PPPVHL pot influenciar en la capacitat d'acumulació al RE de la proteïna de fusió, s'ha dissenyat la fusió P4-T20 que conté el domini Pro-X amb una única unitat de repetició de la seqüència PPPVHL.

Les estratègies d'acumulació basades en l'expressió de proteïnes de fusió impliquen la necessitat d'incorporar un lloc de processament per tal d'alliberar la proteïna d'interès i poder purificar-la. En aquest cas s'ha optat per la incorporació d'una diana de proteasa (IEGR) que ens permetrà tallar la proteïna de fusió mitjançant l'endoproteasa Factor Xa. D'aquesta manera es podrà obtenir T-20 pur per a avaluar la seva activitat. S'ha escollit aquesta proteasa per que la seva diana de tall no és present ni en la seqüència del T-20 ni en la seqüència dels dominis de  $\gamma$ -zeïna fusionats. A més, el Factor Xa talla en l'extrem C-terminal de la diana que reconeix pel que no s'afegeix cap residu aminoacídic a la T-20, fet que podria afectar a la seva activitat biològica.

Les seqüències codificants per a les quatre proteïnes de fusió van ser clonades en un cassette d'expressió format pel promotor constitutiu 2xCaMV35S, la regió 5' no codificant del virus del gravat del tabac (TL) i el terminador 35S, per a la seva expressió constitutiva en plantes de tabac (Fig. 17C). Els vectors binaris d'expressió es van anomenar pBRx3-T20, pBR3-T20, pBP4-T20 i pBX10-T20.

## 1.2. Obtenció i cribratge de línies transgèniques de tabac

La generació de línies transgèniques estables és un requisit indispensable per al desenvolupament d'un sistema de producció de proteïnes recombinants en plantes transformades. Aquest procés inclou la transformació estable via *Agrobacterium*, el cribratge i selecció de plantes  $F_0$  amb nivells alts d'acumulació de proteïna recombinant i, finalment, l'obtenció de línies estables on el transgèn estigui en homozigosi.

Per a la transformació estable de tabac es van infectar discs de fulla amb *Agrobacterium tumefaciens* que contenien els plasmidis pBRx3-T20, pBR3-T20, pBP4-T20 i pBX10-T20. Després de seleccionar amb kanamicina les cèl·lules transformades es van regenerar entre 20 i 30 línies transgèniques per a cada fenomen de transformació. Els diferents grups de línies es van anomenar segons la proteïna de fusió que expressaven: Rxt3 per a l'expressió de la fusió Rx3-T20, Rt3 per a la fusió Rx3-T20, Pt4 per a P4-T20 i Xt10 per a X10-T20. Cap d'aquestes línies presentava fenotip atesa l'expressió de les proteïnes recombinants.

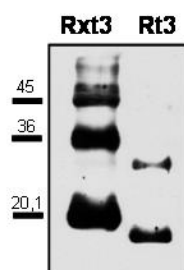
Les plantes  $F_0$  crescudes en condicions *in vitro* es van analitzar per *Western Blot* utilitzant anticossos policlonals contra T-20 ( $\alpha$ T20) i contra la  $\gamma$ -zeïna purificada de

blat de moro ( $\alpha$ G2; Ludevid i col., 1985). En totes quatre transformacions es van detectar línies que expressaven les diferents proteïnes de fusió (Fig. 19). Les fusions Rx3-T20 i R3-T20 es van detectar tant amb un anticòs contra la  $\gamma$ -zeïna com amb un anticòs contra T20, mentre que en les fusions P4-T20 i X10-T20 només van reaccionar amb l'anticòs contra T-20. Aquest fet es deu a la manca d'epítops de les seqüències de  $\gamma$ -zeïna presents en les proteïnes P4-T20 i X10-T20. El pesos moleculars experimentals de les diferents proteïnes de fusió resoltes en gels SDS-PAGE van resultar ser aproximadament uns 2 Kd superiors als teòrics (Taula 2), desviació que també es produeix en la immunodetecció de la  $\gamma$ -zeïna de blat de moro.

Proteïnes de fusió	PM experimental	PM teòrics
Rx3-T20	17	15,1
R3-T20	14,5	12,8
P4-T20	12,5	10,7
X10-T20	11,5	9,5

**Taula 2. Pesos moleculars experimentals i teòrics de les proteïnes de fusió. Valors expressats en kD.**

Una característica especial en el patró d'anàlisi per electroforesi i *Western Blot* de les proteïnes de fusió Rx3-T20 i R3-T20 és la presència de bandes d'alt pes molecular. Aquestes bandes corresponen a oligòmers de la proteïna de fusió (Fig. 18) que no han estat dissociats tot i el SDS i les condicions reductores emprades.

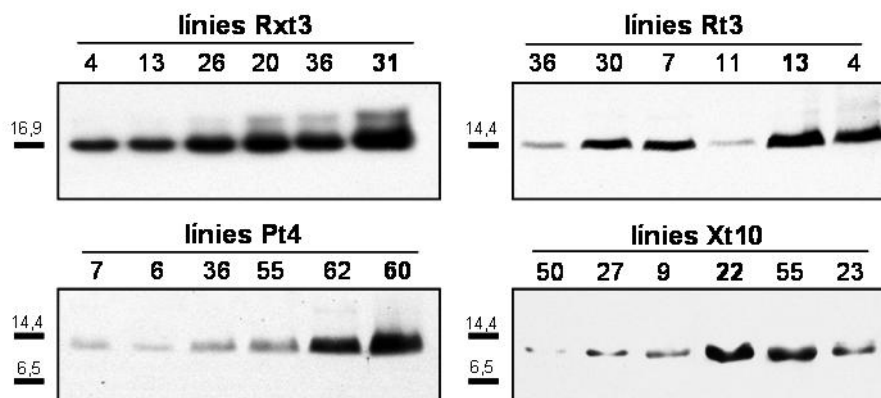


**Figura 18. Detecció d'oligòmers de proteïna Rx3-T20 i R3-T20 en les línies transgèniques Rxt3 i Rt3 de tabac amb nivells alts d'acumulació. Immunoblot realitzat sobre extractes proteics de fulla amb l'anticòs  $\alpha$ T-20. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.**

### 1.2.1. Cribratge i selecció de línies amb nivells alts d'acumulació de proteïna recombinant

Extractes proteics de totes les línies transgèniques es van analitzar en paral·lel per *Western Blot* per tal d'escollir les línies amb majors nivells d'acumulació de cada proteïna de fusió. El cribratge de les línies Rxt3 i Rt3 es va realitzar amb l'anticòs  $\alpha$ G2 ja que proporcionava un millor nivell de detecció, mentre que les línies Pt4 i Xt10 es van analitzar amb l'anticòs  $\alpha$ T20. Tot i que existia una gran variació d'acumulació entre les plantes que expressaven una mateixa proteïna de fusió, es va poder intuir una major acumulació de la proteïna Rx3-T20 respecte a les altres. Aquest resultat es desenvolupa de forma detalla més endavant en aquest capítol.

Per a cadascuna de les proteïnes de fusió expressades es van escollir les sis línies que presentaven els majors nivells d'acumulació. En la figura 19 es mostra la immunodetecció de les línies seleccionades per a cada fenomen de transformació.



**Figura 19. Cribatge de línies transgèniques de tabac.** Línies transgèniques seleccionades per immunoblot. Per a l'anàlisi de les plantes Rxt3 i Rt3 es van utilitzar gels SDS-PAGE i l'anticòs  $\alpha$ G2, mentre que per a les plantes Pt4 i Xt10 es van utilitzar gels de Tris-Tricina i l'anticòs  $\alpha$ T-20. Les línies amb expressió màxima es ressalten en negreta. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

### 1.2.2. Obtenció de línies transgèniques homozigotes

Per tal d'obtenir amb certa facilitat línies transgèniques estables on el transgèn estigués en homozigosi, interessava escollir aquelles en què la integració s'hagués produït en un únic locus. L'obtenció de línies estables amb dos o més transgèns situats en loci diferents pot ser molt laboriosa degut al baix percentatge de plantes filles doble homozigotes que es produeixen al ser autofecundades.

Les plantes  $F_0$  amb nivells més alts d'expressió de proteïna de fusió es van portar a floració i es van autofecundar. Les llavors recollides es van fer germinar en un medi que contenia l'antibiòtic de selecció kanamicina. Fent un recompte de les plàntules resistents i sensibles a l'antibiòtic es pot determinar el nombre de locus d'inserció del transgèn (Taula 2). Una planta  $F_0$  amb un únic lloc d'inserció produirà en la seva descendència una quarta part de plantes sensibles i tres quartes parts de plantes resistents. En les línies que presentaven aquest percentatge es va considerar que la integració s'havia produït en un sol locus i van ser seleccionades per a l'obtenció de la següent generació. Cal remarcar, que el tenir un únic lloc d'integració no vol dir que no puguin presentar dos o més còpies del transgèn integrades en aquest locus.

Com es pot observar a la taula 2, el 80% de les línies presentava una proporció aproximada de plantes filles resistents i sensibles de 3:1, que indica que la integració del transgèn s'havia produït en un locus. En les línies Rxt3.20, Rxt3.40, Rt3.30, Xt10.27 i Xt10.55 el percentatge de plantes sensibles era més baix, signe de que la

integració s'havia produït en dos o més loci. La línia Rxt3.31 presentava una alta proporció de filles sensibles, fet que no s'adequava a cap model de segregació de transgèns. Malgrat això, es va escollir aquesta línia per intentar obtenir plantes homozigotes, atès que presentava els nivells d'acumulació de Rx3-T20 més elevats. Es va suposar que els alts nivells d'expressió de la proteïna recombinant que presentava aquesta línia podien haver condicionat la viabilitat de les plantes. Així, es va escollir una línia de cada grup amb un únic lloc d'integració i que tingués els nivells màxims d'acumulació de proteïna de fusió. Les línies seleccionades van ser Rxt3.31, Rt3.13, Pt4.60, Xt10.22.

Unes 10 plantes  $F_1$  resistents a l'antibiòtic de selecció de cadascuna d'aquestes línies es van dur a floració i es van autofecundar per a l'obtenció de llavors. Per determinar si les plantes  $F_1$  tenien el transgèn en homozigosi o heterozigosi, es van fer germinar les llavors  $F_2$  en medi de selecció. En el cas que totes les plantes filles fossin resistents, volia dir que no s'havia produït segregació del transgèn i que, per tant, la planta mare ja presentava el transgèn en homozigosi. D'aquesta manera es van obtenir línies transgèniques homozigòtiques amb nivells màxims d'expressió de cadascuna de les proteïnes de fusió. Aquestes línies es van utilitzar per a l'anàlisi de l'acumulació, la purificació de T-20 i els estudis de la localització subcel·lular.

Línies transgèniques	Llavors sembrades	% germinació	Filles resistents	Filles sensibles	Monocus
Wt (-Km)	50	100	50	0	-
Wt (+Km)	50	98	0	49	-
Rxt3.4	100	91	70	21	Si
Rxt3.13	100	92	67	25	Si
Rxt3.20	100	90	78	12	No
Rxt3.26	100	90	66	24	Si
Rxt3.31	100	93	58	35	Si?
Rxt3.40	100	93	90	3	No
Rt3.4	100	90	68	22	Si
Rt3.7	100	89	65	24	Si
Rt3.11	50	92	36	10	Si
Rt3.13	100	90	65	25	Si
Rt3.30	100	96	87	9	No
Rt3.36	100	89	66	23	Si
Pt4.6	100	88	67	21	Si
Pt4.7	100	84	64	20	Si
Pt4.36	100	95	72	23	Si
Pt4.55	100	90	69	21	Si
Pt4.60	100	86	74	22	Si
Pt4.62	100	95	74	21	Si
Xt10.9	100	83	64	19	Si
Xt10.22	100	45	33	12	Si
Xt10.23	100	86	63	23	Si
Xt10.27	100	81	67	14	No
Xt10.50	100	91	66	25	Si
Xt10.55	100	91	91	0	No

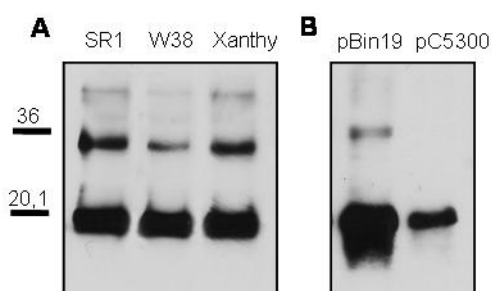
**Taula 3. Segregació del transgen en plantes F1.** Un centenar de llavors de cada línia transgènica es van sembrar en un medi amb l'antibiòtic de selecció kanamicina per visualitzar la segregació del transgèn. En les línies on la relació entre el nombre de filles sensibles i resistents era 3:1 es va considerar que l'inserció del transgen s'havia produït en un sol locus. La línia Rxt3.31 també es va considerar monocus encara que no seguia exactament la proporció descrita. S'ha remarcat en gris les línies seleccionades per a l'obtenció de plantes homocigotes. Com a controls s'han sembrat plantes salvatges (wt) amb presència i absència d'antibiòtic de selecció.

### 1.3. La proteïna de fusió Rx3-T20 proporciona la millor acumulació de T-20 en plantes de tabac, tant en transformació estable com transitòria

Encara que en aquest treball el sistema de producció es basa en l'expressió del fàrmac en línies transgèniques de tabac, es va creure interessant avaluar la capacitat d'acumulació de les fusions en plantes transformades tant de forma estable com transitòria. D'aquesta manera es volia determinar si un sistema d'expressió transitòria podria ser representatiu per a l'estudi comparatiu de nivells d'acumulació de proteïna recombinant. A continuació, descrivim per separat els resultats d'acumulació obtinguts amb aquests dos sistemes.

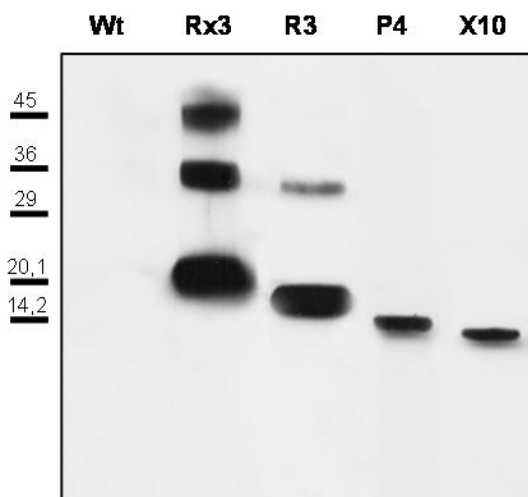
#### 1.3.1. Transformació transitòria de tabac. Acumulació de T-20 fusionat als dominis Rx3, R3, P4 i X10.

Es va escollir l'agroinfiltració de plàntules de tabac com a metodologia de transformació transitòria degut a la seva rapidesa i pragmatisme a nivell de laboratori. Abans d'iniciar l'estudi de l'acumulació de les proteïnes de fusió es van analitzar algunes variables d'aquest sistema, com la utilització de diferents plasmidis binaris (pBin19 i pCambia5300), soques d'*Agrobacterium* (LBA4404 i EHA105) i varietats de tabac (SR1, Wisconsin 38 i Xanthi)(Fig.20). No es van observar diferències significatives comparant per immunoblot els nivells d'expressió de la mateixa proteïna recombinant (Rx3-T20) en les varietats de tabac SR1, Wisconsin 38 i Xanthi. Tampoc es va observar una variació en l'expressió utilitzant la soca d'*Agrobacterium thumefaciens* EHA105, que presenta una alta virulència, respecte a la soca LBA4404 utilitzada en les transformacions estables (no mostrat). Degut a que en l'agroinfiltració l'expressió de la proteïna recombinant es produeix sense que hi hagi integració del T-DNA en el genoma de la planta, es va creure que un vector amb alt nombre de còpia (pCambia5300) podria aportar un major nivell d'expressió que un amb baix nombre de còpia (pBin19). El resultat, encara que és preliminar, ens mostra el contrari, essent el plasmidi pBin19 el que produeix una major acumulació de proteïna recombinant. Així doncs, per expressar les diferents proteïnes de fusió en plantes de tabac agroinfiltrades es va escollir la mateixa combinació de varietat de tabac (Wisconsin 38), plasmidi (pBin19) i soca d'agrobacteri (LBA4404) que la que utilitzaria més endavant en la transformació estable.



**Figura 20. Optimització de l'agroinfiltració.** Anàlisi de l'acumulació de la proteïna Rx3-T20 expressada amb el promotor 35S en plantes agroinfiltrades utilitzant diferents varietats de tabac (A) i plasmids diferents (B). Immunoblot realitzat amb l'anticòs  $\alpha$ T20. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

Després d'optimitzar la metodologia es van utilitzar els plasmidis pBRx3-T20, pBR3-T20, pBP4-T20 i pBX10-T20 per expressar de forma constitutiva les quatre proteïnes de fusió en plàntules de tabac mitjançant agroinfiltració. Quatre dies després de la infiltració es van recollir les plantes i es van analitzar per *Western Blot* utilitzant l'anticòs  $\alpha$ T20. Aquest anticòs permet detectar totes les fusions i comparar els nivells d'acumulació entre elles. Com es pot veure a la figura 21, es va detectar un grau d'acumulació diferent per a cadascuna de les proteïnes de fusió. Per interpretar aquesta figura cal tenir present que, per poder visualitzar totes les proteïnes de fusió, s'ha utilitzat una quantitat de proteïna total soluble diferent en cada cas. Com més petita es la fusió més proteïna total s'ha necessitat per detectar-la. Concretament, en l'anàlisi dels extractes R3-T20 la quantitat de proteïna carregada a l'electroforesi ha estat el doble (20  $\mu$ g) que en Rx3-T20 (10  $\mu$ g). Per a les proteïnes P4-T20 i X10-T20 s'ha utilitzat cinc vegades més proteïna total (50  $\mu$ g) que en els extractes de Rx3-T20. Així doncs, encara que la figura és representativa de les diferències en l'acumulació de les fusions, aquestes són molt més accentuades del que s'aprecia visualment.



**Figura 21. Acumulació de les proteïnes de fusió en plantes de tabac agroinfiltrades.** Les quatre seqüències de  $\gamma$ -zeïna fusionades a T-20 (Rx3, R3, P4, X10) presenten diferent capacitat d'acumulació quan són expressades constitutivament (35S) en plantes de tabac agroinfiltrades. *Western Blot* realitzat sobre gels de Tris-Tricina utilitzant l'anticòs  $\alpha$ T20. Cal remarcar que per poder visualitzar totes les fusions ha estat necessari analitzar diferent quantitat de proteïna total soluble: Rx3-T20 10 $\mu$ g, R3-T20 20 $\mu$ g, P4-T20 i X10-T20 50 $\mu$ g. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

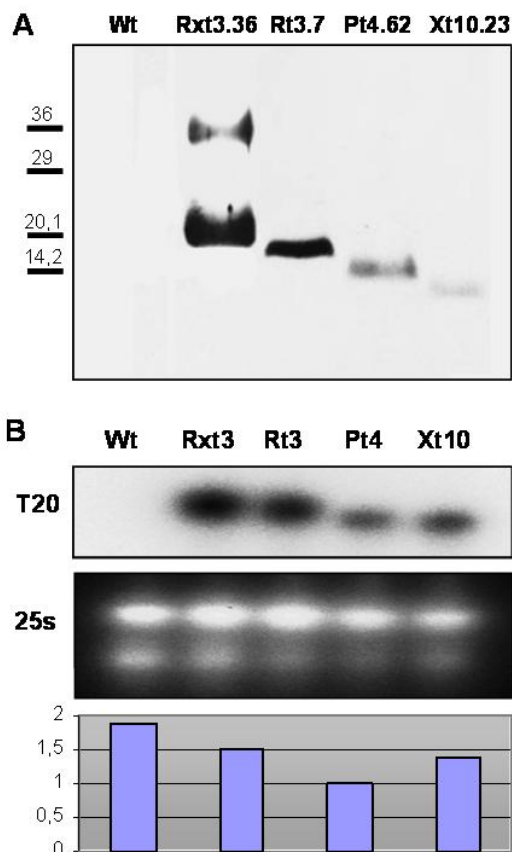
Es pot concloure, per tant, que la fusió Rx3-T20 que conté la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna sencera s'acumula notablement millor que la resta al ser expressada de forma constitutiva en plantes de tabac transformades transitòriament per agroinfiltració. De fet, com més petita és la seqüència de  $\gamma$ -zeïna present en la fusió, menor és el seu grau d'acumulació. Així doncs, l'orde d'acumulació de les fusions mitjançant agroinfiltració de tabac és, de major a menor: Rx3-T20, R3-T20, P4-T20 i X10-T20. Es demostra, per tant, que la fusió al T-20 dels dos dominis (repetitiu i Pro-X) de la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna influencia positivament en la seva acumulació.

