

**Figura 13.** El domini C-terminal conservat de PHOR1 mostra similitud amb el domini "arm-repeat" de la proteïna ARMADILLO de *Drosophila* i el seu homòleg  $\beta$ -catenina de vertebrats.

**A)** Representació esquemàtica de les proteïnes ARMADILLO/  $\beta$ -catenina i la proteïna PHOR1.

El domini armadillo de les dues proteïnes està marcat de color blau. Les diferents caixes mostren el número de motius repetits presents a cada proteïna. El domini armadillo de PHOR1 està comprès per 7 motius repetits que mostren una similitud més gran amb els motius repetits 2 al 8 de la  $\beta$ -Catenina.

Els números mostren la posició en la seqüència aminoacídica dels dominis conservats.

**B)** Alineament de les seqüències aminoacídiques dels 7 motius repetits de la proteïna PHOR1 amb els motius repetits 2 al 8 de la  $\beta$ -catenina.

Els residus conservats hidrofòbics estan indicats en color blau i els residus polars en verd. A la part de baix de les seqüències s'indica el consens descrit pels motius repetits *armadillo*.

La posició de cada repeat dins de la seqüència aminoacídica està indicada a la part esquerra de les seqüències. A la part de dalt es mostra els residus que comprenen les hèlices H1, H2 i H3.

**C)** Model tridimensional corresponent al motiu repetit 6 de PHOR1. El model s'ha obtingut basant-se en el motiu repetit 7 de la proteïna  $\beta$ -catenina, utilitzant el programa MOLSCRIPT (Krauslis, 1991). Per a generar el model corresponent a PHOR1, s'han substituït els residus de la proteïna  $\beta$ -Catenina pels residus

corresponents de PHOR1 (repeat 6). Es mostren els residus hidrofòbics altament conservats, els quals intervenen en la interacció entre les hèlices 2 i 3.

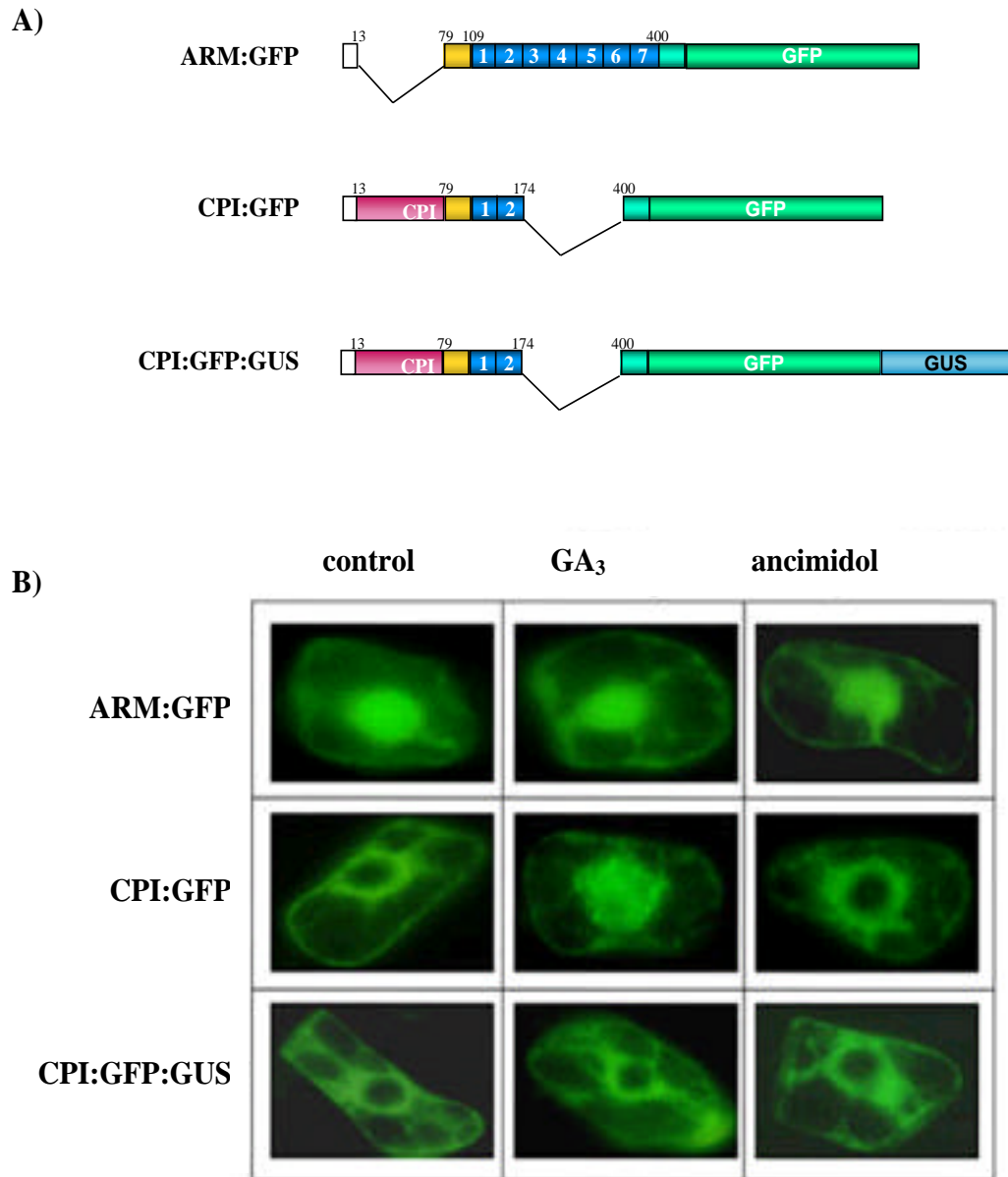
### **1.7 El domini Armadillo de PHOR1 és el responsable de la migració de la proteïna al nucli.**