### 1.3.2. Transformació estable de tabac. Acumulació de T-20 fusionat als dominis Rx3, R3, P4 i X10.

Encara que l'expressió transitòria mitjançant agroinfiltració és útil en la posta a punt dels vectors d'expressió, no és un sistema adequat per a la producció de

proteïnes recombinants atesa la limitació de l'escalat. Per tant, per desenvolupar un sistema de producció en plantes de tabac és necessari obtenir línies transgèniques que puguin generar gran quantitat de biomassa per processar. Per aquest motiu es va voler comprovar si els resultats d'acumulació obtinguts amb l'agroinfiltració també es reproduïen en les plantes transformades de forma estable.

Degut a que en el cribratge de les línies es va observar una variació important en els nivells d'expressió d'una mateixa proteïna de fusió (veure apartat 1.2.1), es va escollir una línia representativa de cada transformació (Rxt3.36, Rt3.7, Pt4.62 i Xt10.23) per a comparar els nivells d'acumulació de les diferents proteïnes. De la mateixa manera que en l'apartat anterior, aquestes línies es van analitzar per *Western Blot* amb l'anticòs  $\alpha$ T20 per comparar els nivells d'acumulació (Fig. 22A). Per poder visualitzar totes les fusions, en aquest cas també va ser necessari analitzar una quantitat diferent de proteïna total soluble (PTS) extreta de cada línia. Així, per a la línia Rt3.7 es va emprar el doble de PTS (40  $\mu$ g) que per a Rxt3.36 (20  $\mu$ g) i en les línies Pt4.62 i Xt10.23 quatre vegades més (80  $\mu$ g). Així doncs, les diferències d'acumulació entre les línies transgèniques son més accentuades del que es pot observar a la figura 22A.



**Figura 22. Acumulació de les proteïnes de fusió en línies transgèniques de tabac.**

(A) Immunodetecció amb  $\alpha$ T20 de les proteïnes de fusió en línies transgèniques representatives de tabac. Per poder visualitzar totes les fusions ha estat necessari analitzar diferent quantitat de proteïna total: Rx3-T20 20 $\mu$ g, R3-T20 40 $\mu$ g, P4-T20 i X10-T20 80 $\mu$ g. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

(B) *Northern Blot* de línies transgèniques de tabac. Detecció dels transcrits corresponents a proteïnes de fusió amb sonda contra T20, normalització amb sonda ribosomal 25s utilitzant l'aplicació *Quantity-One* (Bio-Rad).

Els resultats demostren que l'expressió de T-20 fusionat a la regió N-terminal sencera de la  $\gamma$ -zeïna (Rx3-T20) proporciona el nivell d'acumulació més alt en les línies transgèniques de tabac. Tot i això es pot apreciar un augment notable en l'acumulació de les fusions que contenen el domini repetitiu (Rx3-T20 i R3-T20)



respecte a les altres. Aquest resultat dona suport a la importància d'aquest domini en l'agregació de la proteïna en el RE (Kogan i col., 2001). Tanmateix, el domini Pro-X també influeix positivament, ja que la seva presència en la fusió Rx3-T20 proporciona una millora significativa en acumulació respecte a la fusió en què hi manca aquest domini (R3-T20). Encara que és difícil d'apreciar, sembla que l'addició d'una sola repetició PPPVHL del domini repetitiu en la proteïna P4-T20, millora sensiblement el nivell d'acumulació de la fusió que només conté el domini Pro-X (X10-T20). Tot i això, l'acumulació d'aquestes dues proteïnes de fusió és molt inferior a la resta. Per tant, queda demostrat que la proteïna de fusió Rx3-T20 és la millor per provocar una alta acumulació del fàrmac T-20 en plantes de tabac. Per aquest motiu els estudis d'estabilitat, localització subcel·lular i purificació és centraran bàsicament en plantes que produeixen aquest tipus de fusió.

Com es pot apreciar, els resultats obtinguts amb les plantes transformades de forma estable coincideixen amb els obtinguts per agroinfiltració, confirmant la idoneïtat de l'agroinfiltració com a sistema ràpid i flexible per a l'estudi comparatiu de l'acumulació de proteïnes recombinants en plantes de tabac.

Fins ara hem demostrat que les diferents seqüències de  $\gamma$ -zeïna presents en la fusió afecten a la acumulació de proteïna. Aquestes diferències, però, podrien ser degudes a variacions en la taxa de transcripció o estabilitat de missatgers i no a les característiques d'acumulació de la pròpia proteïna de fusió. Per respondre a aquesta pregunta es van realitzar experiments de *Northern Blot* que ens permetessin veure si les diferències observades a nivell de proteïna també eren presents a nivell de RNA missatger (Fig.22 B). Per a aquesta anàlisi es va extreure RNA de quatre conjunts de plantes formats per les línies amb nivells més elevats d'expressió de cada proteïna de fusió. D'aquesta manera es pretenia eliminar les variacions individuals de cada planta que podrien enterbolir la comparació entre les diferents fusions. Els transcrits corresponents a les proteïnes de fusió es van detectar amb una sonda formada per la seqüència del T-20 i es va utilitzar una sonda contra RNA ribosomal 25S per estandarditzar els valors.

El resultat (Fig.22 B) mostren que existeix una certa variació en els nivells de transcrit de les diferents fusions, sent Rx3-T20 la fusió que més transcrit acumula, seguida de R3-T20, X10-T20 i P4-T20. Al normalitzar el marcatge amb l'aplicació informàtica *Quantity One* (Bio-Rad) es pot veure com les diferències en cap cas superen el 2x. Segons la nostra opinió, aquesta variació en els nivells de transcrit no explica les importants variacions en els nivells d'acumulació de les proteïnes de fusió. Per tant, concloem que les variacions en l'acumulació de les diferents proteïnes de fusió són degudes principalment a les propietats d'aquestes proteïnes.

A part de comparar les diferents fusions, també es va quantificar l'acumulació mitjançant experiments ELISA, dissenyats al laboratori. Resumint, extractes proteics de línies transgèniques es van unir a plaques *MaxiSorp* (Nunc) i es va detectar la proteïna de fusió mitjançant l'anticòs  $\alpha$ T20. Com a patró es va utilitzar T20 sintètic unit a BSA dins d'una matriu formada per extracte proteic de plantes salvatges. Atesa la baixa sensibilitat d'aquest tipus d'experiment, només es va poder quantificar l'acumulació en la línia Rxt3.31, expressora màxima de la proteïna de fusió Rx3-T20.

El resultat va ser que Rx3-T20 representava un 0,3% de la proteïna total soluble. Cal remarcar que, segons el nostre parer, aquesta dada no reflecteix únicament la quantitat de proteïna present a la planta, sinó que també es veu influenciada per la capacitat de solubilització de la proteïna en un tampó determinat. En el nostre cas, el fet que només fos possible solubilitzar aproximadament el 50% de la proteïna de fusió fa que aquest valor reflecteixi més un problema d'extracció que l'acumulació real a la planta. Tot i això, actualment és el valor més utilitzat per a avaluar el nivell d'expressió en un sistema de producció en plantes.

#### **1.4. Rx3-T20 és estable en fulles de tabac assecades**

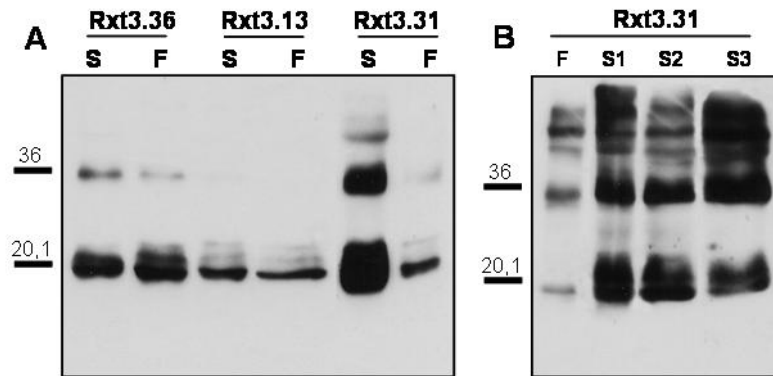
Un dels inconvenients més importants de les plantes de tabac com a sistema de producció de proteïnes recombinants és que aquestes són sintetitzades en un ambient aquós, fet que afecta seriosament la seva estabilitat. És necessari, per tant, congelar o processar el material immediatament per tal que la proteïna expressada no es degradi. Vam creure interessant estudiar si la proteïna de fusió Rx3T20 es degradava o no després d'un procés de dessecació.

Per a aquest estudi, es van sotmetre a dessecació fulles fresques de diferents línies Rxt3 en una cambra ventilada a 37°C. Al cap de dos setmanes es va apreciar una reducció de vuit vegades en el pes de la fulla i una consegüent reducció de volum. Al comparar per immunoblot l'acumulació de Rx3-T20 en trossos de fulla assecats i trossos congelats prèviament, es va poder veure que en totes les línies analitzades la proteïna de fusió era estable a la dessecació (Fig.23 A). Un cas especialment interessant és la línia Rxt3.31, en la qual es va observar un increment considerable de l'acumulació en fulles assecades. En les plantes d'aquesta línia es produïa algun fenomen que feia augmentar l'expressió de la proteïna recombinant durant el procés de dessecació. Com que aquest increment es produïa en totes les plantes d'una única línia, creiem que segurament deu ser provocat per l'efecte posicional del transgèn. Possiblement la inserció es troba pròxima a elements que s'activen fortament durant la dessecació.

Es van provar diferents sistemes d'assecat de la fulla per poder determinar en quines condicions s'augmentava l'acumulació de la fusió en la línia Rxt3.31. Trossos de la mateixa fulla es van assecar a temperatura ambient durant quinze dies i a 37°C durant dos i quinze dies (Fig.23 B). Els resultats de *Western Blot* de la proteïna demostren que l'increment en l'acumulació es produeix tant a temperatura ambient com a 37°C. A més, quan les fulles són assecades a 37°C la major part de l'increment té lloc en els dos primers dies de dessecació.

A part dels avantatges pel que fa a emmagatzematge i processament del material vegetal, el fet que Rx3-T20 sigui estable i s'incrementi la seva expressió en l'assecat de la fulla, beneficien substancialment la seva purificació. La majoria de proteïnes de la fulla de tabac (p.e. Rubisco) són degradades en el procés d'assecat,

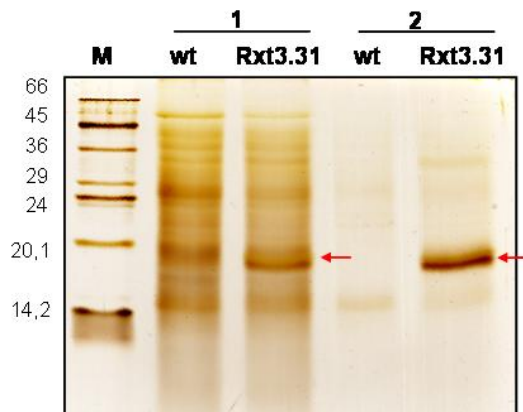
mentre que el contingut en proteïna de fusió Rx3-T20 augmenta. D'aquesta manera estem enriquint notablement la mostra amb la proteïna d'interès facilitant la seva purificació a partir de fulla de tabac. De fet, a l'analitzar per impregnació amb nitrat de plata extractes proteïcs de fulla seca de la línia Rxt3.31 correguts en gels SDS-PAGE, s'observa que la proteïna de fusió Rx3-T20 és majoritària (Fig.24).



**Figura 23. Estabilitat de la proteïna Rx3-T20 a la dessecació.**

(A) *Western Blot* ( $\alpha$ G2) de fulles seques (S) i fresques (F) de diferents línies transgèniques de tabac. En Rxt3.31 es produeix una augment en l'acumulació de proteïna recombinant durant la dessecació.

(B) Comparació per *Western Blot* ( $\alpha$ G2) de diferents procediments d'assecat de fulles de la línia Rxt3.31. S1: secat a temperatura ambient, S2: 2 dies a 37°C, S3: 15 dies a 37°C. Valors de pesos moleculars expressats en kD.



**Figura 24. Acumulació Rx3-T20 en fulles seques de la línia Rxt3.31.** Extractes proteïcs de fulles salvatges (wt) i Rxt3.31 impregnats amb nitrat de plata sobre un gel SDS-PAGE. En (1) es mostra l'extracció directa de la proteïna Rx3-T20 en el tampó TrisHCl pH8 50mM, DTT 200mM; en (2) s'ha fet pre-extraccions amb el mateix tampó però sense agent reductor per tal d'eliminar proteïnes solubles en l'extracció final. La proteïna de fusió Rx3-T20 s'ha indicat amb una fletxa vermella. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

Vam creure convenient quantificar l'acumulació de Rx3-T20 en fulla seca de Rxt3.31, ja que és a partir d'aquest material d'on es purificaria el T-20. Realitzant experiments d'ELISA amb la metodologia descrita anteriorment, es va determinar que la proteïna Rx3-T20 representava aproximadament el 10% de la proteïna total soluble. Aquest resultat, encara que a simple vista sembla sobrevalorat, concorda amb la quantitat de proteïna detectada en la figura 24. S'ha produït doncs un increment de 30 vegades en l'acumulació de la proteïna de fusió respecte a fulla fresca.

## **2. Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió**

L'estratègia de fusionar el T-20 amb dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna es basa en la capacitat d'aquestes seqüències per retenir la proteïna recombinant en el RE reticle endoplàsmic (RE) i formar cossos proteïcs (CP). Geli i col. (1994) havien demostrat que la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna (Rx3) era capaç de quedar retinguda en el RE quan era expressada en plantes transgèniques d'*Arabidopsis*. Posteriorment, estudis realitzats en el laboratori per Sabine Ramassamy van demostrar que proteïnes de fusió formades per les seqüències de  $\gamma$ -zeïna Rx3 i P4 fusionades a l'hormona calcitonina no només eren retingudes al RE sinó que tenien la capacitat de formar CP quan eren expressades en plantes de tabac. En aquest cas, els dominis de  $\gamma$ -zeïna induïen la formació *de novo* d'un orgànol especilitzat en l'acumulació de proteïnes de reserva i que no està present de forma natural en teixits vegetatius.

Aquests precedents sumats a la capacitat de formació d'oligòmers de les proteïnes de fusió amb T-20 ens suggerien que aquestes també podrien acumular-se formant CP derivats de RE en fulles de tabac. Per respondre a aquesta pregunta s'han utilitzat dos aproximacions experimentals: el fraccionament subcel·lular d'homogenats cel·lulars i la immunolocalització al microscopi confocal. Els experiments s'han centrat en la línia transgènica de tabac Rxt3.31 que acumula la fusió Rx3-T20, ja que és la línia més interessant per a la producció de T-20.

### **2.1. Experiments de fraccionament subcel·lular**

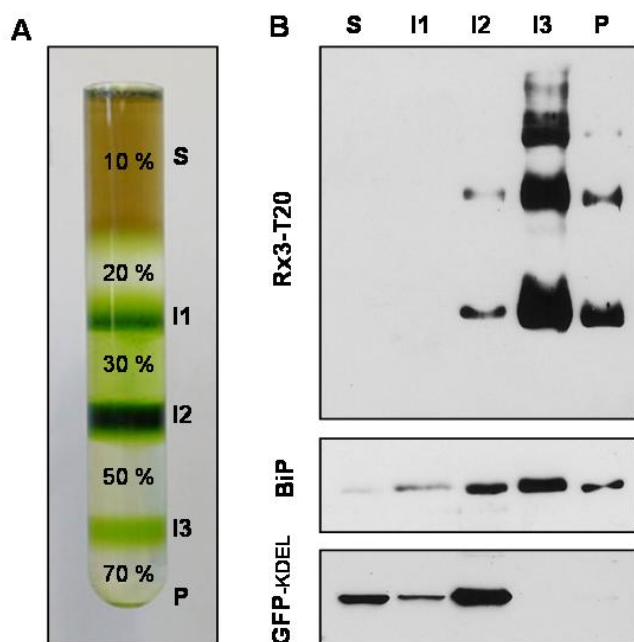
Les diferents densitats dels compartiments cel·lulars permeten separar-los mitjançant la centrifugació d'homogenats cel·lulars en gradients de sacarosa. Així, els cossos proteïcs naturals presents en les llavors i emmagatzemadors de proteïnes de reserva, sedimenten a densitats de sacarosa molt altes (Müntz, 1998). En el cas de blat de moro, per exemple, els CP derivats de RE, plens de zeïnes, sedimenten a densitats superiors a  $1.2 \text{ g/cm}^3$  o el que és el mateix, 60 % (p/v) de sacarosa (Ludevid i col., 1984). D'altra banda, el reticle endoplasmàtic rugós de plantes té una densitat inferior i sedimenta entre les solucions del 30 i el 50 % (p/v) de sacarosa (Gomord i col., 1997).

Per tal de determinar si la proteïna de fusió Rx3-T20 s'acumulava o no en orgànuls cel·lulars similars als CP naturals, es va realitzar un fraccionament subcel·lular a partir d'un homogenat de fulla de la línia transgènica Rxt3.31. Aquest homogenat es va resoldre en un gradient discontinu format per solucions del 10, 20, 30, 50 i 70 % (p/v) en sacarosa (Fig.25 A). A continuació, es van analitzar les diferents fraccions i interfases per *Western Blot* utilitzant l'anticòs  $\alpha$ G2 per a detectar la proteïna de fusió. Com es pot apreciar a la figura 25 B, Rx3-T20 es localitzava majoritàriament en la fracció corresponen a CP (I3), tot i que també era present en la fracció de RE (I2) i en el sediment (P). A més, la detecció de bandes d'alt pes molecular en aquestes fraccions ens suggeria que Rx3-T20 s'autoensablava formant oligòmers que no es podien dissociar totalment tot i les condicions desnaturalitzants i reductores utilitzades

en l'electroforesi. Així doncs, aquest resultat demostra que la fusió Rx3-T20 s'acumula en orgànuls altament densos i amb densitats similars als cossos proteics naturals de llavor.

Les mateixes fraccions provinents del fraccionament subcel·lular de fulla Rxt3.31 també es van analitzar utilitzant un anticòs contra la proteïna BiP ( $\alpha$ BiP), xaperona resident en el RE. Com era d'esperar aquesta proteïna es va detectar en la fracció de RE però també es localitzava de forma enriquida en la fracció de CP. Aquest fet ens suggeria que els orgànuls densos on s'acumulava la proteïna de fusió Rx3-T20 podrien derivar del RE, reforçant la hipòtesi de que es tractés de CP.

Per confirmar que la fracció de CP (I3) no contenia restes de RE es va realitzar un experiment control que consistia en l'expressió i localització d'una proteïna recombinant que s'acumulés en el RE. En aquest cas es van analitzar plàntules de tabac transformades de forma transitòria per agroinfiltració que expressaven la proteïna GFP amb el tetrapèptid KDEL de retenció a RE. El resultat de l'anàlisi de les fraccions per *Western Blot* utilitzant un anticòs contra GFP ( $\alpha$ GFP) va ser que GFP-KDEL es localitzava de forma majoritària en la interfase entre el 30 i el 50 % (I2) i no en la interfase corresponent a CP (I3) (Fig.25 B). Per tant, amb aquest experiment podem afirmar que la interfase I3 no conté restes de RE. D'altra banda, la presència de GFP-KDEL en el sobrenedant i en I1 es pot explicar amb la ruptura del RE en el procés de homogeneïtzació de la fulla.



**Figura 25. Localització Rx3-T20 en CP mitjançant fraccionament subcel·lular.**

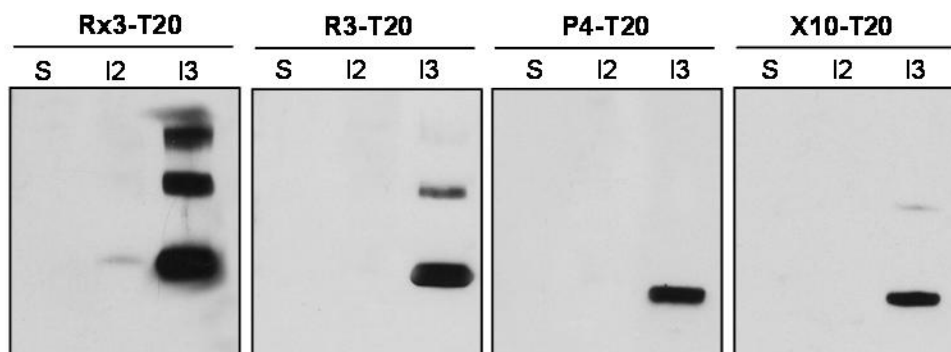
(A) Imatge d'un gradient de densitat discontinu format per solucions del 10, 20, 30, 50 % (p/v) en sacarosa. Al centrifugar un homogenat de fulla de tabac es pot aïllar la fracció soluble (S), una interfase rica en RE i cloroplasts (I2), i una interfase densa on sedimenten els CP de blat de moro (I3). En el sediment (P) podem trobar CP amb alta densitat i restes de debris cel·lulars, mentre que en la interfase I1 trobem altres estructures cel·lulars que inclouen fragments de reticle.

(B) Immunodetecció de les diferents fraccions obtingudes a partir d'homogenats de fulles de la línia Rxt3.31. La proteïna de fusió Rx3-T20 s'ha detectat amb l'anticòs  $\alpha$ G2 i la chaperona de reticle BiP amb l'anticòs  $\alpha$ BiP. La proteïna GFP-KDEL s'ha detectat amb  $\alpha$ GFP en les fraccions de plantes transformades per agroinfiltració.

Després de demostrat que la fusió de la regió N-terminal sencera de la  $\gamma$ -zeïna (Rx3) al T-20 induïa l'acumulació de la proteïna de fusió en orgànuls densos, probablement CP, es va voler esbrinar si les altres seqüències de  $\gamma$ -zeïna (R3, P4 i X10) també tenien aquesta capacitat. Per a aquest estudi es van utilitzar plantes de tabac agroinfiltrades que expressaven les quatre proteïnes de fusió i es van analitzar

utilitzant el mateix gradient de sacarosa que en l'experiment anterior. En aquest cas, el *Western Blot* de les fraccions cel·lulars es va realitzar amb l'anticòs  $\alpha$ T-20, ja que permetia detectar totes les proteïnes de fusió. En la figura 26 es mostren només els carrils corresponents al sobrenedant (S), interfase de RE (I2) i interfase de CP (I3) per tal de clarificar el resultat.

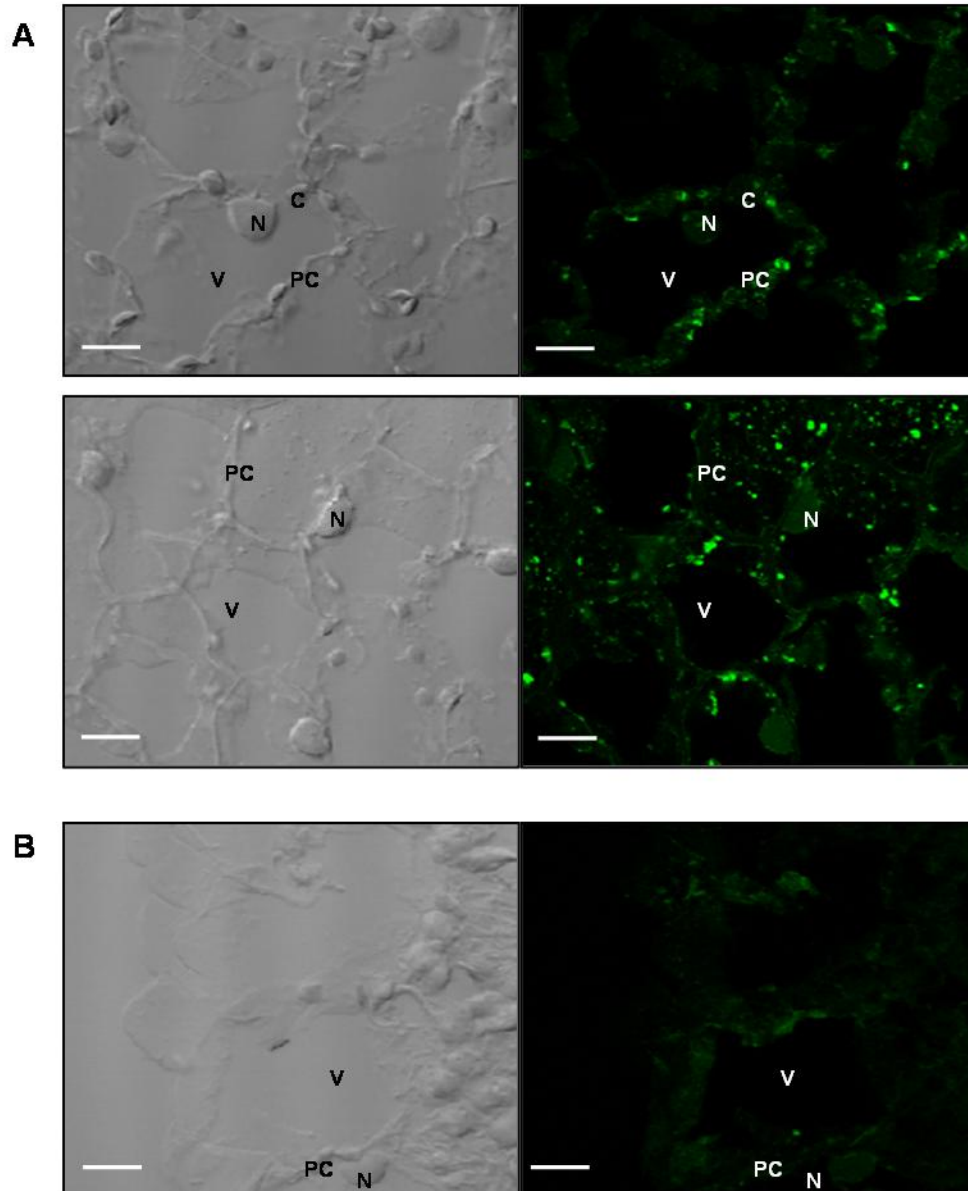
Com es pot apreciar, les quatre proteïnes de fusió es van localitzar exclusivament en la interfase corresponent a CP, on es va detectar la banda corresponent al monòmer de proteïna de fusió i, en la majoria de casos, bandes que corresponen a oligòmers de proteïna. Per tant, podem afirmar que encara que cada fusió presenta un cert grau d'acumulació, en tots els casos tenen la capacitat d'agregar-se en orgànuls densos en fulles de tabac. Consegüentment, sembla que tant el domini Pro-X (fusió X10-T20) com el domini repetitiu (fusió R3-T20) són suficients per induir l'acumulació en aquests orgànuls, que probablement corresponen a CP.



**Figura 26. Localització de proteïnes de fusió en CP per fraccionament subcel·lular.** *Western Blot* de les fraccions obtingudes mitjançant la centrifugació en un gradient de sacarosa d'homogentats de plantes de tabac transformades per agroinfiltració. Immunodetecció realitzada amb l'anticòs  $\alpha$ T20.

## 2.2. Immunolocalització de la proteïna Rx3-T20

La segona aproximació experimental utilitzada per determinar la localització subcel·lular de la proteïna de fusió Rx3-T20 va consistir en la seva immunolocalització en fulla de tabac mitjançant microscòpia confocal. Talls longitudinals de fulles de tabac de la línia transgènica Rxt3.31 es van incubar amb els anticossos  $\alpha$ G2 i  $\alpha$ AlexaFluor<sup>®</sup> 488 per tal de detectar la proteïna de fusió i es van observar al microscopi confocal. Com es pot apreciar a la figura 27, el marcatge es localitzava en unes estructures majoritàriament globulars de 0,1-1  $\mu$ m de diàmetre distribuïdes per tot el contingut cel·lular. Per la seva distribució, mida i forma podrien correspondre a CP, tot i que per afirmar-ho seria necessari estudiar la seva morfologia al microscopi electrònic. Malgrat això, si es suma aquest resultat als obtinguts en els experiments de fraccionament subcel·lular i als antecedents existents, la formació de CP sembla l'opció més viable.



**Figura 27. Immunolocalització Rx3-T20 en fulles de tabac.** Talls semifins de fulles de tabac transgènic (A) i salvatge (B) incubats amb l'anticòs  $\alpha$ G2 per detectar la proteïna de fusió Rx3-T20 mitjançant microscòpia confocal de fluorescència. Es pot veure que Rx3-T20 es localitza en les fulles transgèniques formant uns agregats compactes presents en el citoplasma. Aquestes estructures serien compatibles amb cossos proteics derivats de reticle. N: nucli, V: vacuola, PC: paret cel·lular, C: cloroplast. Les barres corresponen a 5  $\mu$ m.

### **3. Purificació de T-20 a partir de plantes de tabac**

La purificació de proteïnes recombinants en plantes representa la major part dels costos de producció (Nikolov i col., 2004). Conseqüentment, per tal que la producció en plantes d'una determinada proteïna sigui comercialment viable és necessari desenvolupar un sistema de purificació eficient, barat i que pugui ser escalat. A part, les plantes tenen unes peculiaritats que fan que la purificació de proteïnes a partir de teixits verds sigui especialment complicada. La presència de paret cel·lular dificulta enormement l'homogenització del teixit, fent que gran part de la proteïna recombinant resti en el debris cel·lular adherida a fibres de mides diferents. A més, l'alt contingut de compostos fenòlics de les plantes de tabac dificulta l'obtenció d'un producte pur (Menkhaus i col., 2004).

En aquest treball s'ha desenvolupat un procés de purificació de T-20 a partir de fulles de tabac transgènic. Com a material de partida s'ha escollit fulles seques de la línia Rxt3.31 ja que presenta els nivells més alts d'acumulació de la proteïna de fusió Rx3-T20. El procés de purificació dissenyat es pot dividir en tres grans parts (Fig.28). La primera consisteix en l'homogenització del teixit i en l'extracció de la proteïna Rx3-T20 a partir de fulles seques de tabac. En la segona part s'aprofiten les característiques fisico-químiques de la fusió Rx3-T20 per purificar-la mitjançant precipitació selectiva i cromatografia de bescanvi aniònic. Una vegada es té la proteïna de fusió suficientment pura, es digereix amb la proteasa específica Factor Xa per alliberar el T-20 de la fusió i s'obté el pèptid T-20 pur mitjançant HPLC semipreparatiu. Per últim, es confirma que el producte purificat és el desitjat analitzant-lo per espectrometria de masses.

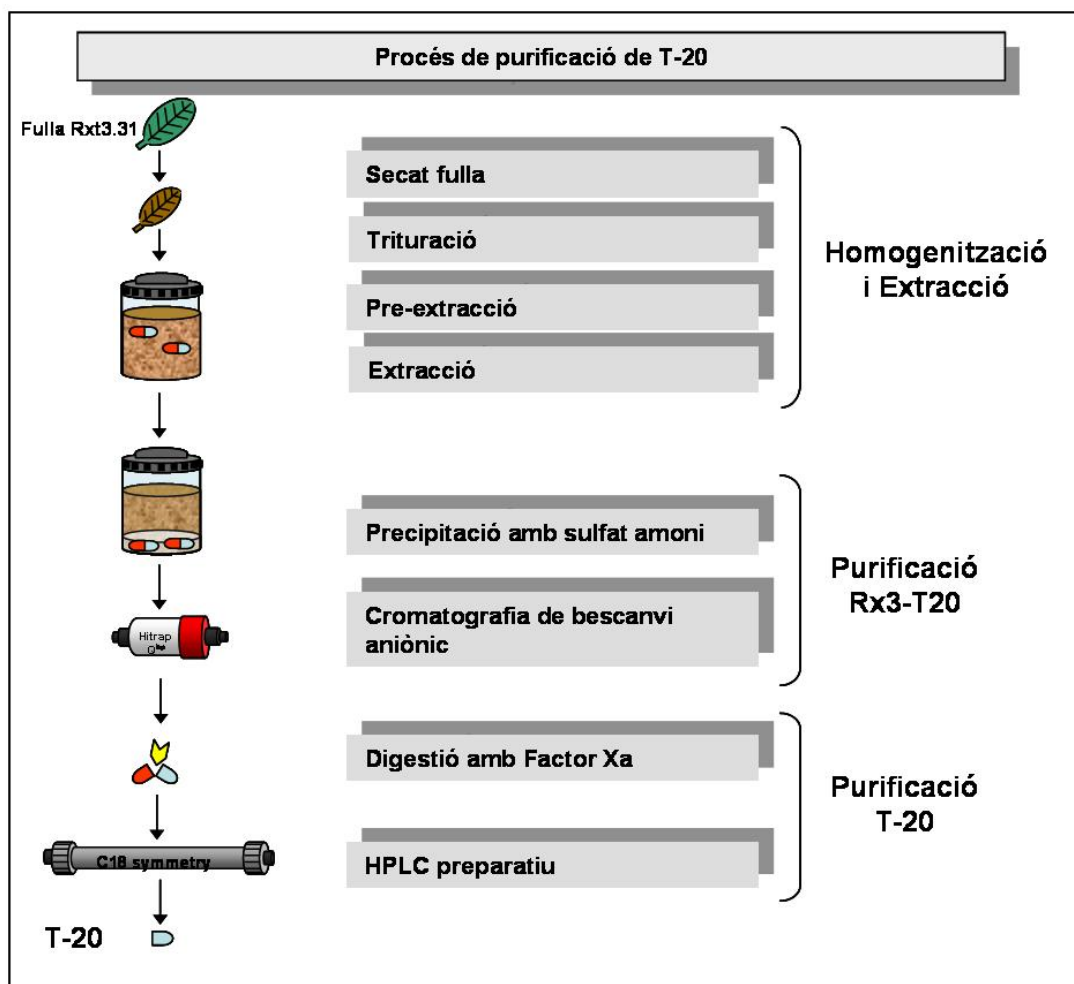
#### **3.1. Homogenització del teixit i extracció proteica**

A diferència de la resta de zeïnes de blat de moro, la  $\gamma$ -zeïna és soluble en solucions aquoses amb la presència d'un agent reductor (Ludevid i col., 1984). Per *Western Blot* es va poder comprovar que la fusió Rx3-T20 també tenia aquesta propietat. Quan s'utilitzava un tampó d'extracció de proteïnes sense agent reductor (TrisHCl pH8 50 mM) la fusió es detectava en la part insoluble, mentre que si s'afegia DTT o  $\beta$ -ME s'aconseguia solubilitzar part de la proteïna Rx3-T20. Aquesta característica ens ha permès realitzar una pre-extracció de la biomassa amb un tampó sense agent reductor, eliminant gran quantitat de proteïnes endògenes de la fulla. Posteriorment, s'ha solubilitzat la fusió emprant el mateix tampó amb  $\beta$ -ME al 2 % (v/v).

Un altre factor que influeix en la capacitat d'extracció de la proteïna recombinant és l'homogenització del teixit. Així doncs, utilitzant diferents mètodes de trituració a escala de laboratori, el percentatge de proteïna Rx3-T20 que s'extreia variava significativament. La trituració de les fulles seques amb una picadora domèstica (Molinox) va resultar més eficient que la utilització d'altres mètodes d'homogenització com el morter o el polítró. Tot i així, un gran percentatge de proteïna



recombinant, aproximadament el 50 %, quedava en el sediment i no es podia extreure encara que afegíssim detergents al tampó d'extracció, essent aquesta etapa la que més pèrdues provocava en la purificació.



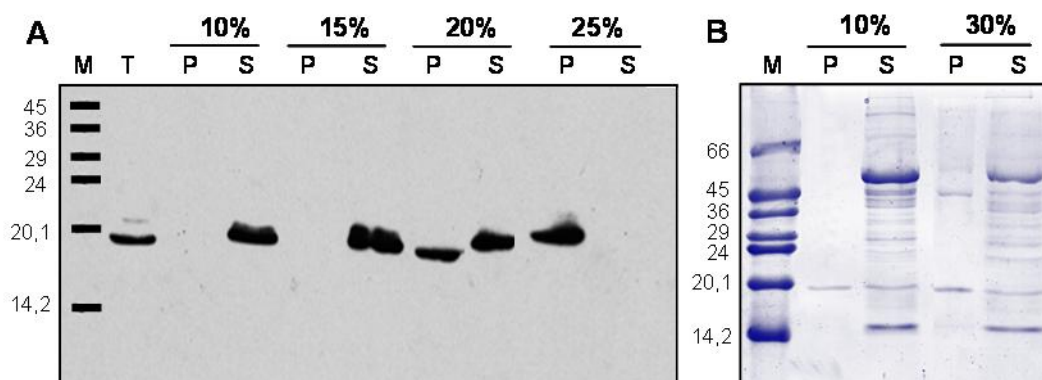
**Figura 28.** Esquema del procés de purificació de T-20 a partir de fulles de tabac transgènic. El procés es pot dividir en tres parts: homogeneització i extracció de la proteïna de fusió, purificació de Rx3-T20 i, finalment, digestió i purificació de T-20. En la primera part es parteix de fulles assecades de la línia Rxt3.31 i, després de triturar-les s'extrau la proteïna de fusió. Rx3-T20 es purifica mitjançant precipitació selectiva amb sulfat d'amoni i cromatografia de bescanvi aniónic. Per últim es digereix la fusió i es purifica el pèpid T-20 per HPLC.

### 3.2. Precipitació selectiva amb sulfat d'amoni

La solubilitat de les proteïnes depèn, entre altres coses, de la concentració de sals de la solució en què es troben. A baixa concentració, la presència de sals estabilitza els grups carregats de la proteïna, augmentant la seva solubilitat. Quan s'incrementa la concentració de sals, disminueix l'accessibilitat hídrica i les proteïnes s'agreguen i acaben precipitant. La majoria de proteïnes precipiten al voltant del 60 % de saturació en sulfat d'amoni, mentre que proteïnes amb caràcter hidrofòbic són capaces de precipitar a percentatges més baixos.

La proteïna de fusió Rx3-T20 mostra un certa hidrofobicitat donada pel domini repetitiu de la  $\gamma$ -zeïna. Aquest domini presenta una conformació d'hèlix amfipàtica de proliprolina-2, on els residus hidrofòbics es situen a un costat i els residus polars a l'altre (Dalcol i col., 1996). Així doncs, es va voler aprofitar aquesta característica per precipitar la fusió Rx3-T20 a baixes concentracions de sulfat d'amoni a partir de l'extracte proteic de fulla.

Per tal de determinar a quina concentració de sulfat d'amoni precipitava la fusió Rx3-T20, es van analitzar per *Western Blot* la fracció soluble i el sediment de precipitacions amb diferent percentatge de saturació de sulfat d'amoni (Fig.29 A). El resultat va ser que Rx3-T20 començava a precipitar al 20% de saturació en sulfat d'amoni i precipitava completament al 25%. Així doncs, com a primera etapa de purificació es va decidir utilitzar precipitacions del 10 i 30% de sulfat d'amoni sobre extractes de fulla de tabac. En la primera precipitació es separen de l'extracte les poques proteïnes que precipiten a aquesta concentració, quedant Rx3-T20 en solució (Fig.29 B). Aquest pas també serveix per eliminar part de la gran quantitat en pigments que contenen els extracte de teixit verd. Posteriorment, afegint sulfat d'amoni fins al 30% de saturació, la fusió precipita i es separa de la mostra gran part de proteïnes que queden en solució.