Donat que les dades anteriors, obtingudes per comparació de la proteïna PHOR1 amb les proteïnes presents a les bases de dades, eren indicatives de la presència de dos dominis ben diferenciats a la proteïna (els dominis CPI i *armadillo*), ens vam plantejar de determinar quin dels dos dominis era el responsable de la distribució de la proteïna PHOR1 al citoplasma o al nucli, depenen de GAs. Amb aquest objectiu, es varen dissenyar oligonucleòtids específics direccionats cap a l'exterior de la proteïna i complementaris al domini CPI o al segon motiu *armadillo* repetit, els quals es van utilitzar com encebadors en reaccions de PCR inversa sobre el plasmidi *pUC-2X35SCaMV-PHORI-GFP*. Els productes d'amplificació PCR es van digerir amb l'enzim NotI, que no talla dins del plasmidi motlle però el qual es va incloure dins dels oligonucleòtids dissenyats, el producte de digestió es va relligar i es va utilitzar per a la transformació de *E. coli*. D'aquesta manera es van obtenir així les delecions *pUC-2X35S-CPI-GFP* (s'han deleccionat els residus 173 a 395 de PHOR1) i *pUC-2X35S-ArmR-GFP* (inclou una delecció dels residus 17 al 89) les quals es van analitzar per seqüenciació automàtica per a comprovar que la delecció era correcta i mantenia la pauta de lectura adequada. Aquestes construccions es van utilitzar aleshores per a estudiar la localització subcel·lular de les proteïnes de fusió corresponents als diferents dominis per separat fusionats a la GFP, mitjançant transformació transitòria per bombardeig de cèl·lules BY-2 de tabac. A la Figura 14 i taula 1 es mostren els resultats obtinguts d'aquests experiments. En cèl·lules bombardejades amb la construcció *pUC-2X35S-ArmR-GFP* vam poder observar que la proteïna de fusió ARM:GFP presentava una localització nuclear en el 100% de les cèl·lules transformades tant si aquestes eren crescudes en medi NT, com si eren incubades en presència de GA<sub>3</sub> o ancimidol. Per contra, les cèl·lules bombardejades amb la construcció *pUC-2X35S-CPI-GFP* presentaven una distribució de la fluorescència deguda a la fusió GFP idèntica a la

---

observada en cèl·lules transformades amb la fusió de la proteïna PHOR1 complerta a GFP (PHOR1:GFP). En aquestes cèl·lules, la proteïna de fusió CPI:GFP es localitza en el nucli en aproximadament el 80% de les cèl·lules incubades en un medi NT i en més del 90% de les cèl·lules incubades amb GA<sub>3</sub>. En canvi, en el 100% de les cèl·lules incubades amb ancimidol, la fusió CPI:GFP es localitza en el citoplasma.

Aquest resultat indica que al domini *armadillo* hi ha un senyal per a la localització nuclear de la proteïna i que el domini CPI es el responsable de la distribució entre el citoplasma i el nucli, depenent de la presència de GAs. El fet que observem una migració de la proteïna CPI:GFP al nucli en presència de GA<sub>3</sub>, d'altre banda, semblaria ser indicatiu de la presència d'un senyal de localització nuclear addicional en aquesta regió de la proteïna. No obstant, el domini CPI que comprèn la fusió CPI:GFP consta únicament de 196 residus amino acídics, i el pes molecular de la proteïna de fusió es d'aproximadament 45 kDa. Per tant, la migració al nucli de la proteïna CPI:GFP podria ser deguda a una difusió passiva, ja que el tamany d'exclusió dels porus nuclears es d'uns 60KDa (Greibenok et al., 1997). Per descartar aquesta possibilitat es va fusionar la proteïna GUS a l'extrem C-terminal de la proteïna CPI:GFP obtenint la construcció *pUC-2X35S-CPI-GFP-GUS*. Els estudis de localització subcel·lular amb aquesta construcció van mostrar una localització citoplasmàtica de la proteïna CPI:GFP:GUS en el 100% de les cèl·lules transformades, independentment de si eren tractades o no amb GA<sub>3</sub> o ancimidol (veure figura 14), el que indicaria que al domini CPI no hi ha un senyal addicional de localització nuclear. Aquests resultats són doncs consistents amb una possible funció del domini *armadillo* en l'import de la proteïna PHOR1 al nucli, mentre que el domini CPI seria responsable de retenir la proteïna al citoplasma, mitjançant un mecanisme que depèn de la presència de GAs.



**Figura 14. Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió ARM:GFP, CPI:GFP i CPI:GFP:GUS en cèl·lules BY-2 de tabac.**

A) Representació esquemàtica de les proteïnes de fusió ARM:GFP, CPI:GFP, CPI:GFP:GUS.

Es va transformar una suspensió de cèl·lules BY-2 (tres dies després del seu últim subcultiu) per bombardeig de partícules d'or recobertes amb els DNAs plasmídics corresponents a les construccions *pUC-2X35S-ArmR-GFP*, *pUC-2X35S-CPI-GFP* i *pUC-2X35S-CPI-GFP-GUS* (veure la secció 15 de material i mètodes).

**B)** A les 4-6 hores després del bombardeig, les cèl·lules es van observar sota llum UV en un microscopi òptic Axiophot, utilitzant el filtre Zeiss 450-490 nm, FT510 i LP520, i l'objectiu d'immersió. Es mostra fluorescència corresponent a les proteïnes de fusió ARM:GFP, CPI:GFP i CPI:GFP:GUS, respectivament, en cèl·lules incubades en medi NT (Cont) i en medi NT amb 50 µm GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) o 5 mg/L d'ancimidol (ancimidol).

### **1.8 Els possibles llocs de O-N-acetilglucosaminació o fosforilació no són importants per a la migració al nucli de la proteïna PHOR1:GFP.**

Els programes informàtics PROSITE i NetPhos predeien diferents llocs de fosforilació i O-N-acetilglucosaminació a la proteïna PHOR1, que corresponen a de la classe 1, amb una seqüència consens de modificació caracteritzada per incloure residus prolina propers als amino àcids Ser o Thr que són els residus dianes de la modificació (posicions 248–265 i 304-322 de *Phor1*). Aquestes modificacions post-traduccionals s'ha vist en molts casos que determinen un canvi en la localització subcel·lular de la proteïna, essent responsables de la seva migració al citoplasma o al nucli. Amb l'objectiu d'estudiar si aquests possibles llocs de fosforilació tenien una funció important en la migració al nucli en presència de GAs de la proteïna PHOR1, es va procedir a l'obtenció de construccions en que aquestes seqüències s'havien deletat (residus 84 a 97). Per a l'obtenció d'aquestes construccions es va utilitzar el mateix sistema de PCR inversa que abans, utilitzant oligonucleòtids complementaris a les seqüències adjacents a la regió a deletar i dirigits cap a l'exterior de la proteïna. Aquests oligonucleòtids contenien també la diana de restricció Sall que va ser utilitzada per a digerir els productes amplificats, generant així extrems cohesius els quals feien molt més eficient la reacció de religació del DNA plasmídic. Es va obtenir així el plàsmidi *pUC-2X35S-PHOR1(-PSSS)-GFP*, el qual es seqüencià per a comprovar la seva correcta deleció i pauta de lectura, abans de bombardejar les cèl·lules BY2 de tabac. Com podem observar a la taula 1, les cèl·lules de tabac transformades de manera transitòria amb aquesta construcció mostraren una localització de la proteïna de fusió *PHOR1(-PSSS):GFP* idèntica a la observada per a la proteïna PHOR1:GFP no deletada. Aquest resultat indicaria doncs que la regió rica en serines que es localitza

entre els dominis CPI i *armadillo* de PHOR1 i que els programes PROSITE i NetPhos identifiquen com a possibles llocs de fosforilació o O-N-acetilglucosaminació no són importants a l'hora de determinar la localització subcel·lular de la proteïna.