**Figura 29. Precipitació de la proteïna Rx3-T20 amb sulfat d'amoni.**

(A) *Western Blot* ( $\alpha$ G2) de precipitacions d'extracte de fulla de tabac Rxt3.31 amb concentracions creixents de sulfat d'amoni expressades en % de saturació. M: marcador, T: extracte total, P: precipitat, S: sobrenedant. Valors dels pesos moleculars del marcador expressats en kD.

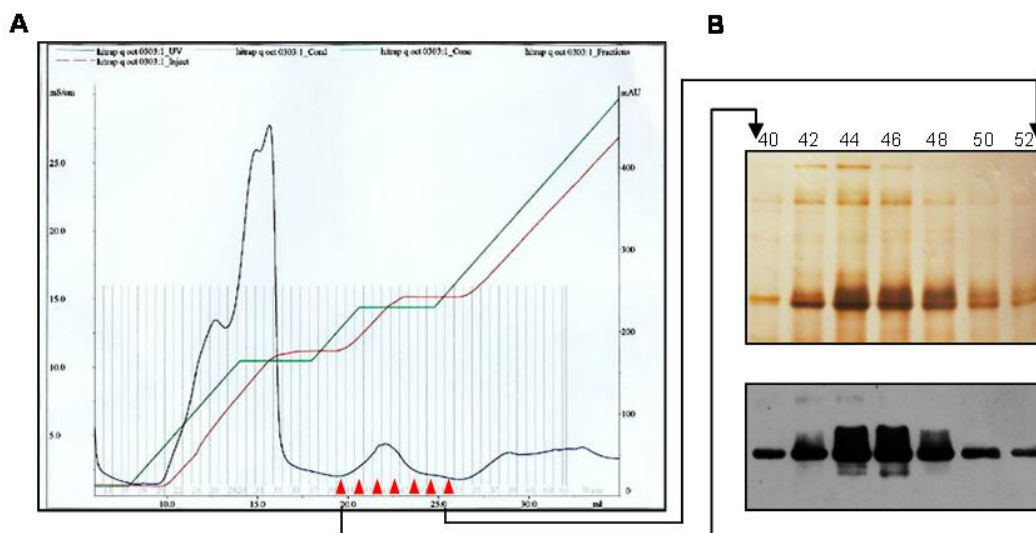
(B) Tinció amb blau de Coomasie de precipitacions d'extracte de tabac al 10 i 30% de saturació de sulfat amoni. Valors dels pesos moleculars del marcador expressats en kD.

Cal remarcar que la capacitat d'agregació de la proteïna de fusió va representar un inconvenient a l'hora de tornar a solubilitzar la proteïna de fusió a partir del precipitat de sulfat d'amoni. Va ser necessari incorporar detergent (CHAPS 1 % p/v) i agent reductor a altes concentracions ( $\beta$ -ME 5 %) per tal d'aconseguir solubilitzar el sediment que contenia Rx3-T20.

### 3.3. Cromatografia de bescanvi aniònic

El segon pas per aconseguir purificar la proteïna Rx3-T20 va consistir en una cromatografia de bescanvi iònic. Aquesta tècnica permet la separació de proteïnes segons la seva capacitat d'interacció iònica a una matriu sòlida amb càrrega positiva. Degut al caràcter hidrofòbic del domini Rx3, la capacitat d'interacció iònica de Rx3-T20 ve donada per la seqüència d'aminoàcids del T-20, que a pH 8 es trobava carregada negativament (pI 4,1).

En primer lloc, es va utilitzar un gradient lineal de 0-0,5 M de NaCl per determinar a quina concentració s'el·luïa la proteïna Rx3-T20 en una columna Hitrap Q<sup>hp</sup> (Amersham). Les fraccions col·lectades es van analitzar per *Western Blot* i es va poder determinar que Rx3-T20 s'el·luïa aproximadament a una concentració de 180 mM de NaCl. Posteriorment, com a etapa de purificació es va utilitzar un gradient similar de 0-0,5 M de NaCl on s'havien incorporat dos platós, un just abans i l'altre just després de que s'el·luís la proteïna de fusió (Fig.30 A). D'aquesta manera es va poder millorar la separació de Rx3-T20 respecte a les altres proteïnes contaminants. Les fraccions col·lectades es van analitzar per SDS-PAGE i *Western Blot* per determinar la presència de la fusió (Fig.30 B). També es van impregnar les fraccions amb nitrat de plata per tal de veure el seu grau de puresa. Aquelles fraccions que contenien la fusió Rx3-T20 en una alta puresa es van ajuntar i es van concentrar per a la posterior digestió.



**Figura 30. Purificació Rx3-T20 per cromatografia de bescanvi aniònic.**

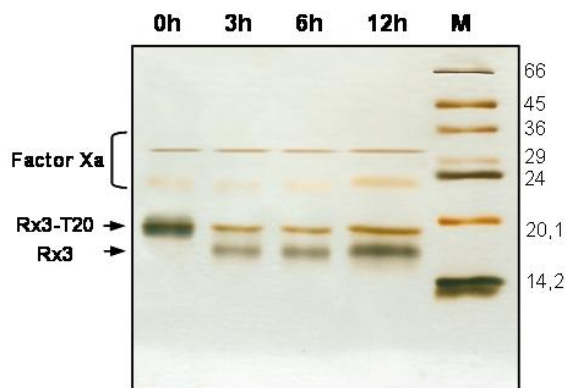
(A) Cromatograma de la purificació de Rx3-T20 en una columna Hitrap Q<sup>hp</sup>. Gradient continu de 0 a 0,5M NaCl amb platós situats a 150 mM i 200 mM per obtenir una millor separació.

(B) Anàlisi de les fraccions de FPLC per impregnació amb nitrat de plata i *Western Blot* ( $\alpha$ G2).

### 3.4. Digestió Rx3-T20 amb la proteasa Factor Xa

El Factor Xa és una endoproteasa animal que reconeix específicament la seqüència aminoacídica IEGR tallant en l'extrem C-terminal d'aquesta diana. Es va escollir aquesta proteasa perquè 1) la seqüència del T20 no conté cap diana específica de tall per al Factor Xa i 2) la proteòlisi no afegeix cap residu a la seqüència N-terminal del T-20, fet que podria afectar a l'activitat del fàrmac.

Per optimitzar la digestió de la fusió Rx3-T20 amb el Factor Xa es van avaluar diferents tampons de digestió, concentracions de proteïna, temperatures i temps d'incubació. Va ser necessari eliminar l'agent reductor de la mostra de proteïna per preservar l'activitat del Factor Xa, ja que aquest està format per dos cadenes polipeptídiques unides covalentment per ponts disulfur. En el tampó optimitzat (veure apartat B.3.7.4 de Material i Mètodes) es va aconseguir una digestió pràcticament completa de la fusió al cap de 3 hores d'incubació a temperatura ambient (Fig.31). A l'analitzar la digestió en gels SDS-PAGE i impregnació amb nitrat de plata es va poder veure la banda corresponent del fragment Rx3 però no va ser possible detectar el T-20 per tinció ni per immunodetecció, segurament degut al marcat caràcter àcid d'aquest pèptid. En la figura 31, la banda marró clar que es solapa amb Rx3-T20 correspon a la proteïna de la càpside del virus del mosaic del tabac (TMV) i es deguda a la infecció accidental de les línies transgèniques amb TMV. Aquesta contaminació ha dificultat enormement la purificació del T-20, ja que en fulles seques la proteïna del virus és majoritària.



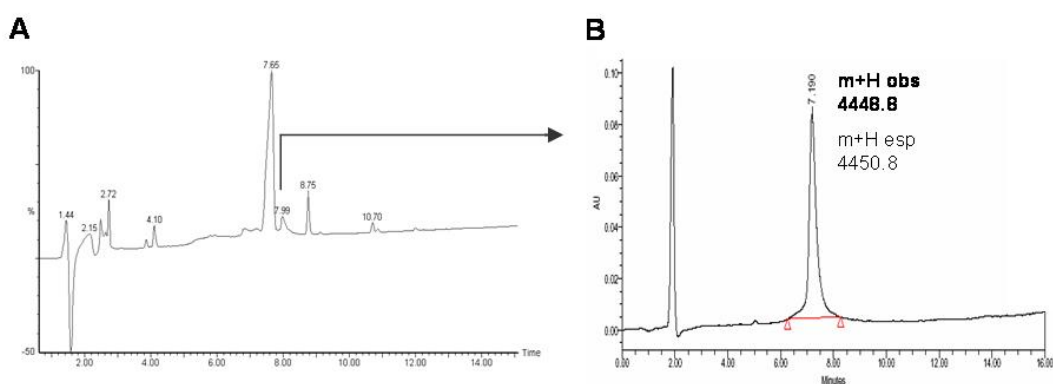
**Figura 31. Cinètica de digestió de Rx3-T20 amb Factor Xa.** Impregnació amb nitrat de plata de la digestió aturada a diferent temps (0h, 3h, 6h i 12h). La proteïna de fusió així com el fragment Rx3 es tenyeixen de color negre. La banda marró clar que es solapa amb Rx3-T20 correspon a la proteïna de la càpside del TMV. Les dos bandes superiors corresponen al Factor Xa. Els valors de pesos moleculars del marcador estan expressats en kD.

### 3.5. Purificació de T-20 per HPLC

El pèptid T-20 es va purificar de la barreja de digestió mitjançant HPLC preparatiu. Es va utilitzar un gradient continu de 30% a 70% d'acetonitril en 30 min sobre una columna C18 *symmetry* (7,8 x 100 mm, 5µm, 100Å, Waters). Les diferents fraccions col·lectades es van analitzar amb HPLC-PDA per tal de determinar la

presència de T-20. Aquelles fraccions en què el T-20 es trobava en una puresa superior al 90% es van ajuntar, mentre que la resta es va descartar.

Per tal de posar a punt aquest sistema de purificació es va utilitzar un pèptid T-20 produït per síntesi química (Teixidó, IRBB-PCB). Cal remarcar, que aquest pèptid es va sintetitzar amb els seus extrems amino i carboxi terminals lliures per tal que fos idèntic al produït en plantes. D'aquesta manera va ser possible determinar l'autenticitat del T-20 recombinant produït a plantes, així com la comparació de l'activitat del fàrmac produït en plantes respecte a l'obtingut per síntesi química. Mitjançant experiments de coinjecció en HPLC es va poder comprovar que els dos pèptids tenien el mateix temps de retenció a la columna (7,8 min) en les mateixes condicions cromatogràfiques.



**Figura 32. Cromatogramas d'HPLC de la purificació de T-20.** Condicions: Columna Symmetry C18 (3.8 x 150 mm) 5  $\mu$ m, 120  $\text{\AA}$ , 1 mL/min, detecció a 220 nm.

(A) Barreja de digestió Rx3-T20 en un gradient lineal de 30 a 70% d'acetonitril (+0.036% TFA) en aigua (+0.045% TFA) en 15 minuts.

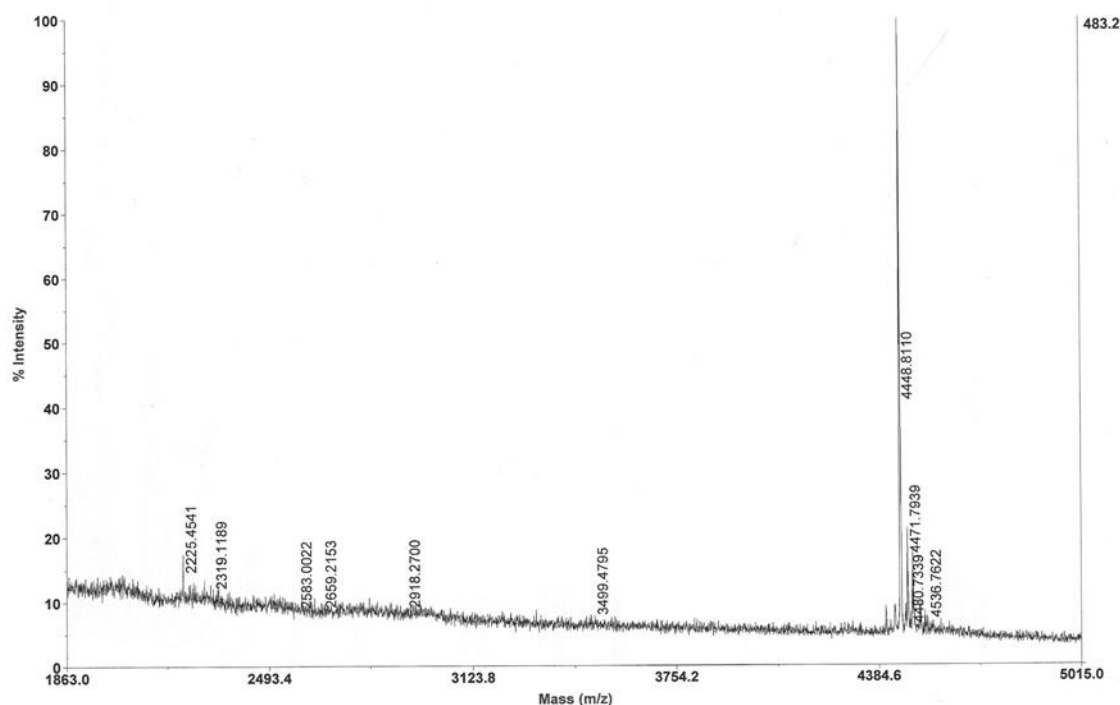
(B) Pèptid T-20 purificat de plantes en un gradient lineal de 30 a 70% d'acetonitril (+0.036% TFA) en aigua (+0.045% TFA) en 15 minuts. *m+H obs* correspon a la massa del T-20 més un protó determinada per espectrometria de masses; *m+H esp* correspon a la massa més un protó calculada a partir de la seva seqüència d'aminoàcids.

Finalment, el T-20 recombinant purificat de plantes es va quantificar per HPLC agafant com a corba patró diferents concentracions de T-20 sintètic, quantificat prèviament per anàlisi d'aminoàcids. Després de diverses purificacions, partint d'un total de 200 g de fulla seca de la línia Rxt3.31 es van obtenir aproximadament 100  $\mu$ g de T-20 amb una puresa del 90% (Fig.32 B). Com es pot apreciar, els rendiments de purificació van ser molt baixos, principalment degut a la disminució en l'eficiència de cada etapa provocada per la infecció de les plantes amb el virus del mosaic del tabac. Tot i així, aquesta quantitat i puresa ens va permetre afrontar el posterior anàlisi d'activitat del fàrmac en cèl·lules en cultiu.

### 3.6. Validació del T-20 i proteòmica de Rx3

El concepte de validació s'aplica normalment en sistemes de producció i consisteix bàsicament en la comprovació que el producte obtingut és el desitjat. A efectes pràctics es tradueix en l'anàlisi del T-20 produït en plantes per espectrometria de masses i la confirmació que la massa resultant és l'esperada.

Es va analitzar una mostra de T-20 purificat per HPLC per MALDI-TOF obtenint una massa més un protó ( $m+H$ ) de 4448,8 que concordava perfectament amb la teòrica, deduïda de la seva seqüència d'aminoàcids. A la figura 33 es pot veure l'espectre de MALDI-TOF obtingut amb el T-20 recombinant produït en plantes.



**Figura 33. Espectre de Maldi-TOF del T-20 purificat de plantes.**

Amb aquest resultat es demostra que el producte purificat a partir de fulles de tabac és efectivament T-20. A més, podem assegurar que no s'ha produït cap modificació post-traduccional en la seqüència del T-20, fet que podria comprometre l'activitat del fàrmac.

Encara que en aquest cas no té una importància pràctica, també ens interessava saber si en l'altra part de la fusió, Rx3, s'havia produït alguna modificació post-traduccional. L'increment en el pes molecular experimental de Rx3-T20 en SDS-PAGE respecte el teòric i l'amplada de les bandes obtingudes en els *Western Blots* ens suggerien que així podia ser. Per respondre a aquesta pregunta es va analitzar una mostra de Rx3 purificat de plantes mitjançant electroforesi en dos dimensions. El



pèptid Rx3 pur es va obtenir a partir del *flow through* del mateix gradient d'HPLC que per purificar T-20. Com es pot veure a la figura 34, la impregnació amb nitrat de plata del gel va mostrar que Rx3 presentava com a mínim quatre isoformes amb una massa similar, però diferent pl. Mitjançant *Western Blot* es va comprovar que totes elles reaccionaven amb l'anticòs  $\alpha$ G2. Aquest patró ja s'havia observat en anteriors estudis (Consoli i col., 2001) analitzant diferents zeïnes de blat de moro. També es va analitzar la mostra de Rx3 pur per MALDI-TOF, donant com a resultat un espectre de masses poc definit amb un pic majoritari a 15873 m/s, 743 m/s superior a l'esperat. Aquests resultats ens suggerien que probablement Rx3 presentava modificacions que per una banda incrementaven la seva massa i per l'altra variaven el seu pl.



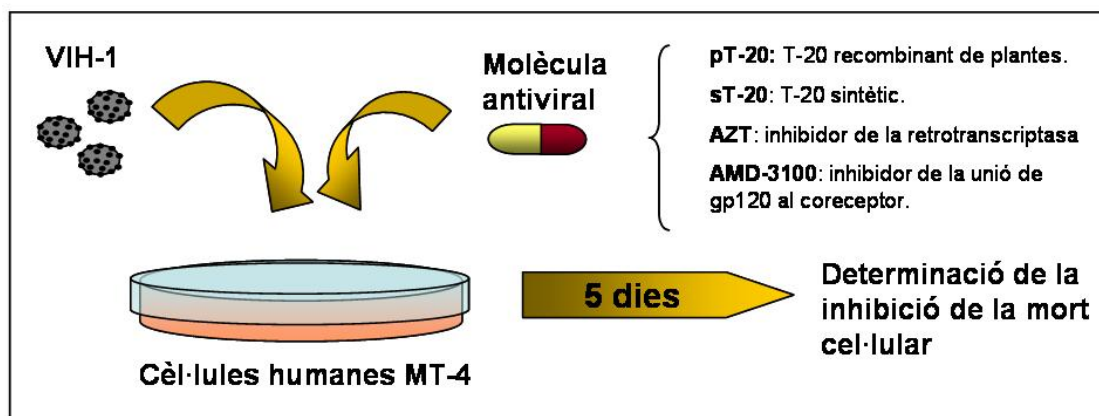
**Figura 34. Isoformes de Rx3 en electroforesi en dos dimensions.** Per a l'isoelectroenfoc s'han carregat 10  $\mu$ g de Rx3 en tires amb un gradient continu de pH 3 a 11. La separació per massa s'ha realitzat en gel SDS-PAGE amb 15% de poliacrilamida. Impregnant el gel amb nitrat de plata es poden diferenciar quatre isoformes del monòmer Rx3, així com dos isoformes de dimer.

Per intentar esbrinar quin tipus de modificacions presentava Rx3 es van realitzar diferents assaigs. Es va utilitzar el kit comercial *Dig-Glycan Detection Kit* (Roche) amb el qual no es va poder detectar glicosilacions en el pèptid. D'altra banda, tractant Rx3 amb fosfatasa alcalina no es va observar una variació en el patró obtingut per electroforesi en dos dimensions. Per tant, encara que les dades de proteòmica del pèptid Rx3 purificat de plantes suggereixen que aquest ha estat modificat post-traduccionament, no s'ha pogut determinar de quin tipus són.

#### 4. T-20 de plantes és actiu i no és tòxic en cèl·lules humanes

Per poder afirmar que l'expressió en plantes és un sistema viable per produir T-20 és necessari confirmar que el producte que s'ha obtingut és actiu en un sistema biològic i que no presenta toxicitat per causa del sistema de producció.