**Taula 1. Percentatge de cèl·lules en que s'observa una localització nuclear o una localització citoplasmàtica de les proteïnes de fusió PHOR1:GFP, PHOR1(-PSSS)::GFP, ARM:GFP, CPI:GFP i CPI:GFP:GUS en cèl·lules BY-2 de tabac transformades de manera transitòria per bombardeig mitjançant partícules d'or recobertes amb els DNAs plasmídics corresponents a les construccions *pUC-2X35S-PHOR1-GFP*, *pUC-2X35S-PHOR1(-PSSS)-GFP*, *pUC-2X35S-ArmR-GFP*, *pUC-2X35S-CPI-GFP* i *pUC-2X35S-CPI-GFP-GUS* (veure apartat 15 de material i mètodes).**

A les 4-6 hores després del bombardeig, les cèl·lules es van observar sota llum UV en un microscopi òptic Axiophot, utilitzant els filtres Zeiss 450-490 nm, FT510 i LP520 i l'objectiu d'immersió. Després del bombardeig les cèl·lules es van incubar en medi NT (cont) i en medi NT amb 50 µm GA<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) o amb 5 mg/L d'ancimidol (ancimidol).

	control		GA <sub>3</sub>		ancimidol	
	nucli	citoplasma	nucli	citoplasma	nucli	citoplasma
PHOR1:GFP	60	40	94	6	0	100
PHOR1(-PSSS)::GFP	56	44	90	10	0	100
ARM:GFP	100	0	100	0	100	0
CPI:GFP	50	50	90	10	0	100
CPI:GFP:GUS	0	100	0	100	0	100

## 2.1 Les línies transgèniques antisentit pel gen PHOR1 (línies 8A) tenen fulles més amples i amb els pecíols més curts com les línies transgèniques antisentit pel gen GA 20-oxidasa

Els resultats obtinguts en els estudis de localització subcel·lular de la proteïna PHOR1, recorden en molts aspectes els resultats descrits per a la proteïna ARMADILLO. Aquesta proteïna s'ha vist que té un paper important en la polaritat dels segments

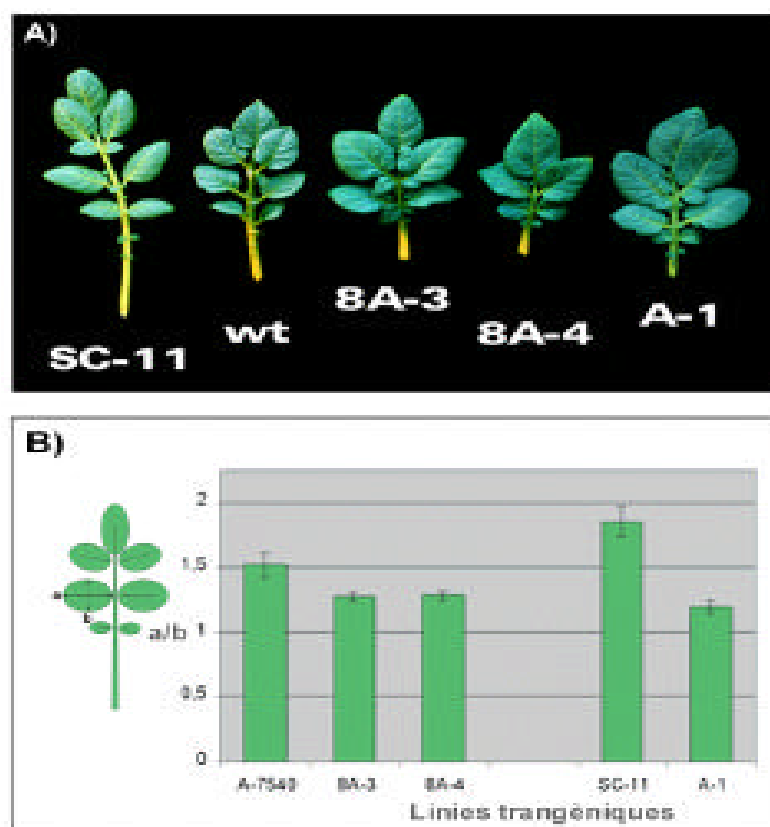
abdominals de *Drosophila*, degut a que actua com un component essencial de la ruta de transducció del senyal *Wnt/Wingless* (Miller and Moon, 1996; Willert and Nusse, 1998; Dale, 1998). En absència del senyal *Wingless*, ARMADILLO es localitza al citoplasma, essent fosforilada per zw3/GSK3 (Pai et al., 1997) en una sèrie de residus Ser i Thr localitzats a l'extrem N-terminal de la proteïna i ràpidament degradada a través d'una ruta depenent d'ubiquitinació. L'activació de la cascada de senyalització *Wnt*, inhibeix la proteïna kinasa zw3/GSK3, el que permet que ARMADILLO s'acumuli al citoplasma i entri al nucli a on forma un complex amb membres de la família *Tcf/LEF-1* de factors de transcripció (inclouen una caixa del tipus HMG box), i activa la transcripció de tot una sèrie de gens regulats per aquesta via.

Malgrat que de moment no existeix cap evidència que PHOR1 interaccioni en el nucli amb d'altres proteïnes, la migració de PHOR1 al nucli en presència de GAs estaria d'acord amb una funció de PHOR1 en la ruta de transducció del senyal de GAs. En cas que aquesta sigui la funció de la proteïna PHOR1, seria d'esperar que les línies antisentit pel gen PHOR1 (línies 8A) fossin afectades en múltiples processos regulats per les GAs. Anteriorment havíem ja observat que les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen *PHOR1* presenten un fenotip semi-nan, caracteritzat per una reducció en la distància internodal en els nodes localitzats a la part apical de la planta quan es comparen amb les plantes control. Aquest fenotip és típic de plantes amb nivells reduïts de GAs, o amb una resposta alterada a GAs, ja que és molt semblant a l'observat en plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen *StGA20ox1* que codifica per a l'enzim GA 20-oxidasa (Carrera et al., 2000) o en plantes control tractades amb ancimidol (inhibidor de la ruta de biosíntesis de les GAs). D'altre banda havíem pogut observar que les línies 8A, en condicions inductores (SD), tuberitzen abans que les plantes control i formen un número major de tubercles que aquestes, a l'igual que les plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit pel gen GA 20-oxidasa de patata (Carrera et al., 2000).

Vam poder observar que a més a més d'aquests dos caràcters, d'altres caràcters regulats per GAs es veuen també afectats en aquestes plantes. Les plantes 8A, per exemple, tenen pecíols molt més curts que les plantes control no transformades. Els foliols de les fulles d'aquestes plantes són, per altre banda, més curts i amples que els de les fulles control i d'un color verd més fosc, a l'igual que les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen *StGA20ox1* (veure figura 15A). Aquest canvi en la

morfologia de la fulla es un caràcter depenent de GAs doncs en plantes portadores d'una construcció de sobre-expressió del gen *StGA20ox1* (Carrera et al., 2000) la morfologia de les fulles és totalment oposada. Com es pot observar a la figura 15A, els pecíols de les fulles d'aquestes plantes són més llargs que els de les plantes control. Els foliols de les fulles són també més llargs i estrets que els de les plantes control i les fulles són d'un color verd més clar, a l'igual que les fulles de les plantes tractades amb GA<sub>3</sub>. Aquests canvis en la morfologia dels foliols s'aprecien millor a la figura 15A, en que es va mesurar l'amplada i llargària de 10 fulles de 5 plantes diferents, corresponents a plantes control o a línies transgèniques portadores de la construcció antisentit pel cDNA *PHOR1*, o les línies antisentit i de sobre-expressió del gen *StGA20ox1*. La relació entre la llargària/amplada de les diferents fulles es mostra a la figura 15B, on s'observa que les plantes antisense pel cDNA *PHOR1* (8A) i antisense pel cDNA *StGA20ox1* (A-1) presenten una relació menor i per tant són més curtes i amples que les fulles de les plantes control. Al contrari passa amb les plantes que sobre-expressen l'enzim GA 20-oxidasa (SC-11), que presenten una relació llargària/amplada més gran que les fulles de les plantes control i aproximadament el doble que les fulles de les plantes portadores de les construccions antisentit.





**Figura 15. Canvis morfològics observats en les fulles de les línies transgèniques antisentit pel cDNA *PHORI* (línies 8A).**

**A)** Fenotip de les fulles de les línies 8A3 i 8A4. Aquestes plantes mostren fulles de color verd fosc, amb pecíols curts i foliols més petits i amples que les plantes control (A7540), essent semblants a les fulles de les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen GA 20-oxidasa (A-1). S'inclouen també com a comparació les fulles de les plantes portadores de la construcció de sobre-expressió pel gen GA 20-oxidasa (SC-11).

**B)** Relació entre la llargària/amplada (a/b) dels foliols de les fulles. S'observa que els foliols de les fulles de les plantes 8A són més petits i amples que els foliols de les plantes control, amb una relació significativament igual a la observada en les plantes amb nivells d'expressió reduïts del gen GA 20-oxidasa (A-1). També es compara amb la relació calculada per a les fulles de les línies de sobre-expressió del gen GA 20-oxidasa (SC-11).

## 2.2 Les plantes 8A presenten una sensibilitat reduïda a l'aplicació exògena de GAs

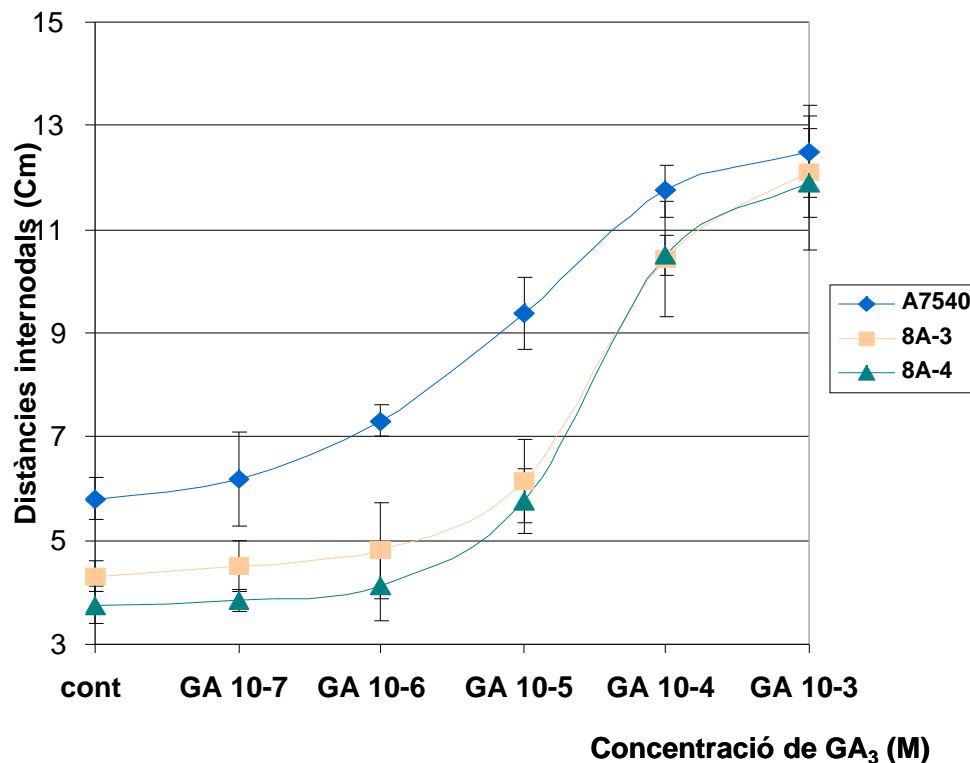
Les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió del gen *StGA20ox1* (Carrera et al., 2000) presenten un fenotip nan que es revertit per aplicació exògena de GAs. En *S. tuberosum* ssp. *andigena* s'ha descrit també el mutant nan *gal* que presenta una mutació en l'enzim responsable de la conversió de GA<sub>12</sub> en GA<sub>53</sub> (van den Berg et al., 1995). Aquest mutant és extremadament nan, però el seu fenotip es recupera completament per aplicació de GA<sub>3</sub>. Al contrari d'aquestes mutacions que afecten enzims biosintètics, les mutacions que afecten gens que corresponen a intermediaris de la via de transducció del senyal de GAs, no es recuperen per aplicació de GAs exògenes. Aquest tipus de mutants no han estat encara descrits en patatera, però si s'han descrit a *Arabidopsis*, pèsol, tomàquet, arròs i blat entre d'altres espècies. A *Arabidopsis*, per exemple, s'han descrit els mutants *ga insensitive 1-1* (*gai 1-1*), *sleepy* (*sly*) i *pickle* (*pkl*) que causen un fenotip nan que no és revertit per aplicació exògena de GAs. La clonació dels gens responsables d'aquestes mutacions ha permès de determinar que aquests gens codifiquen per a components de la ruta de transducció del senyal de GAs, que en molts casos semblen funcionar com a reguladors negatius de la resposta a GAs (Sun, 2000). GAI, per exemple, codifica per un regulador negatiu de la via que pertany a la família de factors de transcripció específics de plantes GRAS (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Pysh et al., 1999). L'activitat d'aquesta proteïna sembla ser regulada per el motiu DELLA a la regió N-terminal, que no es present en altres membres de la família de factors de transcripció GRAS i que presenta una deleció de 17 amino àcids en el mutant *gai 1-1* (Peng et al., 1977).