L'activitat del T-20 es va avaluar sobre línies cel·lulars humanes amb la col·laboració del Dr. José Esté (Fundació IRSI-Caixa, HUGTP). Es van realitzar experiments, en els quals cèl·lules humanes (MT-4) que expressen el receptor viral CD4 són infectades amb el virus VIH-1 (soca NL4-3) en presència d'un determinat agent antiviral (Fig.35). Mesurant la inhibició de mort cel·lular al cap de 5 dies de cultiu es pot quantificar l'activitat del fàrmac. D'aquesta manera es va avaluar l'activitat del T-20 produït en plantes (pT-20) així com la del pèptid produït per síntesi química (sT-20). També es van incloure en l'assaig els antivirals AZT i AMD-3100 com a fàrmacs control amb diferent mecanisme d'acció que el T-20. AZT és un anàleg de nucleòsid que inhibeix la retrotranscriptasa viral, mentre que AMD-3100 és un inhibidor de l'entrada que impedeix la unió de la glicoproteïna viral gp120 amb el coreceptor CXCR4 (De Clerq i col., 1994). A més, per comprovar el mecanisme d'acció del T-20 produït en plantes es van realitzar els mateixos assaigs amb una soca de VIH-1 resistent a T-20 (NL4-3/T-20r) en la qual s'ha produït una mutació en la seqüència de la glicoproteïna gp41 que impedeix la unió del T-20.



**Figura 35. Esquema del test d'activitat antiviral utilitzat.** Un cultiu de cèl·lules humanes MT-4 s'infecta amb el virus VIH-1 en presència de diferents concentracions d'un determinat agent antiviral. Al cap de 5 dies es determina la capacitat de inhibició de la mort cel·lular induïda pels fàrmacs.

Els resultats obtinguts demostren que el T-20 produït en plantes és actiu i inhibeix la mort de cèl·lules humanes infectades amb VIH-1 a una concentració efectiva 50 (CE50) de 2,2 µg/mL (Taula 4). A més, el fet que el pèptid sintètic presenti una CE50 semblant (3,6 µg/mL) al purificat de plantes ens indica que la producció en plantes no comporta cap disminució en activitat del fàrmac. D'altra banda, els experiments realitzats amb virus resistents a T-20 confirmen que el pèptid de plantes



té el mateix mecanisme d'acció que el T-20 sintètic i que els dos actuen unint-se a la mateixa seqüència de la glicoproteïna gp41 del VIH-1.

Compost	VIH-1: NL4-3/wt		VIH-1: NL4-3/T-20r	
	Mitjana CE50	Desv. Est. CE50	Mitjana CE50	Desv. Est. CE50
pT-20	2,200	0,32	>4,2	0,42
sT-20	3,600	0,31	>5	0,00
AZT	0,001	0,00002	0,001	0,0007
AMD-3100	0,009	0,012	0,033	0,046

**Taula 4. Activitat anti-VIH de T-20 produït a plantes (pT-20) i T-20 sintètic (sT-20).**

CE50: Concentració efectiva 50 o concentració necessària per inhibir el 50% de mort cel·lular induïda per VIH-1. La mort cel·lular ha estat evaluada amb el mètode MTT sobre línies MT4. Valors expressats en µg/ml.

Quan s'utilitza un sistema recombinant per produir un fàrmac és especialment important avaluar la citotoxicitat del producte, sobretot en el cas que es tracti d'una proteïna terapèutica humana. Encara que el producte presenti un alt grau de puresa, la contaminació amb compostos provinent de l'organisme de producció pot tenir un efecte nociu en cèl·lules humanes. Per aquest motiu, es va creure convenient determinar la citotoxicitat del pT-20 en línies cel·lulars humanes. Els resultats exposats a la taula 5 demostren que tant el pT-20 com el sT-20 no presenten cap efecte citotòxic en cèl·lules humanes MT4 a concentracions de 5 µg/mL. Tot i així, la limitada quantitat de T-20 purificat de plantes ha impedit la utilització de concentracions elevades en aquest experiment.

Compost	Conc. Màx.	CC50
pT-20	5	>5
sT-20	5	>5
AZT	1	>1
AMD-3100	1	>1

**Taula 5. Citotoxicitat del T-20 produït a plantes en cèl·lules MT4. CC50: Concentració citotòxica 50 o concentració necessària per induir la mort del 50% de cèl·lules no infectades amb VIH. La mort cel·lular ha estat avaluada amb el mètode MTT sobre línies MT4. Valors expressats en µg/ml.**

Finalment, podem concloure que l'expressió en plantes és un sistema viable per produir T-20. S'ha demostrat que el pèptid es pot acumular de forma eficient en plantes de tabac transformades, que és possible purificar-lo a partir de fulles i que, finalment, presenta activitat en cèl·lules en cultiu. Sembla que el cicle s'acaba aquí, però el camí que ha de recórrer un fàrmac fins a la seva comercialització és encara molt llarg. S'estima que el temps necessari per desenvolupar el sistema d'expressió és una cinquena part del total del procés. Els assaigs clínics, junt amb el consegüent

escalat del sistema i l'aprovació per un organisme regulador, conformen la part més laboriosa del procés. Actalment, en el mercat, només es troba una proteïna terapèutica, l'avidina, produïda en blat de moro per ProdiGene (<http://www.prodigene.com>; Hood i col., 1997). Tot i així, totes les proteïnes recombinants que es queden en aquest llarg camí contribueixen a conèixer millor les possibilitats i limitacions de les plantes com a sistema de producció.



## ***Capítol II***



*Aquest capítol de resultats consta de dos parts que tenen com a objectiu comú l'expressió específica de T-20 en grans d'arròs.*

*En el primer apartat s'analitza l'activitat del promotor gammaZ en plantes d'arròs com a possible candidat per dirigir l'expressió del T-20 específicament en gra.*

*En el segon apartat es descriuen els resultats obtinguts en l'expressió de la proteïna de fusió Rx3-T20 sota el promotor específic d'endosperma RP5. S'analitza la capacitat d'acumulació de la proteïna de fusió, així com la seva estabilitat en gra d'arròs. També es determina la seva localització subcel·lular mitjançant experiments de fraccionament subcel·lular i immunocitoquímica.*



## CAPÍTOL II:

**EXPRESSIÓ DE T-20 EN GRANS D'ARRÒS**

L'expressió específica de la proteïna recombinant en llavors de cereals aporta diversos avantatges al sistema de producció respecte a una expressió constitutiva (Stoger i col, 2005; Twyman i col, 2003). En primer lloc es limita l'expressió de la proteïna en gra evitant un possible efecte negatiu sobre el creixement i desenvolupament de les parts vegetatives. D'altra banda, la proteïna recombinant es sintetitzada en un teixit especialitzat en l'acumulació de proteïnes, fet que afavoreix enormement la seva estabilitat i el nivell d'acumulació. A més, l'expressió en gra també aporta avantatges a nivell de purificació, emmagatzematge i bioseguretat.

S'ha escollit l'arròs com a planta per expressar el T-20 degut a que és un cereal conreat arreu del món, genera una gran biomassa en forma de gra i és relativament fàcil de transformar i manipular.

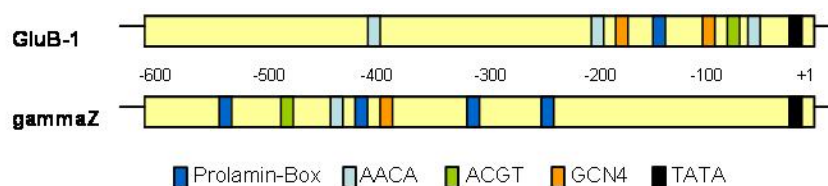
**1. Estudi de l'activitat del promotor gammaZ en plantes d'arròs**

El promotor gammaZ dirigeix l'expressió de la  $\gamma$ -zeïna de 27 kD en el endosperma de blat de moro. Encara que només està present en una o dues còpies en el genoma de blat de moro (Boronat i col, 1986), la  $\gamma$ -zeïna representa aproximadament el 15% del contingut proteic de l'endosperma. Aquest fet implica una potent activitat del seu promotor durant el desenvolupament del gra junt amb un sofisticat mecanisme de regulació.

En els últims anys s'han identificat diferents elements en *cis* que regulen l'activitat del promotor gammaZ (Ueda i col., 1994; Marzábal i col., 1998). Especialment important és una regió de 135 pb que conté un element bifactorial format per un motiu *Prolamin-box* junt amb un motiu *GCN4-like*. En la seva seqüència també s'han identificat motius amb una alta homologia a l'element AACA dels gens de les glutelins d'arròs i un motiu AZM que conté la seqüència ACGT, també present en la glutelina-1 d'arròs (Takaiwa i col., 1996; Washida i col., 1999). A la figura 36 es mostra un esquema de la distribució d'aquests elements en el promotor gammaZ i en el promotor de la glutelina-1 d'arròs (GluB-1).

Aquesta similitud amb promotors específics d'endosperma d'arròs ens va suggerir que les seqüències reguladores de gammaZ podrien ser útils per a l'expressió específica de proteïnes recombinants en gra d'arròs. Per aquest motiu, es va decidir comprovar la seva activitat i especificitat mitjançant l'expressió de la proteïna marcador GUS en plantes d'arròs transformades de forma estable.

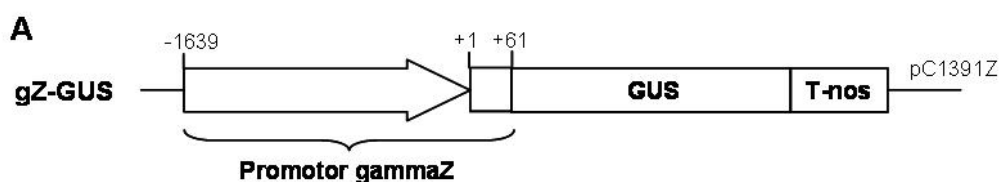




**Figura 36. Esquema dels promotors GluB-1 d'arròs i gammaZ de blat de moro.** En color es mostren els elements *in cis* putatius presents en els dos promotor.

### 1.1. Obtenció de línies transgèniques monocòpia d'arròs

La seqüència reguladora -1639 a +61 respecte a l'inici de transcripció del gen de la  $\gamma$ -zeïna (promotor gammaZ)(Marzàbal i col., 1998) es va clonar en un vector binari (pCamia1391Z) davant del gen marcador GUS per tal de poder visualitzar la seva activitat en plantes transgèniques d'arròs (Fig. 37A). S'ha realitzat, per tant, una fusió traduccional de promotor, on la regió 5' no codificant correspon al gen de la  $\gamma$ -zeïna.



**B**

calls transformats	contam. per agrobacteri	reactivitat	regeneració	línies transgèniques
150	23% (34/150)	30% (35/116)	27% (115/435)	115

**Figura 37. Transformació estable d'arròs amb gZ-GUS.**

(A) Construcció plasmídica (gZ-GUS) utilitzada en la transformació. S'ha realitzat una fusió traduccional del promotor gammaZ: la regió 5'-UTR correspon al gen de la  $\gamma$ -zeïna.

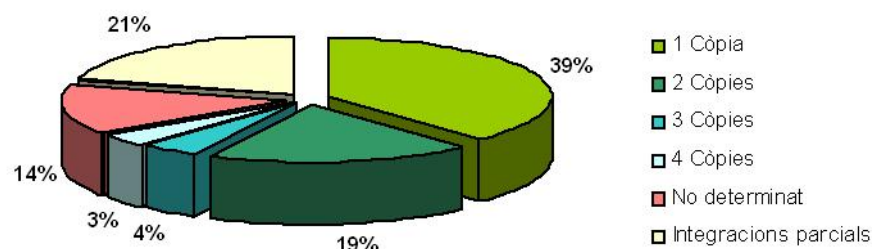
(B) Dades de la transformació de calls embriogènics amb *Agrobacterium thumefaciens*. Es mostra el nombre de calls transformats, les pèrdues provocades per un creixement excessiu de l'agrobacteri, el percentatge de calls amb nòduls transgènics, el tant per cent de regeneració a partir de calls transformats i el nombre final de línies transgèniques obtingudes.

Aquesta construcció plasmídica es va utilitzar per transformar de forma estable plantes d'arròs de la varietat japònica Ariete mitjançant la infecció de calls embriogènics amb *Agrobacterium thumefaciens* EHA105 recombinants (Hiei i col., 1997). A la figura 37B es mostren les dades referents al procés de transformació. Com

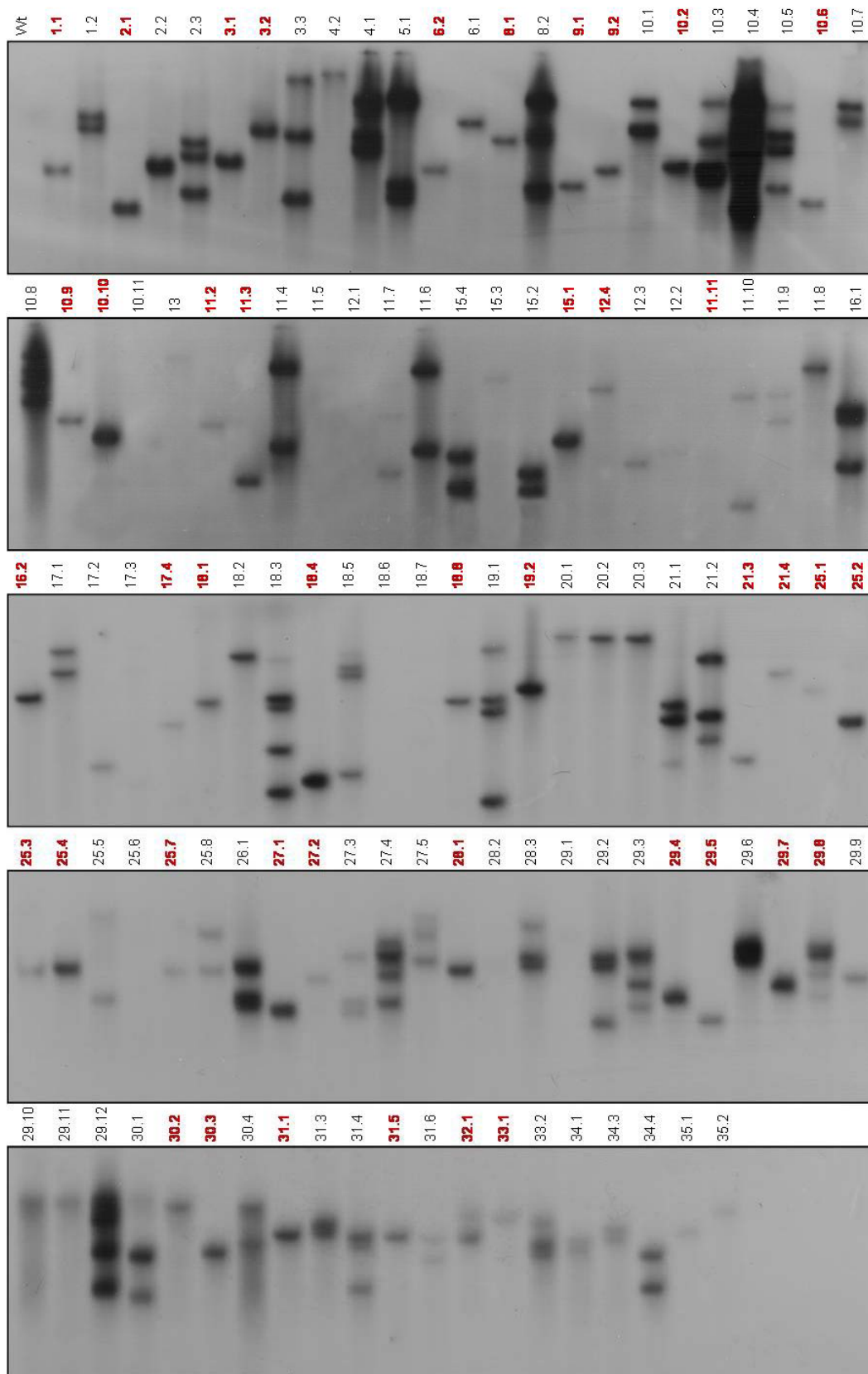
a resultat final s'obtingueren 115 línies transgèniques gZ-GUS resistents a l'antibiòtic de selecció en plantes higromicina. Tant l'obtenció de línies transgèniques com el posterior cribratge es van realitzar en el grup del Dr. Emmanuele Guiderdoni (CIRAD, Montpellier), on tenen una ampla experiència en transformació estable d'arròs.

Per a l'estudi de l'activitat del promotor es va considerar convenient utilitzar només les línies que contenien una única còpia del transgèn. D'aquesta manera es pretenia eliminar la variabilitat d'expressió provocada pel diferent nombre d'integracions de T-DNA recombinant. Així doncs, es van dissenyar experiments de *Southern Blot* que permetessin determinar el nombre d'integracions de cada línia transgènica. DNA genòmic extret de plantes  $F_0$  crescudes *in vitro* es va digerir amb l'enzim de restricció *HindIII* que només talla en un únic lloc el T-DNA. Les membranes generades es van hibridar tant amb una sonda contra el gen *gusA* com amb una sonda contra el gen de resistència a plantes *hpt*. Només aquelles línies que presentaven una banda en les dues hibridacions es van considerar monocòpia. Així doncs, si no s'observava hibridació amb una de les dues sondes es va considerar que s'havia produït una integració parcial o anòmala del T-DNA. Totes les línies en què els resultats de *Southern Blot* no eren clars es van descartar. A les figures 39 i 40 es mostra el cribratge de totes les línies per *Southern Blot*. En vermell s'han ressaltat les línies que després de les dues hibridacions es van considerar monocòpia.

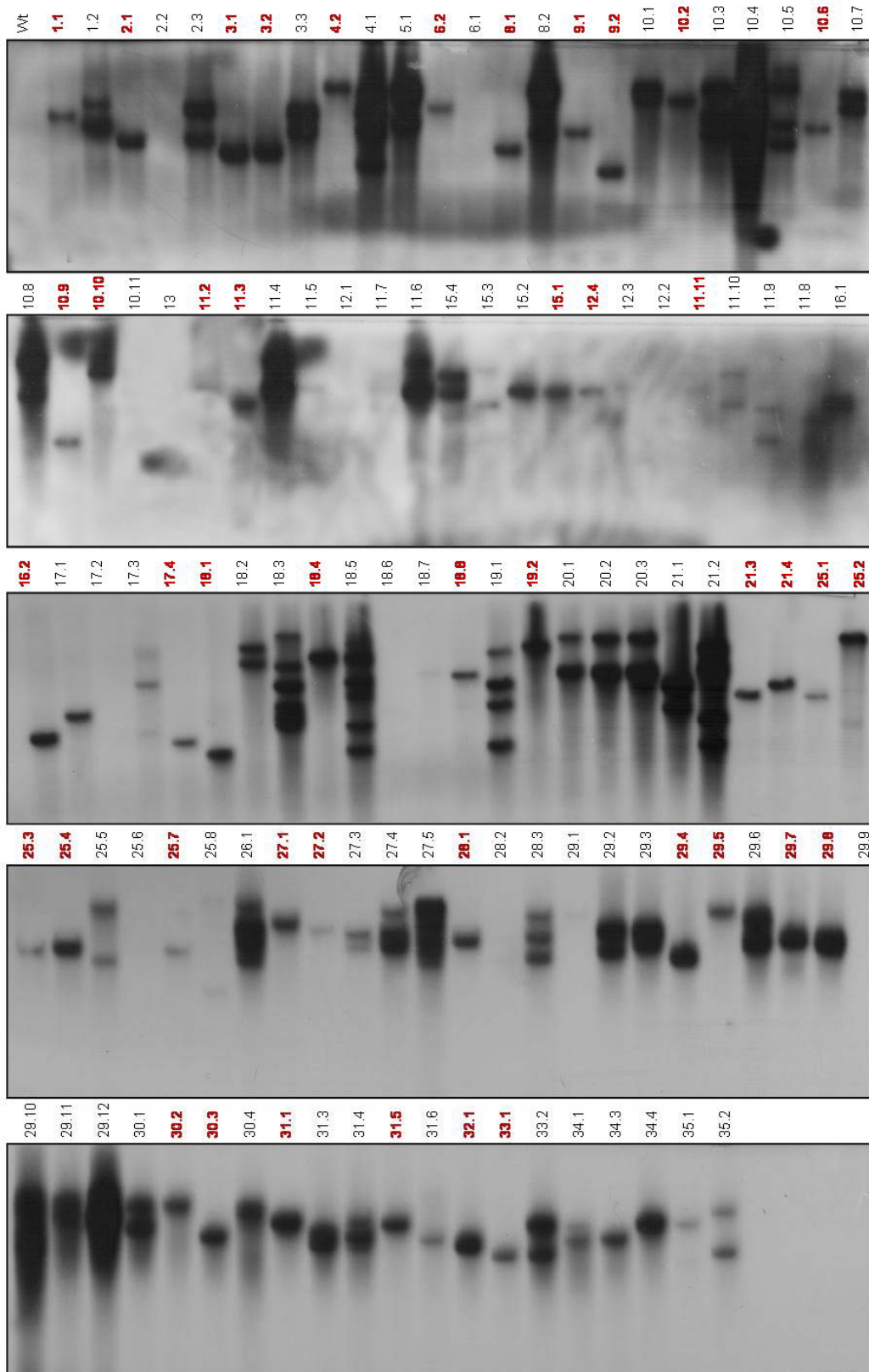
Com a resultat d'aquest cribratge es van seleccionar 44 línies monocòpia que mostraven una única banda en les dues hibridacions. D'altra banda, es va creure interessant analitzar quins patrons d'integració del T-DNA es produïen amb el sistema de transformació utilitzat. Els resultats mostren que un 39% de les línies regenerades presenten una única integració del T-DNA, mentre que el percentatge d'integracions múltiples va disminuint amb el nombre de còpies de T-DNA (Fig.38). Aquestes dades s'ajusten als resultats obtinguts per Sallaud i col. (2003) utilitzant el mateix protocol de transformació.