Considerant aquests antecedents, en el cas de que PHOR1 tingués una funció com a component intermediari en la via de transducció del senyal de GAs, seria d'esperar que el fenotip de les plantes 8A no es pugui revertir per aplicació exògena de GAs. Estudis realitzats amb anterioritat al laboratori, semblaven però indicar que dosis elevades de GA<sub>3</sub>, sí revertien el fenotip de les línies 8A (Monte, 1998), i en el seu moment aquest resultat es va interpretar com a suggerent d'una funció de PHOR1 en la biosíntesi de GAs. Les dades de localització subcel·lular de la proteïna obtingudes en aquest treball, així com la similitud del domini C-terminal amb el domini repetitiu *armadillo*, no

obstant, estarien totalment en desacord amb una activitat biosintètica de GAs per PHOR1. En conseqüència, ens plantejarem repetir els experiments de reversió del fenotip d'aquestes línies, tenint en consideració que aquestes plantes corresponen a línies amb nivells reduïts d'expressió de la proteïna però no a mutants nuls. Això pot fer que aquestes línies mostrin una resposta reduïda a GAs, que sigui només mesurable a baixes concentracions de la hormona, però que a elevades concentracions s'assoleixin nivells de saturació i aquestes diferències no siguin observables. Les corbes dosi-resposta a GAs han mostrat ser molt útils a l'hora de proporcionar dades que permetin la caracterització de mutants nans i de fet, han estat sovint utilitzades per a distingir entre mutants biosintètics, mutants amb una sensibilitat reduïda a les GAs. Aquesta reducció de sensibilitat a l'aplicació exògena de GAs és en molts casos relacionada amb mutants que tenen alterada la ruta de transducció de senyal de les GAs (Chandler PM, et al., 1999).

Per determinar l'efecte de les GAs sobre el fenotip semi-nan de les plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* es van tractar aquestes i plantes control amb diferents concentracions de GA<sub>3</sub>. Després de dos setmanes de tractament, es va mesurar la distància internodal dels 4 primers entrenusos. A la figura 16 es pot observar que la distància internodal de les plantes 8A (3-4 cm) és menor que les de les control (6 cm), a les plantes no tractades. L'elongació dels entrenusos tant a les plantes 8A com a les control incrementa gradualment amb l'increment de les concentracions de GA<sub>3</sub>. Però la concentració necessària per produir la mateixa resposta a les plantes 8A és major que a les control. L'elongació dels entrenusos a les plantes control s'indueix a concentracions de 10<sup>-7</sup>-10<sup>-4</sup> M GA<sub>3</sub>, mentre que és de 10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> per a les plantes 8A (necessita dos ordres de magnitud més). A concentracions més elevades de GA<sub>3</sub> (10<sup>-3</sup> i superiors) la diferència de les distàncies internodals entre les plantes 8A i les control és menor, a aquestes concentracions la resposta està saturada. El fenotip salvatge a les plantes 8A pot ser recuperat per l'aplicació continuada amb concentracions saturants de GA<sub>3</sub> (Tesi d'Elena Monte, 1998).

Aquests resultats demostren que les plantes transgèniques 8A3, 8A4 i 8A29 amb nivells reduïts d'expressió de *Phor1*, són menys sensibles a l'aplicació exògena de GAs que les plantes control i suggereix que aquestes plantes presenten una alteració en la senyalització de les GAs.

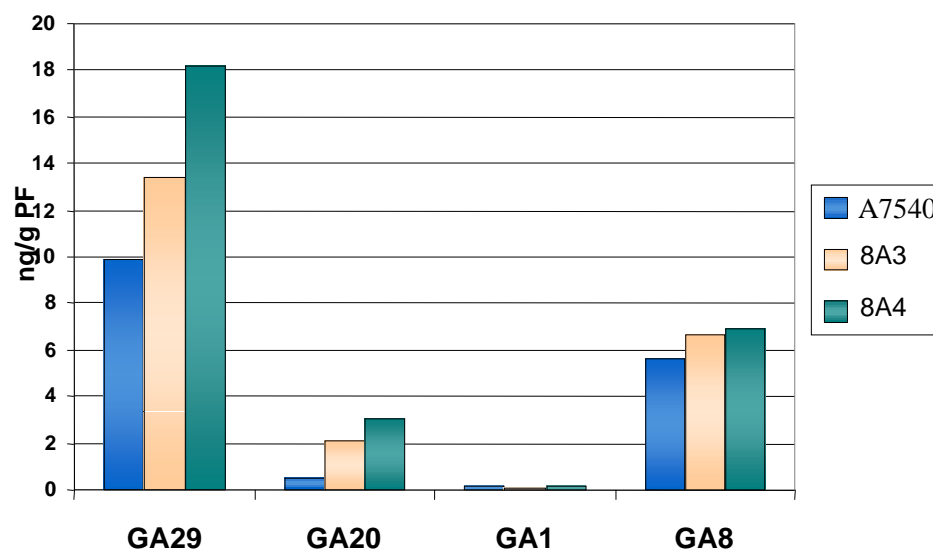


**Figura 16.** Les corbes de dosi-resposta a GA<sub>3</sub> a les plantes *S. tuberosum ssp. andigena* controls (A7540) i dos línies diferents portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* (8A3, 8A4). Aquestes plantes es van fer créixer a l'hivernacle en condicions de dia llarg LD, fins a l'estadi de 6 fulles i es van tractar cada dos dies amb diferents concentracions de GA<sub>3</sub> indicades a l'eix de les X, des de les tractades amb aigua (cont), 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>. Després de dos setmanes de tractament, es va mesurar la distància internodal dels 4 primers entrenusos. A la gràfica es representa la mitja obtinguda entre aquests 4 internodes de 10 plantes diferents per a cada línia.

### 2.3 Les plantes 8A presenten uns nivells superiors de GAs endògenes.

Mutants que presenten una alteració en la ruta de transducció de senyal de les GAs, com el mutant insensible gai d'*A. thaliana*, presenta uns nivells d'acumulació de GAs bioactives major que les plantes control. Amb l'objectiu de comprovar el nivells de GAs endògenes i comparar-les amb les controls es van fer extraccions de GAs, a partir de fulles joves de les plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* (8A) i no transgèniques (control). Com es pot observar a la figura 17,

les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió de *Phor1* presenten una major acumulació de GA<sub>29</sub>, GA<sub>20</sub> i GA<sub>8</sub> que les control, amb un increment de 4 a 6 cops de GA<sub>20</sub> a les plantes 8A respecte a les control. Com es pot observar a la figura però els nivells de GA<sub>1</sub> són significativament igual entre aquestes plantes. Aquest resultat ens està indicant que el fenotip observat a les plantes transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* no ve donada per una disminució en els nivells de GA actives endògenes.



**Figura 17.** Nivells de GAs endògenes (GA<sub>29</sub>, GA<sub>20</sub> i GA<sub>8</sub> i GA<sub>1</sub>) a les plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena* controls (A7540) i dos línies diferents portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* (8A3, 8A4). Aquestes plantes es van fer créixer a l'hivernacle en condicions de dia llarg LD, fins a l'estadi de 5 fulles. Les GAs van ser extretes dels primers 4 nodes apicals de la planta i van ser quantificades mitjançant GC-MS.

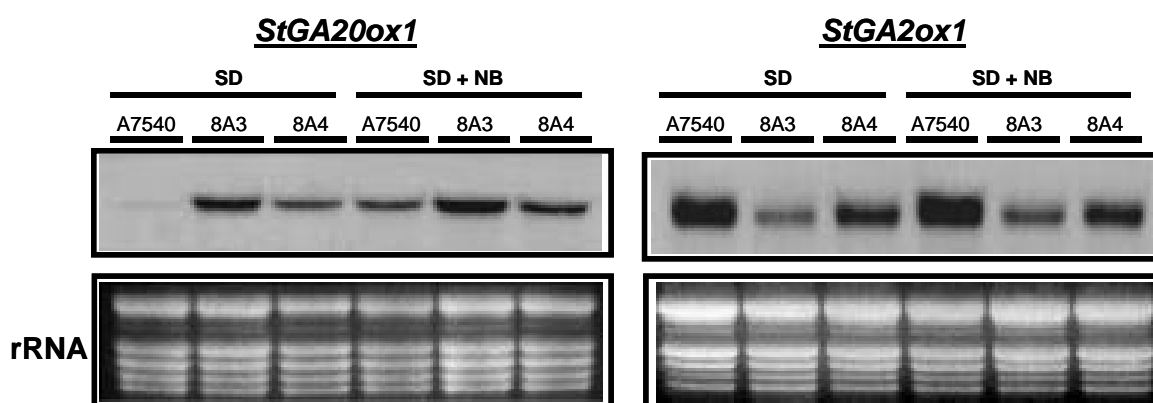
## **2.4 Les plantes 8A presenten alterats els nivells de transcrit corresponents als gens de la ruta de biosíntesi de GAs, GA 20-oxidasa i GA 2-oxidasa.**

Els gens de la ruta de biosíntesi de GAs com les GA20-oxidases (Carrera et. Al., 1999) i les GA 3 -hidroxilasa (tesi Jordi Bou, 2000), a patatera, presenten una regulació per retroalimentació negativa pel producte final de la via, GA<sub>1</sub>. Per una altra banda els gens de la ruta de biosíntesi GA 2-oxidasa estan regulats positivament per GA<sub>1</sub> (Thomas et. al., 1999). Els nivells de transcrit per als primers es veu reduït per l'aplicació exògena de GA<sub>3</sub> i incrementats, respecte a les plantes control, amb l'aplicació exògena de ancimidol o paclobutazol (inhibidors de la síntesi de GA<sub>1</sub>) i als mutants deficientes de la ruta de síntesi de GAs, *gal* (degut a la mutació a l'enzim 13-hidroxilasa, responsable de la transformació de GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub>), amb nivells més baixos de GAs endògenes. Al contrari passa amb les GA 2-oxidases (Thomas, SG., Phillips, A.L. and Eden, P; 1999). Aquesta regulació per retroalimentació negativa dels nivells de transcrit de *GA4* (GA 3 -hidroxilasa) (Rachel et. al., 1998) i de *GA5* (GA 20-oxidasa) (Xu et. al, 1995; Peng et al., 1997) a *A. thaliana*, està alterada al mutant de la transducció de senyal de GAs, *gai*. Aquest mutant insensible a l'aplicació exògena de GAs presenta uns nivells de transcrit de *GA4* i *GA5* i per tant uns nivells de GAs actives majors al de les plantes control. Cal esperar que les plantes transgèniques amb una reducció en la sensibilitat a les GAs actives presentin alterada aquesta regulació per producte final de la via. Les anàlisis Northern hibridant els RNAs de plantes *S. tuberosum* ssp. *andigena* control i transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1*, amb els cDNAs *St20ox1* i *StGA2ox*, així ho demostren. Les plantes 8A acumulen nivells més elevats dels transcrits corresponents a la GA 20-oxidasa en comparació a les plantes controls i els nivells de transcrit corresponent a la GA 2-oxidasa es redueixen a les plante 8A respecte a les control (veure figura 18).