**Figura 38. Percentatge d'integracions de T-DNA en les línies transgèniques gZ-GUS.** El nombre de còpies de T-DNA ha estat determinat per *Southern Blot* emprant sondes contra *gusA* i el gen de resistència *hpt*. En les línies en què només s'ha obtingut hibridació amb una de les dues sondes es considera que s'ha produït una integració parcial del T-DNA. En el sector 'No determinat' s'han agrupat totes les línies on els resultats no han estat clars.



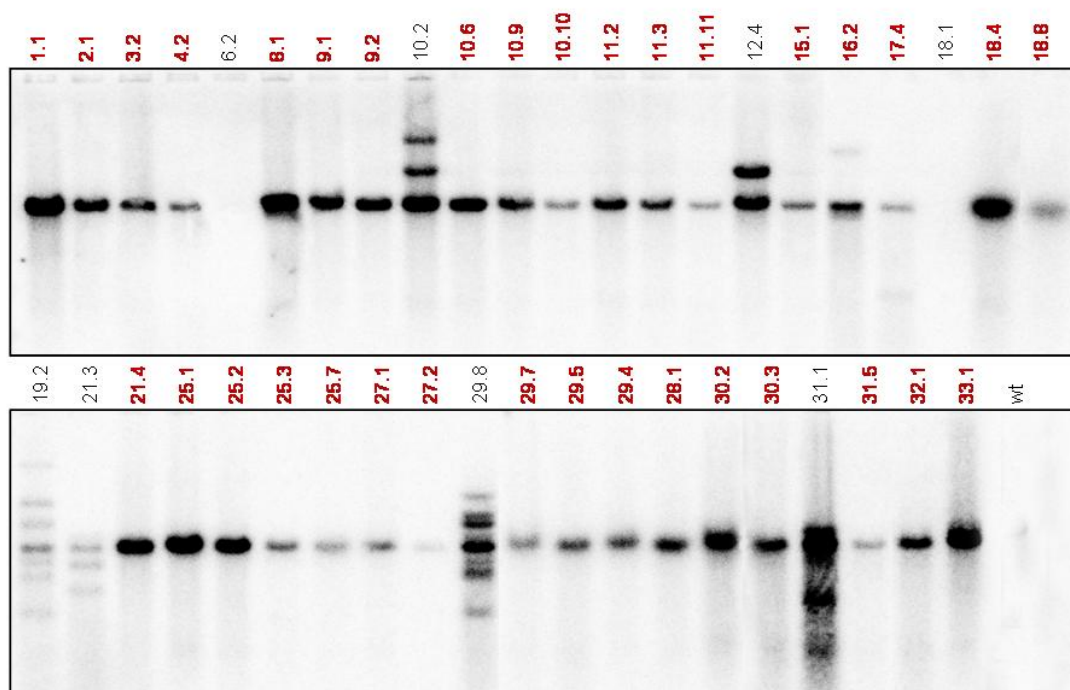
**Figura 39. Anàlisi del nombre d'integracions en les línies transgèniques gZ-GUS. Southern Blot** realitzat amb l'enzim de restricció *HindIII* (diana única dins el T-DNA) i la sonda del gen de resistència a la higromicina (*hpt*). En vermell es resalten les línies que mostraven una única banda tant en aquesta hibridació com amb la sonda GUS.



**Figura 40.** Anàlisi del nombre d'integracions en les línies transgèniques gZ-GUS. *Southern Blot* realitzat amb l'enzim de restricció *HindIII* (diana única dins el T-DNA) i la sonda del gen GUS (*gusA*). En vermell es resalten les línies que mostraven una única banda tant en aquesta hibridació com amb la sonda del gen de resistència *hpt*.

## Resultats

Partint de les línies seleccionades (excepte 3.1 i 25.4, perdudes per contaminació) es va realitzar un cribratge addicional consistent en determinar la integritat del cassette d'expressió. Amb aquesta finalitat, es va dissenyar un experiment de *Southern Blot* en el qual el DNA genòmic era digerit amb dos enzims de restricció (*HindIII* i *BstEII*) que tallen en els extrems del cassette d'expressió. D'aquesta manera, observant l'altura de la banda obtinguda en una hibridació amb la sonda *gusA*, es va poder comprovar si el cassette d'expressió estava íntegre (Fig. 41). El resultat va ser que 34 línies gZ-GUS monocòpia, el 80% de les analitzades, mostraven la longitud correcta de cassette. Les línies amb altres patrons de bandes es van descartar per a l'estudi d'expressió del promotor, ja que no es podia assegurar que una manca d'expressió es degués a la falta d'activitat del promotor i no a una anomalia en la seva seqüència.



**Figura 41. Anàlisi de l'integritat del cassette d'expressió gZ-GUS.** *Southern Blot* de les línies monocòpia amb la sonda del gen GUS. La digestió realitzada (*HindIII* i *BstEII*) talla en els dos extrems del cassette d'expressió. En vermell s'han indicat les línies seleccionades per a l'estudi de l'activitat del promotor.

Les plantes  $F_0$  crescudes en condicions *in vitro*, es van aclimatar a hivernacle i es van fer créixer fins a floració. En aquest procés es van perdre les línies 11.3, 25.7, 29.8 i 32.1, quedant-ne 30 per a l'estudi de l'activitat del promotor. Encara que un dels objectius era l'anàlisi de l'activitat de gammaZ a diferents estadis de desenvolupament del gra, es van deixar madurar les llavors per assegurar la continuïtat de les línies transgèniques.

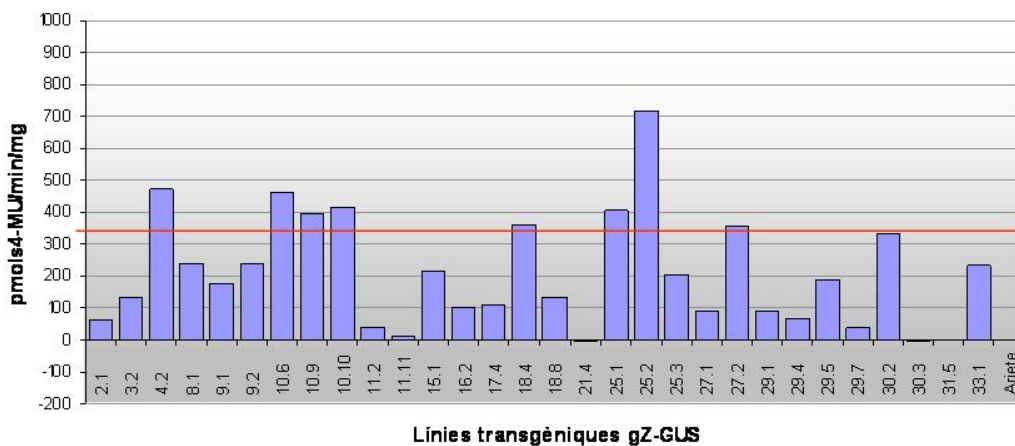
Com a resultat d'aquests cribatges podem assegurar que en aquestes plantes l'acumulació de GUS era deguda a l'activitat d'una còpia del promotor gammaZ. A més, s'havien eliminat de l'estudi línies que no haguessin donat activitat degut a integracions anòmales del T-DNA.



## 1.2. El promotor gammaZ és actiu en el desenvolupament del gra d'arròs

La primera aproximació per quantificar l'expressió del promotor gammaZ en gra d'arròs va consistir en l'anàlisi de l'activitat GUS per fluorimetria en grans madurs de les plantes  $F_0$ . En aquest experiment es van utilitzar exclusivament les 30 línies transgèniques seleccionades per *Southern Blot* en l'apartat anterior. Cal tenir en compte que en les plantes  $F_0$ , al ser autofecundades, es produeix la segregació del transgèn en les llavors. Per tant, en els grans d'arròs analitzats el transgèn podia estar en homozigosi, hemizigosi o no estar present, seguint les proporcions 1:2:1 respectivament. Per minimitzar les variacions d'expressió provocades per aquesta segregació va ser necessari analitzar conjuntament 10 llavors  $F_0$  de cada línia transgènica.

A la figura 42 es mostra l'activitat GUS en gra madur expressada en pmols de 4-MU/min/mg de les 30 línies transgèniques. Com es pot observar, existeix una variació en l'activitat de la proteïna marcador en les diferents línies, essent la 25.2 la que més activitat GUS presentava (716 pmols4-MU/min/mg). Tanmateix, el que crida més l'atenció és la baixa activitat general en totes les línies, amb una mitjana d'activitat de 186 pmols4-MU/min/mg.

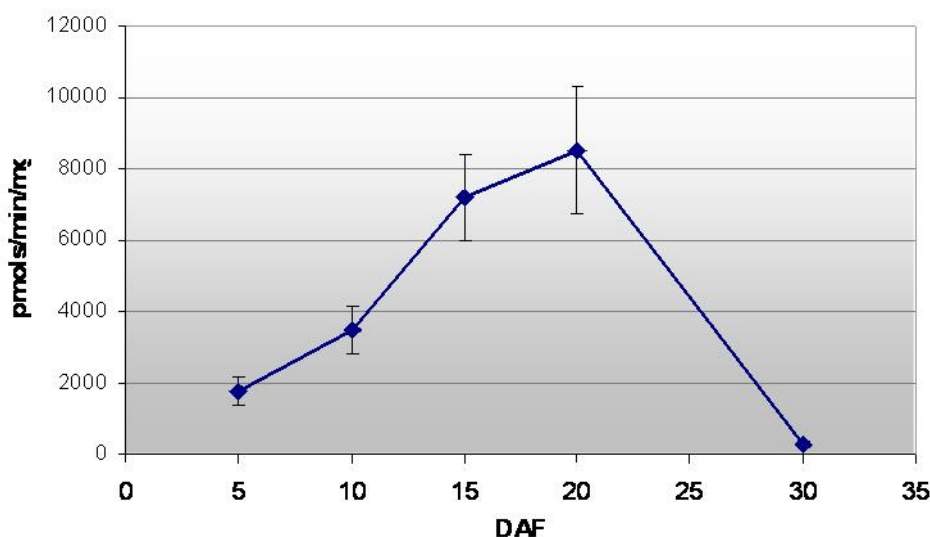


**Figura 42. Activitat GUS en grans madurs de línies transgèniques gZ-GUS.** Els valors de cada línia corresponen a l'anàlisi de 10 grans madurs produïts per plantes  $F_0$ . En vermell es mostra el criteri de selecció de línies aplicat per a realitzar l'estudi d'activitat del promotor durant el desenvolupament del gra.

En altres estudis d'activitat de promotors específics de gra en arròs transgènic s'ha descrit que la proteïna GUS no és estable durant el desenvolupament del gra (Pai-Hsiang i col., 2001), fet que provoca una dràstica disminució de la seva activitat en grans madurs. Per tant, la baixa activitat GUS en gra madur pot no reflectir el nivell d'expressió del promotor gammaZ. Conseqüentment, es va decidir analitzar l'activitat durant el desenvolupament per avaluar l'activitat transcripcional del promotor en gra

d'arròs. Si assumim que la degradació de GUS és igual en totes les línies, el nivell d'expressió de cada línia és proporcional a l'activitat GUS en gra madur. Partint d'aquesta base es van seleccionar les 8 línies amb major contingut de GUS en gra madur per realitzar l'estudi d'activitat del promotor gammaZ durant el desenvolupament (Fig.42). Així doncs, llavors F<sub>1</sub> de les línies seleccionades es van fer germinar en presència de l'antibiòtic higromicina per assegurar la presència del transgèn i es van fer créixer en condicions d'hivernacle. En el moment de floració es va etiquetar cada panícula amb el dia de floració (DAF) i es van recollir mostres de grans de 5, 10, 15, 20 i 30 DAF.

A l'analitzar per fluorimetria l'activitat GUS durant el desenvolupament es va poder observar que les 8 línies analitzades presentaven un patró temporal d'expressió similar. La gràfica de la figura 43 mostra la mitjana d'activitat de les línies a diferents DAF. Es pot veure que l'activitat GUS augmenta ràpidament fins als 15 DAF, assolint el seu màxim als 20 DAF. A partir d'aquest moment l'activitat GUS decau degut a la manca d'expressió i a la degradació de la proteïna durant la maduració del gra. La mitjana de l'activitat GUS a 20 DAF va resultar ser de 9434 pmols4-MU/min/mg, essent la línia 25.2 la que més expressió del promotor mostrava (12710 pmols4-MU/min/mg). Aquest patró temporal d'expressió encaixa amb l'activitat del promotor gammaZ en blat de moro, on el màxim d'expressió se situa en els 15 DAF (Pérez-Grau i col., 1986).

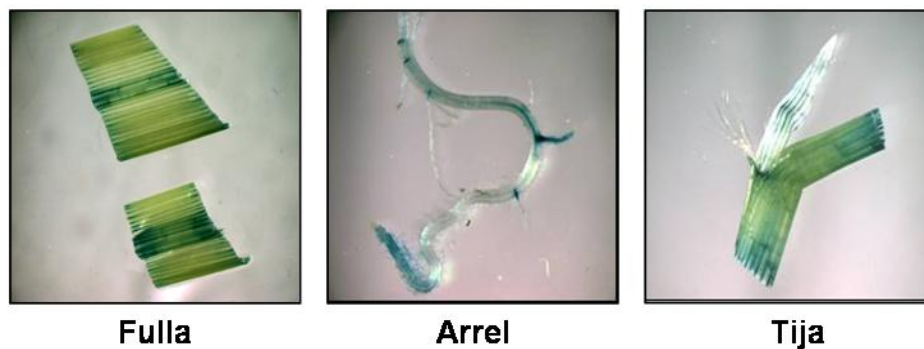


**Figura 43. Activitat del promotor gammaZ durant el desenvolupament del gra d'arròs.** Mitjana de l'activitat GUS de 8 línies transgèniques mesurada a 5, 10, 15, 20 i 30 dies després de la floració (DAF). Les barres d'error representen la desviació estàndard. Valors expressats en pmols 4-MU/min/mg.

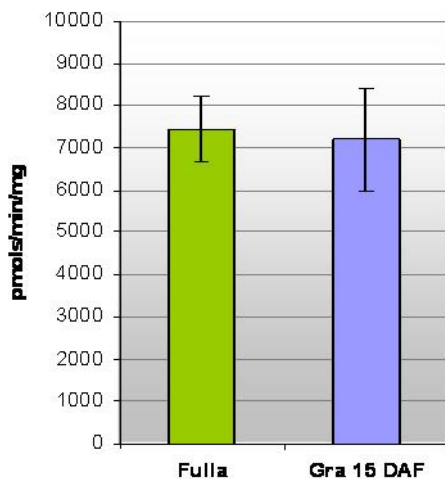
Així doncs, amb aquests resultats podem afirmar que el promotor gammaZ és actiu a grans d'arròs i que presenta un patró d'expressió similar al de blat de moro. Malgrat tot, el grau d'expressió no es remarcable si es compara amb altres promotors de cereals testats a arròs (Qu i col., 2004).

### 1.3. El promotor gammaZ no és específic de gra en arròs

Per avaluar si el promotor gammaZ és un bon candidat per dirigir l'expressió del T-20 en grans d'arròs, ens interessava determinar si gammaZ és específic de gra, o si pel contrari també s'expressa en altres teixits. Per respondre aquesta pregunta es va realitzar una tinció histològica de GUS en diferents teixits de plantes F<sub>0</sub>. Com es pot veure a la figura 44, es va observar el producte fruit de l'activitat GUS en tija, fulla i arrel. El grau d'expressió semblava ser bastant fort, especialment en els vasos conductors.



**Figura 44. Expressió de gammaZ en teixits vegetatius d'arròs.** Tinció histoquímica de GUS en fulla, tija i arrel d'una planta F<sub>0</sub> representativa (gZ-GUS 10.9). Com es pot apreciar, l'expressió se centra en els vasos conductors. També s'observa en l'àpex de l'arrel i en arrels secundàries.



**Figura 45. Comparació de l'activitat del promotor gammaZ en fulla i gra d'arròs.**

Mitjana de l'activitat GUS en fulla i gra immadur (15 DAF) de 8 línies transgèniques. Les barres representen la desviació estàndard.

També es va determinar l'activitat GUS en fulla amb la finalitat de compararla amb la del gra en desenvolupament. Per a aquest estudi es van analitzar fulles de les mateixes 8 línies utilitzades per a determinar l'activitat en gra. Els resultats representats en la figura 45 mostren que l'activitat de gammaZ a fulla i gra de 15 DAF són molt similars, confirmant-nos que el promotor gammaZ no és específic de llavor en arròs.



Amb els resultats obtinguts es va decidir descartar el promotor gammaZ per a l'expressió específica de la proteïna de fusió Rx3-T20 en gra d'arròs. Encara que gammaZ es actiu en gra, la seva manca d'especificitat de teixit fa que no proporcioni cap avantatge respecte a un promotor constituït tipus 35S. Cal dir que aquest resultat és força sorprenent, ja que els promotors de les glutenines d'arròs presenten elements reguladors en *cis* comuns al promotor de gammaZ (motius AACA, ACGT i GCN4; Washida i col., 1999; Takaiwa i col., 1996).

## **2. Acumulació de T-20 en grans d'arròs**

L'objectiu final d'aquesta part de la tesi era aconseguir una acumulació del fàrmac T-20 en grans d'arròs. Degut a la manca d'especificitat que ha mostrat el promotor gammaZ en plantes transgèniques d'arròs, per expressar T-20 específicament en gra, es va escollir un promotor endògen i específic d'endosperma: el promotor RP5.

El promotor RP5 dirigeix l'expressió de la prolamina de 13 kD en l'endosperma d'arròs durant el desenvolupament del gra. Estudis previs havien demostrat que la seqüència -1075 a -1 respecte a l'inici de transcripció era suficient per provocar l'expressió específica de la proteïna marcador GUS a l'endosperma de plantes transformades d'arròs (Pai-Hsiang i col., 2001). Degut als alts nivells d'expressió aconseguits en gra d'arròs (63855 pmols4-MU/min/mg de mitjana), els autors suggerien que aquest promotor podria ser útil per a la producció de proteïnes recombinants en l'endosperma d'arròs. Per aquest motiu es va decidir clonar i utilitzar aquest promotor per a acumular el T-20 específicament en gra d'arròs. També es va expressar T-20 sota el promotor constitutiu CaMV 35S. D'aquesta manera es van poder comparar els resultats obtinguts amb una expressió específica i una constitutiva.