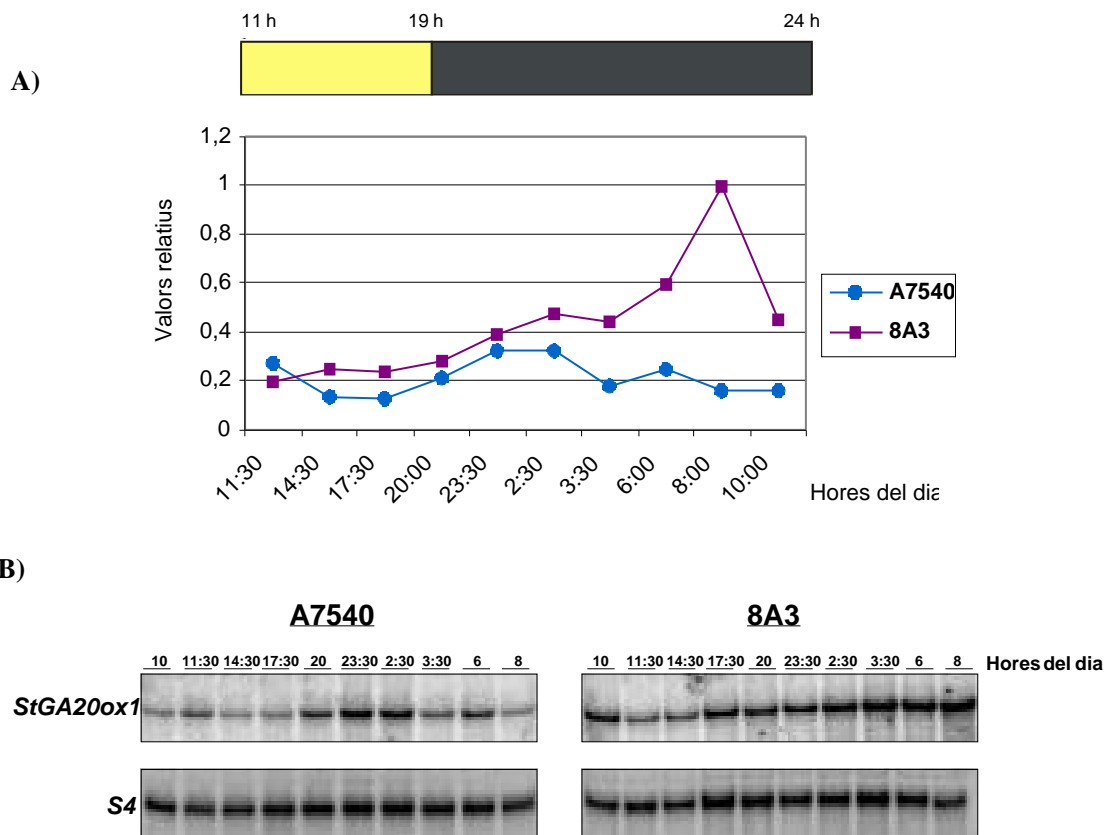
Les cinètiques d'expressió al llarg de 24 hores de *StGA20ox1* i *StGA3ox1*, corresponent als gens GA 20-oxidasa i GA 3-hidroxilasa de patatera, van mostrar unes oscil·lacions que indicaven que aquests gens estan sota control fotoperiòdic i juga un paper en la regulació fotoperiòdica de la resposta a GAs com la regulació per

retroalimentació negativa d'aquests gens. Si comparem les cinètiques d'expressió al llarg de 24 hores del gen biosintètic *StGA20ox1* entre plantes 8A i plantes control observem que (veure figura 19) els nivells de transcrit de la GA 20-oxidasa a les plantes 8A són més elevats que els de les plantes control durant totes les hores del dia. Tot i que les plantes 8A presenten el mateix patró d'expressió (però fins a 0,7 cops més elevats) durant el dia que el de les plantes control. Durant la nit els nivells de transcrit a les plantes control disminueix després d'un pic màxim a les 23:30 hores per l'efecte feedback negatiu mentre que a les plantes 8A continua incrementant fins a ser 4 cops més elevat que a les plantes control. Aquesta gràfica mostra que les plantes transgèniques amb nivells reduïts d'expressió de *Phor1* a més a més de presentar uns nivells de transcrit del gen *StGA20-oxidasa* més elevats que les controls presenten una alteració, al llarg de 24 hores, en la resposta de regulació per retroalimentació negativa del gen de la GA 20-oxidasa.

Aquests resultats demostren que les plantes transgèniques 8A3, 8A4, amb nivells reduïts d'expressió de *Phor1*, són menys sensibles a les GAs actives que les plantes control, això explica que aquestes plantes presentin una alteració en el procés de la transducció de senyal de les GAs, com és la regulació de l'expressió dels gens de biosíntesi de GAs pel producte final de la via i per tant la alteració de la regulació final dels nivells de GAs actives.



**Figura 18.** Nivells d'expressió dels gens biosintètics GA 20 oxidasa 1 i GA 2 oxidasa a les plantes *S. tuberosum ssp andigena* controls no transformades (A7540) i transformades amb la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* (8A3 i 8A4). 30 µg de RNA total van ser extrets de les fulles joves d'aquestes plantes i hibridades un cop transferides a una membrana de nylon amb els cDNAs de *StGA20ox1* i *StGA2ox* de patata.



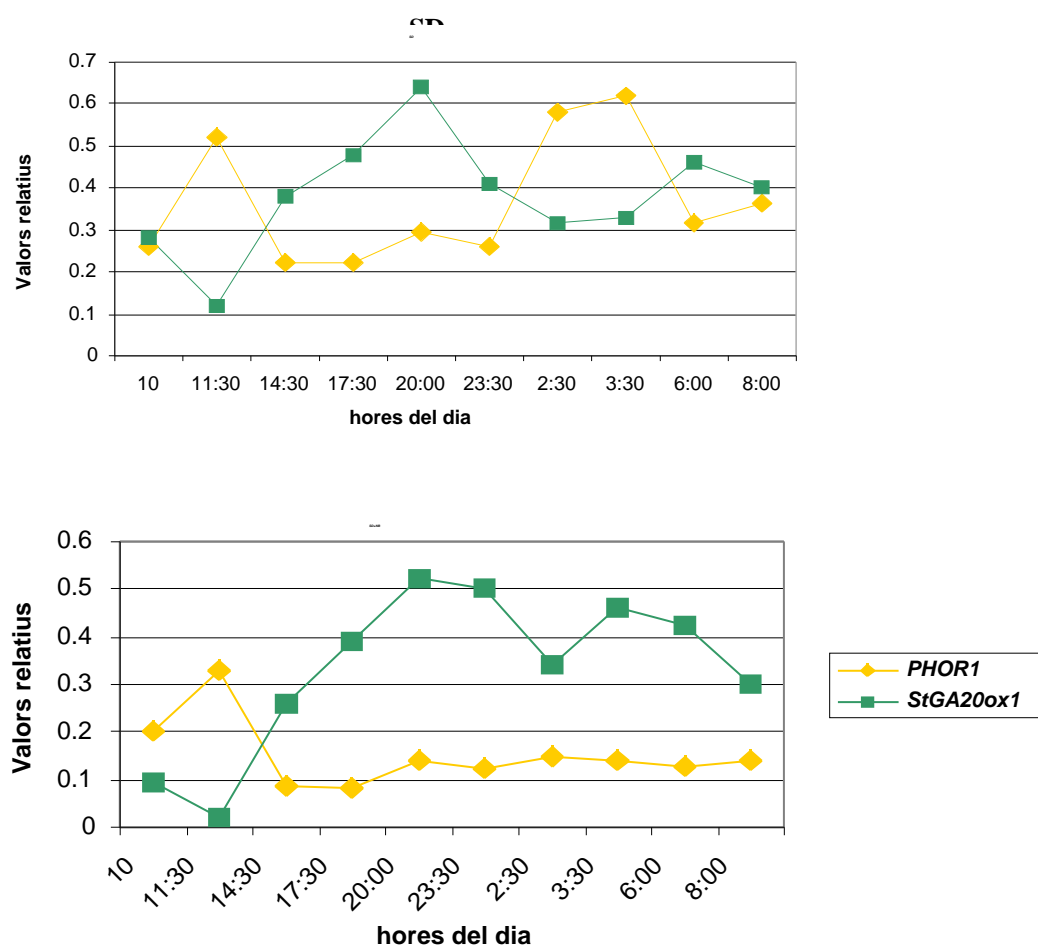
**Figura 19. Quantificació dels nivells d'expressió a fulla del transcrit *StGA20ox1* en plantes *S. tuberosum* ssp *andigena* controls no transformades (A7540) i transformades amb la construcció antisentit del cDNA de *Phor1* (8A3) crescudes sota fotoperíode de SD.**