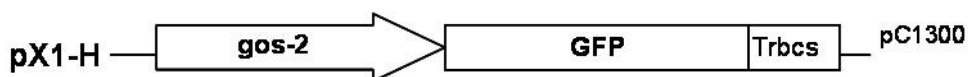
L'estratègia emprada per aconseguir nivells alts d'acumulació de T-20 va ser la mateixa que en tabac: la fusió del fàrmac a dominis de  $\gamma$ -zeïna per provocar una retenció al RE. Degut a que Rx3-T20 ha estat la fusió que s'ha acumulat més eficientment en tabac, es va decidir utilitzar-la per a acumular el T-20 en gra d'arròs. Cal tenir en compte, que l'entorn on s'expressa Rx3-T20 és totalment diferent en tabac i arròs. Mentre que en tabac Rx3-T20 s'expressava en un teixit vegetatiu no preparat per a l'acumulació de proteïnes, en arròs la fusió s'expressarà en un teixit de reserva especialitzat i capaç de generar cossos proteics de forma natural.

### **2.1. Obtenció i cribratge de les línies transgèniques d'arròs**

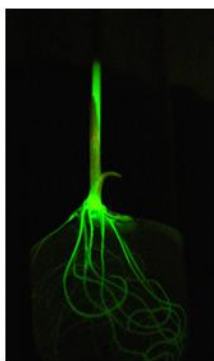
#### **2.1.1. Posta a punt de la transformació d'arròs**

A l'iniciar aquest treball la transformació estable d'arròs era una metodologia no establerta en el centre d'investigació on s'ha realitzat aquesta tesi (IBMB-CSIC). Per tant, el primer pas va consistir en posar a punt un sistema de transformació i adequar-lo a les instal·lacions existents. A més, es va voler utilitzar la varietat autòctona d'arròs Sènia, fet que va comportar un ajust addicional del protocol de transformació. En aquest procés va ser especialment important la col·laboració dels grups de genètica vegetal del CIRAD (Montpellier) i de l'IRTA (Cabrils), els quals van aportar la seva àmplia experiència en la transformació d'arròs. El protocol resultant, detallat a Materials i Mètodes (apartat B.2.3.3.), es va generar aplicant diverses modificacions a partir de la metodologia descrita per Hiei i col·laboradors (1997).

Amb la finalitat d'accelerar el procés d'optimització del protocol, en les primeres transformacions prova es va utilitzar una construcció (Fig.46) en la qual la proteïna marcadora GFP era expressada sota el promotor constitutiu del gen *gos-2* d'arròs (de Pater i col.1992). Això ens va permetre avaluar l'eficiència de transformació en els estadis de call i plàntula visualitzant la presència de GFP amb llum ultraviolada (Fig.47). D'aquesta manera no va ser necessari obtenir plantes adultes per a l'anàlisi de la transgènia.



**Figura 46. Construcció plasmídica emprada per a la posta a punt de la transformació d'arròs.** En aquesta construcció la proteïna marcadora GFP és expressada sota la regió 5' del gen *gos-2* d'arròs i amb el senyal de poliadenilació de la subunitat petita de la rubisco (*Trbcs*)

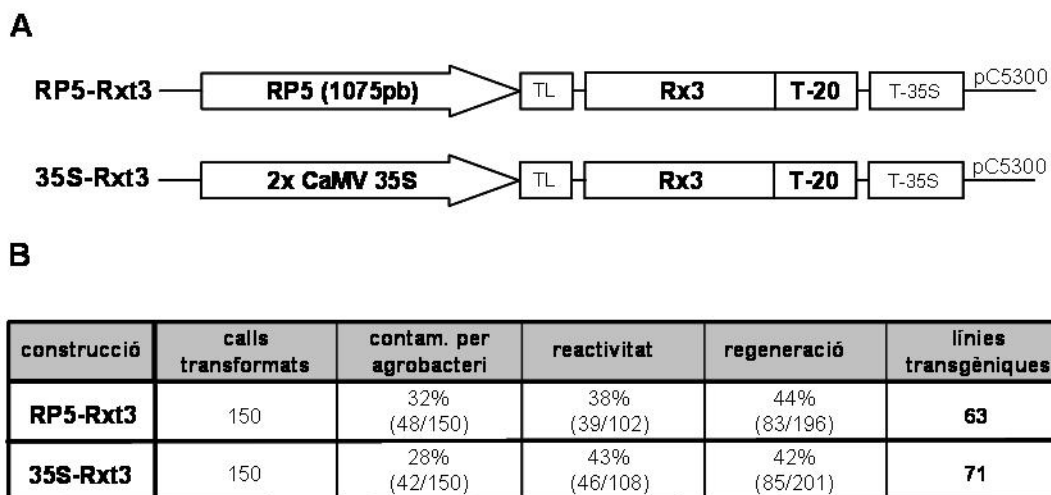


**Figura 47. Visualització de GFP en plantes d'arròs transgènica.** Per a la posta a punt del sistema de transformació s'utilitza l'expressió constitutiva de la proteïna marcadora GFP. D'aquesta manera es va poder analitzar de forma simple l'eficiència de transformació il·luminant les plàntules amb llum ultraviolada.

### 2.1.2. Obtenció de les línies transgèniques d'arròs

La proteïna de fusió Rx3-T20 es va clonar en un vector binari pCambia5300 sota el promotor específic RP5 i el promotor constitutiu 2xCaMV35S (Fig.48A). Amb aquestes construccions es van transformar via *Agrobacterium thumefaciens* (EHA105) plantes d'arròs de la varietat japònica Sènia amb el protocol optimitzat anteriorment. A la figura 49B es mostren les dades referents al procés de transformació. Com a resultat final s'obtingueren 63 línies transgèniques RP5-Rxt3 i 71 línies 35S-Rxt3 resistents a l'antibiòtic de selecció en plantes higromicina. Cap d'aquestes línies presentava fenotip degut a l'expressió de la proteïna recombinant.

Les plantes  $F_0$  es van aclimatar a hivernacle i es van cultivar en condicions controlades fins a floració. Aproximadament un 70% de les línies van produir llavor que es va recollir per analitzar la presència de Rx3-T20. També es van recollir mostres de fulla de cadascuna d'elles per portar a terme els experiments de *Southern Blot*.



**Figura 48. Transformació estable d'arròs amb RP5-Rxt3 i 35S-Rxt3.**

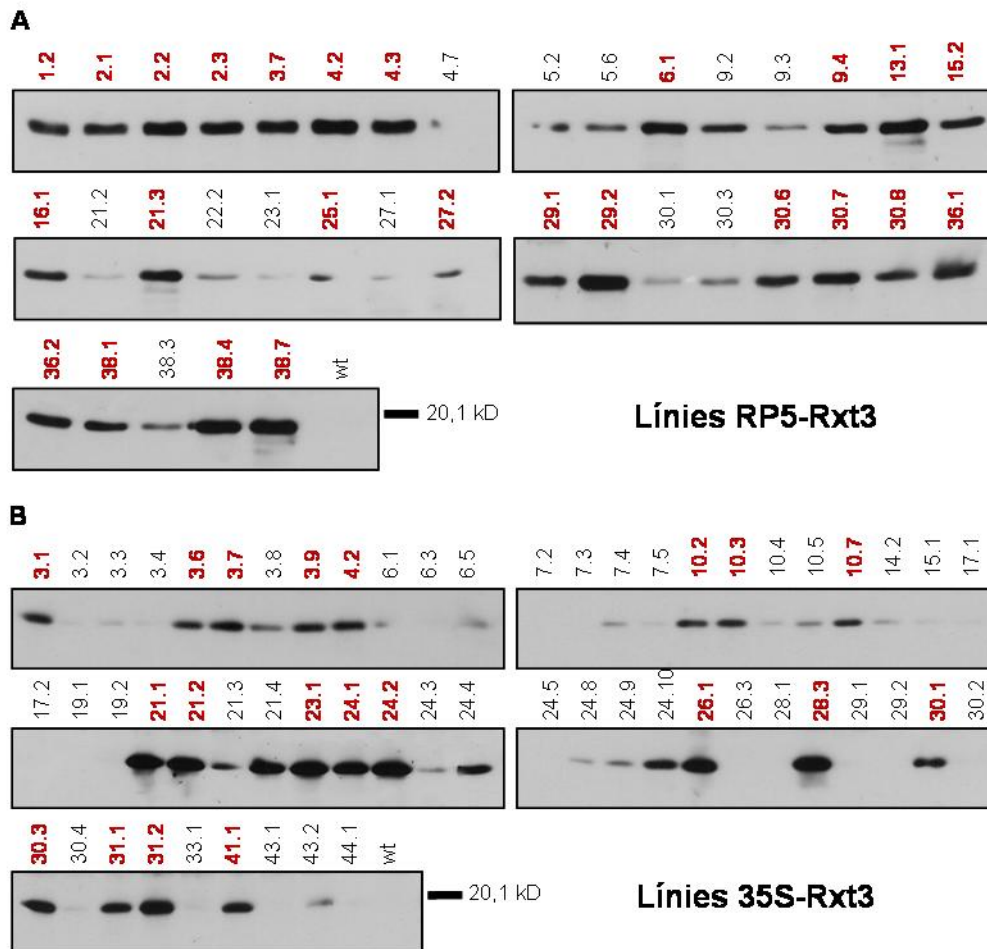
(A) Construccions plasmídiques utilitzades en la transformació d'arròs. TL: seqüència 5'-UTR de *tobacco etch virus*; T-35S: terminador CaMV 35S.

(B) Dades de la transformació de calls embriogènics amb *Agrobacterium thumefaciens*. Es mostra el nombre de calls transformats, les pèrdues provocades per un creixement excessiu de l'agrobacteri, el percentatge de calls amb nòduls transgènics, el tant per cent de regeneració a partir de calls regenerats i el nombre final de línies transgèniques obtingudes.

### 2.1.3. Cribratge de les línies transgèniques per acumulació de Rx3-T20 en gra madur

Les línies transgèniques regenerades, RP5-Rxt3 i 35S-Rxt3, es van analitzar per *Western Blot* per tal de seleccionar aquelles que presentessin els nivells més elevats d'acumulació de la proteïna de fusió Rx3-T20 en gra madur. Com a material de partida es van utilitzar 10 grams de cada planta F<sub>0</sub> amb l'objectiu de minimitzar les variacions produïdes per la segregació del transgèn en les llavors. La mateixa quantitat de proteïna total (30 µg) es va resoldre en gels SDS-PAGE que es van processar en paral·lel i es van analitzar per *Western Blot* amb l'anticòs contra la γ-zeïna (αG2). Cal remarcar que prèviament s'havia comprovat que la fusió Rx3-T20 presentava les mateixes característiques de solubilitat que en tabac, extraient-se en un tampó aquós amb presència d'agent reductor (TrisHCl pH8 50mM, β-ME 2%).

Tant en línies RP5-Rxt3 com en línies 35S-Rxt3 es va poder detectar la proteïna de fusió Rx3-T20 a partir d'extractes proteics de gra madur (Fig.49). Rx3-T20 presentava un pes molecular experimental de 17 kD, 2 kD superior al teòric, i es podia detectar tant amb l'anticòs de γ-zeïna (αG2) com amb el del T-20 (αT20). Encara que ambdós grups de línies acumulaven la proteïna de fusió, es va notar que els nivells d'expressió eren més variables en les línies 35S-Rxt3 que en RP5-Rxt3. Com a resultat d'aquest cribratge es van seleccionar aquelles línies en què l'acumulació de Rx3-T20 era més elevada.



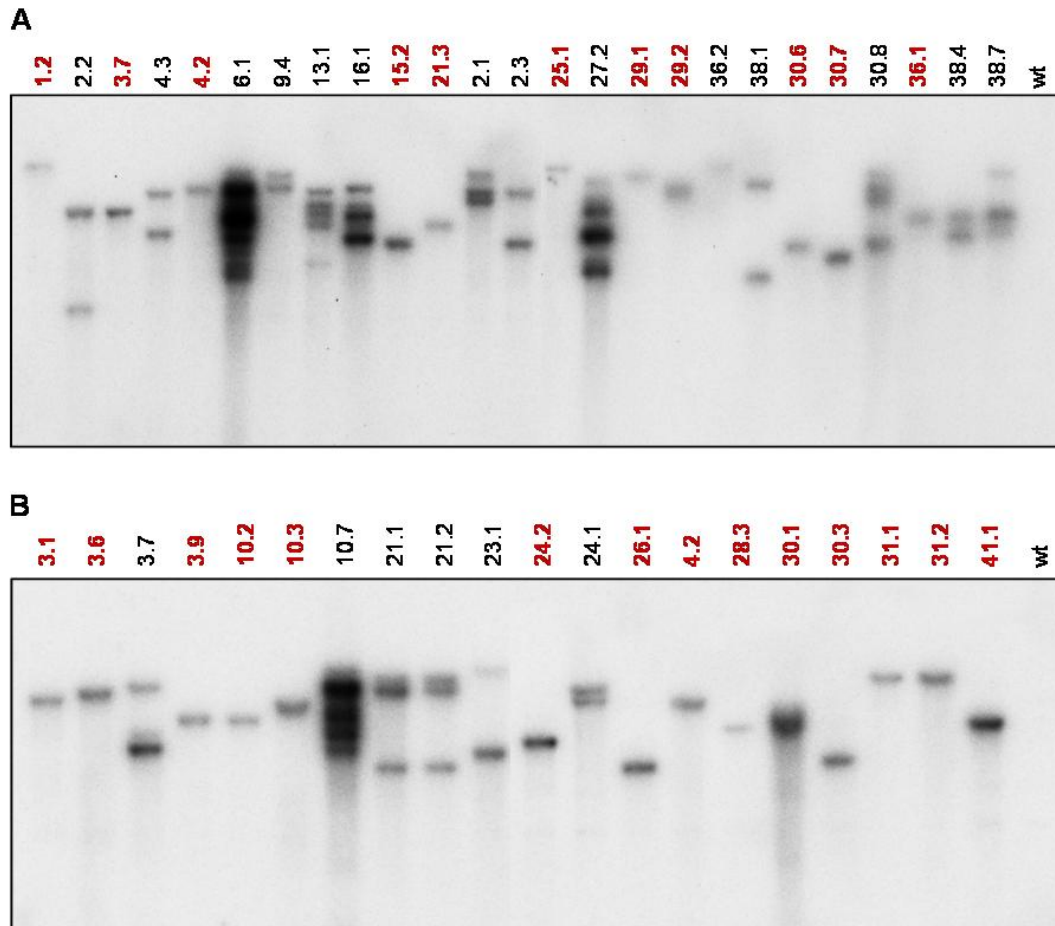
**Figura 49. Cribratge de les línies transgèniques per acumulació de proteïna Rx3-T20. Western Blot realitzat a partir de 30 µg de proteïna total extreta de fulla de les línies RP5-Rxt3 (A) i 35S-Rxt3 (B). Immunodetecció amb anticòs αG2. En vermell es destaquen les línies seleccionades.**

#### 2.1.4. Cribratge de les línies transgèniques per nombre d'insercions del transgèn

Per tal de facilitar l'obtenció de línies estables en què el transgèn estigui en homozigosi interessa seleccionar aquelles en les quals s'ha produït una única integració del T-DNA. Per aquest motiu es van cribrellar per *Southern Blot* les línies seleccionades en l'apartat anterior. DNA genòmic extret de fulles de les plantes F<sub>0</sub> es va digerir amb l'enzim de restricció *EcoRI* que tallava en un únic lloc el T-DNA recombinant. La hibridació es va realitzar amb una sonda contra el gen de resistència en plantes (*hpt*), ja que la sonda de la regió codificant (Rx3-T20) produïa hibridacions no específiques.

En la figura 50 es mostren els patrons de bandes obtinguts en les línies RP5-Rxt3 i 35S-Rxt3 analitzades. Aquelles que presentaven una única banda en la hibridació (marcades en vermell) es van considerar monocòpia i es van seleccionar per l'obtenció de la següent generació. Totes les línies amb major nombre d'insercions o

amb les quals el resultat no era clar es van descartar. Així, després d'aquest cribratge s'havien identificat 11 línies RP5-Rxt3 i 14 línies 35S-Rxt3 en les quals els alts nivells d'acumulació de la proteïna de fusió Rx3-T20 detectats per *Western Blot* eren conseqüència d'una única integració del transgèn.

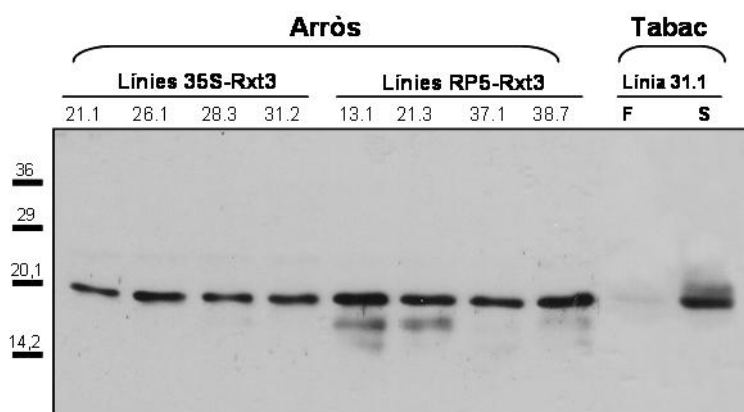


**Figura 50. Cribratge de les línies transgèniques per nombre d'integracions de T-DNA. Southern Blot** realitzat a partir de la digestió amb *EcoRI* de DNA genòmic de les línies transgèniques RP5-Rxt3 (A) i 35S-Rxt3 (B). Hibridacions fetes amb una sonda contra el gen de resistència en plantes (*hpt*). En vermell es destaquen les línies monocòpia.

## 2.2. Rx3-T20 s'acumula de forma eficient en grans d'arròs

En l'anàlisi per *Western Blot* de les línies transgèniques ja s'havia pogut apreciar que la fusió Rx3-T20 s'acumulava de forma notable en grans d'arròs. Tot i això, es va voler comparar els nivells d'acumulació de Rx3-T20 generats pel promotor constitutiu 35S i el promotor específic de gra RP5. Amb aquest objectiu es va analitzar en paral·lel per *Western Blot* la mateixa quantitat de proteïna total (10µg) de grans madurs de quatre línies 35S-Rxt3 i RP5-Rxt3 amb nivells alts d'acumulació. Com es pot observar a la figura 51, els promotors 35S i RP5 proporcionen una acumulació de Rx3-T20 similar, essent sensiblement superior amb el promotor específic. Per tant, encara que el promotor RP5 permet limitar l'expressió en gra, no aporta cap avantatge pel que fa a acumulació de proteïna respecte al promotor constitutiu 35S.

Per tal de comparar la capacitat d'acumulació dels grans d'arròs amb la de les fulles de tabac, també es va analitzar en paral·lel la mateixa quantitat de proteïna total extreta de fulles fresques i seques de la línia transgènica màxima expressora de tabac (Rxt3.31). El resultat obtingut (Fig.51) mostra que en gra d'arròs s'aconsegueix un nivell d'acumulació de Rx3-T20 molt superior a l'obtingut en fulla fresca de tabac i comparable amb el d'acumulació en fulla seca. Per tant, si no tenim en compte el fenomen que té lloc en l'assecat de les fulles de la línia Rxt3.31 de tabac, podem concloure que l'expressió en gra d'arròs permet un major acumulació de Rx3-T20 que en fulles de tabac.



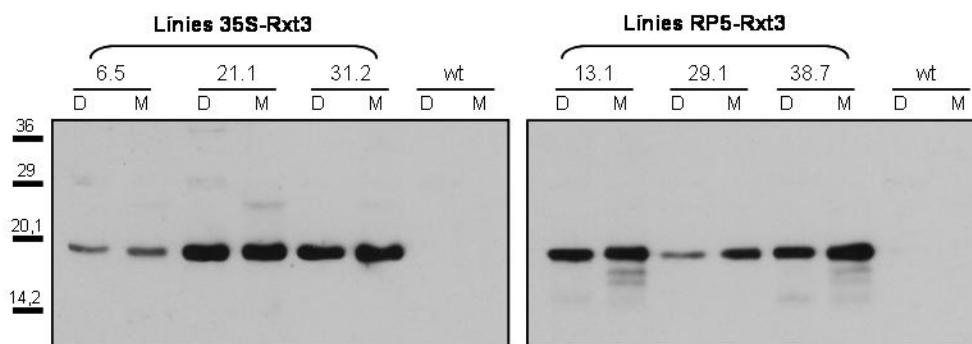
**Figura 51. Acumulació de Rx3-T20 en les línies transgèniques d'arròs i tabac.** *Western Blot* (αG2) de grans madurs de les 4 línies 35S-Rxt3 i RP5-Rxt3 amb nivells màxims d'expressió. Per comparar l'acumulació també s'han analitzat extractes de fulla fresca (F) i seca (S) de la línia transgènica de tabac 31.1. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

### 2.2.1. Rx3-T20 és estable durant el desenvolupament del gra

L'expressió en llavors de cereals proporciona un ambient favorable per a l'estabilitat de la proteïna recombinant (Stoger i col., 2005). Tot i així, com s'ha demostrat en el primer apartat d'aquest capítol, existeixen proteïnes com GUS que són degradades durant el desenvolupament del gra.

En el cas de Rx3-T20, el fet que es poguessin detectar nivells alts de la proteïna de fusió en gra madur, ja ens suggeria que aquesta proteïna era estable en gra. Per comprovar-ho es van recollir grans en desenvolupament (15 DAF) de les plantes  $F_0$  i es van analitzar per *Western Blot* conjuntament amb grans madurs. En aquest experiment es van utilitzar tres línies transgèniques de cada transformació (35S-Rxt3 i RP5-Rxt3) amb nivells variables d'expressió. D'aquesta manera es pretenia avaluar l'estabilitat de Rx3-T20 independentment del seu grau d'acumulació. El resultat de l'immunodetecció (Fig.52) revela que l'acumulació de Rx3-T20 en gra madur és similar a la de gra de 15 DAF en totes les línies, indicant que la proteïna de fusió és estable durant el desenvolupament del gra, independentment del seu grau d'acumulació. Tot i així, no podem descartar que es produeixi una certa degradació de Rx3-T20, ja que en alguns casos és possible detectar bandes de baix pes molecular que podrien correspondre a fragments de proteïna de fusió.

Si comparem els resultats obtinguts amb els dos grups de línies transgèniques, es poden apreciar certes diferències. En les línies RP5-Rxt3 s'observa un lleuger increment de proteïna recombinant després del dia 15 DAF, mentre que en les línies 35S-Rxt3 l'acumulació en gra immadur i madur és pràcticament idèntica. Aquesta diferència pot ser deguda a que el promotor RP5 és actiu en l'endosperma d'arròs fins als 20 DAF (Pai-Hsiang i col., 2001), mentre que el promotor 35S deu aturar l'expressió abans dels 15 DAF.



**Figura 52. Estabilitat Rx3-T20 durant el desenvolupament del gra en les línies 35S-Rxt3 i RP5-Rxt3. *Western Blot* ( $\alpha$ G2) de grans en desenvolupament (D) de 15 DAF i grans madurs (M) de 3 línies transgèniques de cada transformació. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.**

Posteriorment s'ha pogut comprovar que després de guardar durant mesos grans d'arròs transgènic a temperatura ambient no s'observa una disminució en el contingut de proteïna de fusió (no mostrat). Conseqüentment es pot concloure que

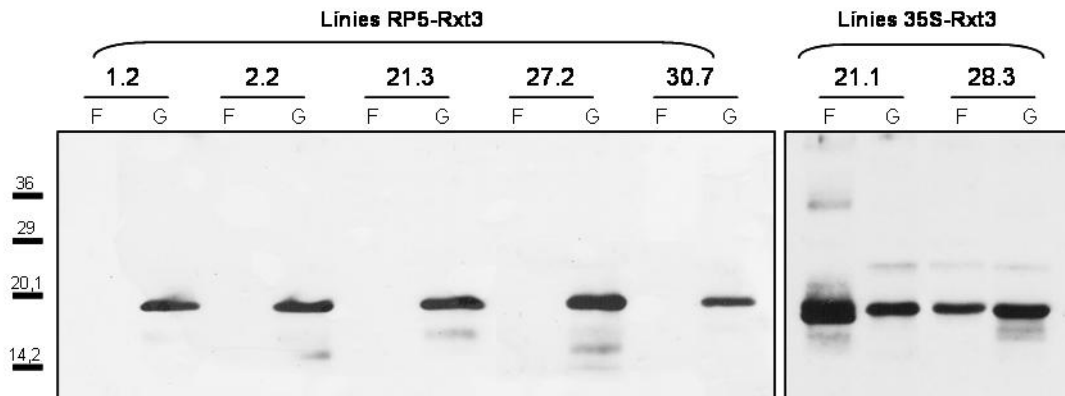


l'expressió de la proteïna de fusió Rx3-T20 permet un llarg emmagatzematge del T-20 dins el gra d'arròs.

### 2.2.2. El promotor RP5 proporciona una expressió específica en gra

L'especificitat d'endosperma del promotor RP5 en plantes transgèniques d'arròs ja havia estat descrita anteriorment per Pai-Hsiang i col. (2001). Tanmateix, es va voler comprovar que en les línies RP5-Rxt3 la proteïna de fusió no s'expressava en fulla.

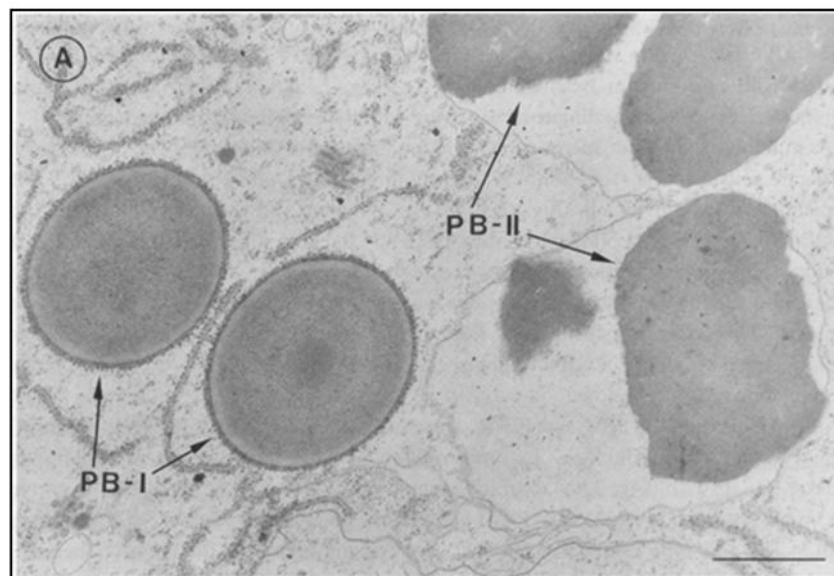
Extractes proteics de fulla i gra madur de 5 línies transgèniques RP5-Rxt3 es van analitzar per *Western Blot* amb l'anticòs  $\alpha$ G2 (Fig.53). En totes les línies analitzades es va detectar la proteïna Rx3-T20 en gra, però en cap cas es va detectar en fulla. D'altra banda, a l'analitzar plantes que expressaven Rx3-T20 sota el promotor constituïu 35S, sí que es va detectar la proteïna de fusió en extractes de fulles, encara que en general la seva acumulació era inferior que en gra. Tanmateix, algunes línies (21.1 i 28.3) van mostrar una alta acumulació de Rx3-T20 en fulla que era fins i tot comparable amb la de gra (Fig.53). Aquests resultats corroboren l'especificitat de llavor del promotor RP5, afirmant-lo com un bon candidat per a l'expressió específica de proteïnes recombinants en l'endosperma d'arròs.



**Figura 53. Especificitat de gra del promotor RP5.** *Western Blot* ( $\alpha$ G2) de fulla i gra madur de 5 línies transgèniques RP5-Rxt3. Com a control d'expressió constitutiva s'han inclòs dues línies 35S-Rxt3. En tots els casos s'ha analitzat la mateixa quantitat de proteïna total en gra i en fulla. Valors de pesos moleculars del marcador expressats en kD.

### 2.3. Localització subcel·lular de Rx3-T20 en l'endosperma

A diferència d'altres cereals, les proteïnes de reserva d'arròs es troben formant part de dos poblacions diferents de cossos proteics (CP). Les prolamines s'acumulen en CP de tipus I originats a partir del reticle endoplàsmic (RE), mentre que les glutelins formen CP de tipus II que tenen origen vacuolar (Yamagata i Tanaka, 1986; Krishnan i col., 1986). A més, Okita i col·laboradors han demostrat que aquests dos grups de proteïnes de reserva són sintetitzades en diferents subdominis del RE. Els transcrits de prolamines són direccionats a la regió cortical del RE rugós on té lloc la formació de CP-I, mentre que els mRNAs de les glutelins són direccionats a les membranes de les cisternes del RE (Choi i col., 2000). Aquesta síntesi localitzada sembla tenir explicació en la seqüència de la regió 3' no codificant dels transcrits d'aquestes proteïnes. Hamada i col. (2003) van demostrar mitjançant estudis de delecció de mRNA de prolamines que per a la formació de CP-I són necessaris dos elements en *cis*, anomenats *zip codes*, situats en la regió 3' no codificant. Sense aquestes seqüències els transcrits són transportats per defecte a les cisternes del RE.



**Figura 54. Cossos proteics en l'endosperma d'arròs.** Imatge de microscòpia electrònica de transmissió (Takemoto i col., 1996). Els CP-I es poden distingir per la seva forma esfèrica i la presència d'anells en el seu interior.

En el nostre cas, la predicció del direccionament de la proteïna de fusió Rx3-T20 en l'endosperma d'arròs es feia difícil, ja que d'una banda conté una seqüència d'una prolamina de blat de moro ( $\gamma$ -zeïna) però de l'altra els seus transcrits no presenten els senyals *zip code* de les prolamines d'arròs. Per desvetllar aquesta incògnita s'han realitzat dos tipus d'estudis de localització subcel·lular. En primer lloc s'han portat a terme experiments de fraccionament mitjançant gradients de sacarosa

per determinar si la fusió Rx3-T20 s'acumula en estructures denses tipus CP o en altres fraccions. A continuació, i com a conseqüència dels resultats obtinguts, s'han realitzat estudis d'immunolocalització al microscopi electrònic amb la finalitat de determinar exactament en quin compartiment cel·lular s'acumula la proteïna de fusió.

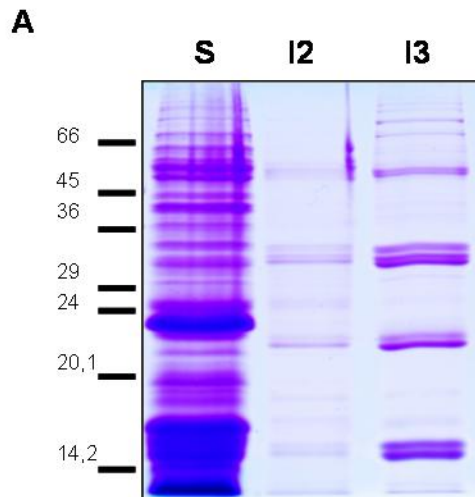
### 2.3.1. Experiments de fraccionament subcel·lular

Com s'ha mostrat anteriorment en plantes de tabac, l'anàlisi per *Western Blot* de les fraccions obtingudes mitjançant gradients de densitat ens pot donar una idea de en quin compartiment cel·lular es localitza una determinada proteïna. En aquests experiments s'ha fet servir el mateix gradient que l'utilitzat en el fraccionament subcel·lular de fulles de tabac, format per solucions del 10, 20, 30, 50 i 70% (p/v) en sacarosa. Recordem que en aquest gradient els CP de blat de moro sedimenten en la interfase entre 50 i 70% (I2), mentre que el RE vegetal es troba en la interfase entre 30 i 50% (I3).

En primer lloc es va voler determinar en quina fracció cel·lular es localitzaven els diferents tipus de CP d'arròs. Amb aquest objectiu es va resoldre un homogenat de grans madurs d'arròs de la varietat Sènia amb el gradient descrit i es va analitzar una mostra de cada fracció per SDS-PAGE. Com es pot apreciar en una tinció amb blau de Coomassie (Fig.55A), les proteïnes de reserva d'arròs, tant glutelines com prolamines, es troben majoritàriament en la interfase entre 50 i 70% (p/v) de sacarosa (I2). Vam poder comprovar doncs que els CP d'arròs tenien una densitat semblant als CP de blat de moro, ja que sedimentaven en la mateixa fracció cel·lular. A més, aquest resultat ens indicava que amb el gradient utilitzat no era possible separar els CP de tipus I i II degut a la seva semblança de densitats.

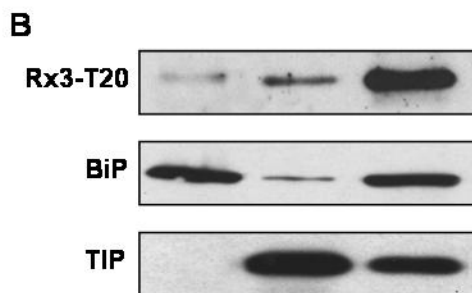
Per determinar en quina fracció cel·lular s'acumulava la proteïna de fusió Rx3-T20, es van analitzar homogenats de gra madur de la línia transgènica RP5-Rxt3 9.4. Per *Western Blot*, amb l'anticòs  $\alpha$ G2, es va poder detectar Rx3-T20 majoritàriament en la mateixa fracció on sedimentaven els CP d'arròs, entre 50 i 70% (p/v) de sacarosa (Fig.55B). Aquest resultat ens mostrava que Rx3-T20 s'acumula en grans d'arròs en un compartiment cel·lular dens, però no ens indicava si es tractava de CP.

En la interfase I3 també es va detectar xaperona BiP de RE i la proteïna intrínseca de tonoplast  $\alpha$ -TIP, confirmant-nos que en aquesta fracció es localitzaven tant els CP derivats de reticle (CP-I) com els CP vacuolars (CP-II). Sorprenentment, la presència de BiP en la fracció corresponent a reticle era minsa mentre que sí que es detectava de forma abundant en la fracció soluble. Aquest fet, segurament s'explica amb la ruptura del RE durant la homogeneïtzació del teixit. D'altra banda,  $\alpha$ -TIP també es va localitzar en la fracció de RE i no en la fracció soluble com era d'esperar, ja que és una proteïna associada a membrana.



**Figura 55. Localització Rx3-T20 en CP mitjançant fraccionament subcel·lular.**

(A) Tinció amb blau de Coomassie de les fraccions obtingudes en un gradient de sacarosa a partir de gra madur d'arròs resoltes en un gel SDS-PAGE. S correspon al sobrenedant (fase 10 % (v/v) sacarosa), I2 correspon a la fracció enriquida en reticle endoplasmàtic (interfase 30-50 % v/v) i I3 correspon a la fracció on sedimenten els CP de blat de moro (interfase 50-70 % v/v). Com es pot apreciar, les proteïnes de reserva d'arròs que no s'han solubilitzats es localitzen majoritàriament en la fase corresponent a CP.

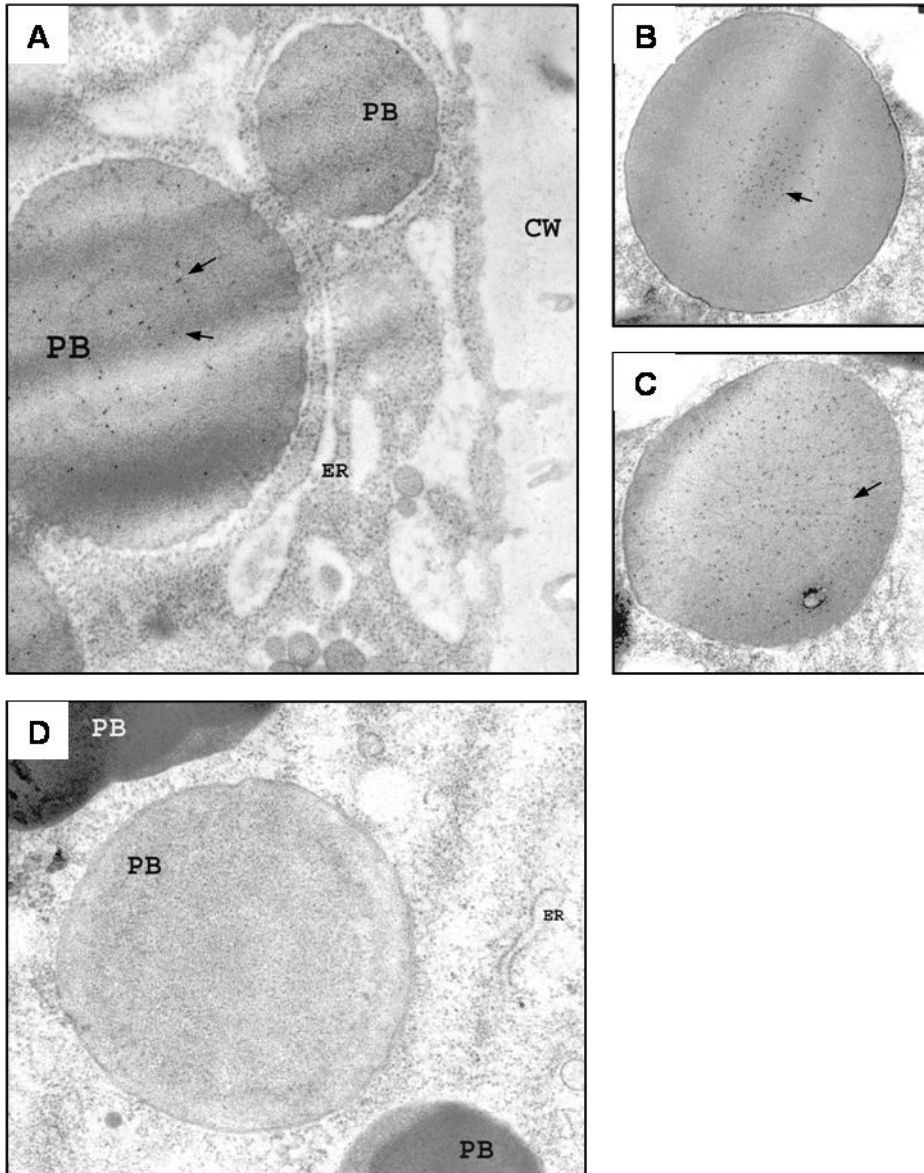


(B) Immunodetecció de les mateixes fraccions en grans de la línia transgènica RP5-Rxt3.9.4. La proteïna recombinant Rx3-T20 s'ha detectat amb l'anticòs  $\alpha$ G2. També s'han utilitzat els anticòssos  $\alpha$ BiP i  $\alpha$ TIP per detectar la xaperona de reticle BiP i la proteïna vacuolar  $\alpha$ -TIP respectivament.

### 2.3.2. Immunolocalització de Rx3-T20 al microscopi electrònic

Els anteriors estudis de fraccionament subcel·lular han demostrat que Rx3-T20 s'acumula en grans d'arròs en una fracció cel·lular densa, però no revelen quin és el compartiment on es localitza. Amb l'objectiu de respondre aquesta pregunta es van portar a terme experiments d'immunocitoquímica.

Talls ultrafins d'endosperma de 14 DAF de la línia transgènica RP5-Rxt3.21.2 es van incubar amb l'anticòs  $\alpha$ G2 i proteïna A conjugada a or coloidal per a immunolocalitzar la proteïna de fusió Rx3-T20. A l'observar els talls sota el microscopi electrònic es va poder detectar la proteïna de fusió dins d'unes estructures esfèriques envoltades de membrana que corresponien a CP de tipus I (Fig.56). No es va detectar marcatge en CP-II, RE ni en l'apoplast. Així doncs, amb aquest resultat podem concloure que Rx3-T20 s'acumula en l'endosperma d'arròs formant part de CP-I junt amb les prolamines natives. Segurament, les característiques dels dominis rics en prolina provoquen la retenció al RE de Rx3-T20 que queda atrapada entre les prolamines d'arròs i acaba localitzant-se en CP derivats de RE.



**Figura 56.** Localització subcel·lular de Rx3-T20 en talls ultrafins d'endosperma de plantes transgèniques d'arròs. Per a la immunocitoquímica s'ha utilitzat l'anticòs  $\alpha$ G2 i proteïna A-or coloidal 10 nm. En (A), (B) i (C) es mostren CP-I de plantes transgèniques on es detecta Rx3-T20. (D) correspon a plantes salvatges.