**A)** Els nivells de mRNA s'han quantificat mitjançant PhosphorImager a partir del senyal obtingut de la hibridació northern de la cinètica de *StGA20ox1* i normalitzat amb el senyal obtingut de la hibridació northern de la cinètica de *S4*.

**B)** 20 plantes control i 20 plantes 8A3 van ser crescudes en fotoperíode de dies curts (SD), que com es pot observar a l'esquema gràfic el període de llum està comprès entre les 11 hores i les 19 hores. S'aclimataren durant 3 setmanes en la cambra de fotoperíode i es colliren mostres al voltant de cada 2 o 3 hores durant 24 hores. A cada punt de la cinètica es colliren les 4 primeres fulles, de cada dues plantes per tal d'evitar oscil·lacions en els nivells de mRNA degudes a variacions aleatòries en l'estat de la planta. En tots el casos 30 µg de RNA total es van hibridar, un cop transferits a una membrana de nylon, amb el cDNA de *StGA20ox1* i amb el cDNA *S4* (corresponent al gen de la proteïna ribosomal S4 amb expressió constitutiva a plantes de patatera), utilitzat aquest últim com a control de càrrega.



Una altre dada interessant és que els pics de màxima expressió del gen *Phor1* són oposats als del gen biosintètic GA 20 oxidasa de patata. Si comparem els nivells d'expressió durant 24 hores d'aquests dos gens (figura 20) observem que 1 hora després d'encendre les llums a les cambres de fotoperíode existeix un pic màxim d'expressió de *Phor1* i és quant els nivells l'expressió de *StGA20ox1* són més baixos i al contrari passa a les 23:30 on els nivells de *StGA20ox1* presenten un pic de màxima expressió sent els de *Phor1* els nivells d'expressió més baixos. Les davallades d'expressió d'un coincideix amb l'increment d'expressió de l'altre. Això passa tant en plantes control com a les plantes 8A, tant crescudes en condicions fotoperiòdiques de dia LD, SD, com SD+NB.



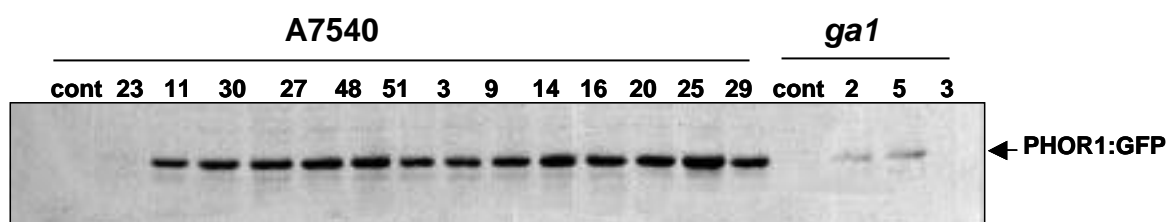
**Figura 20. Quantificació dels nivells d'expressió a fulla del transcrit *StGA20ox1* i *PHOR1* en plantes *S. tuberosum* ssp *andigena* (A7540) crescudes sota fotoperíode de SD i SD+NB. Els nivells de mRNA s'han quantificat mitjançant PhosphorImager a partir del senyal obtingut de la hibridació Northern de la cinètica de *StGA20ox1* i *PHOR1* i normalitzat amb el senyal obtingut de la hibridació northern de la cinètica de *S4*.**

## 2.5 Fenotip observat a les plantes trangèniques portadores de la construcció de sobreexpressió constitutiva PHOR1:GFP.

Amb l'objectiu de comprovar a cèl.lules de patatera la translocació a nucli, depenent de GAs, de la proteïna PHOR1:GFP, es va procedir a l'obtenció de plantes transgèniques portadores de la construcció de sobreexpressió constitutiva de PHOR1:GFP. Es va transformar la soca *pGV2260* d'*A. tumefaciens* amb el plàsmid *pBin19-2X35S-Phor1-gfp-pA35S* i es van utilitzar per a la infecció de fulles de *S. tuberosum* ssp. *andigena* línia A7540 i el mutant nan de *S. tuberosum* ssp. *andigena* deficientes en GAs, *ga1*, que té bloquejat el pas de la biosíntesi entre GA<sub>12</sub> i GA<sub>53</sub>. Com a control es van transformar fulles de *S. tuberosum* ssp. *andigena* línia A75.40 i mutants *ga1* amb la construcció de sobreexpressió per a la proteïna GFP (amb el plàsmid *pBin19-2X35S-gfp-pA35S*).

Les plantes transformades, regenerades en presència de Kanamicina, van ser trasplantades a terra, un cop van tenir prou desenvolupades les arrels, per al seu anàlisi.

Les plantes transgèniques obtingudes es van analitzar per Western blot, mitjançant incubació d'extractes total de proteïnes de fulles joves amb el suero immune del conill Nt3 i el suero immune anti-GFP, per seleccionar les que sobreexpressaven la proteïna PHOR1:GFP, comparades amb les control no transformades (veure figura 21).



**Figura 21.** Anàlisi d'expressió, mitjançant Western blot, de la proteïna PHOR1:GFP a les plantes de patatera *S. tuberosum* ssp. *andigena* (A7540) i mutants *ga1* (*ga1*), transformades amb la construcció *pBin19-2X35S-Phor1-gfp-pA35S*. I comparades amb les plantes control no transformades (cont). Es van carregar en un gel d'acrilamida SDS-PAGE al 12% 40 µg d'extractes total de proteïnes de fulles joves d'aquestes plantes i es van incubar amb una dil.lució 1/2000 del suero immune anti-GFP.

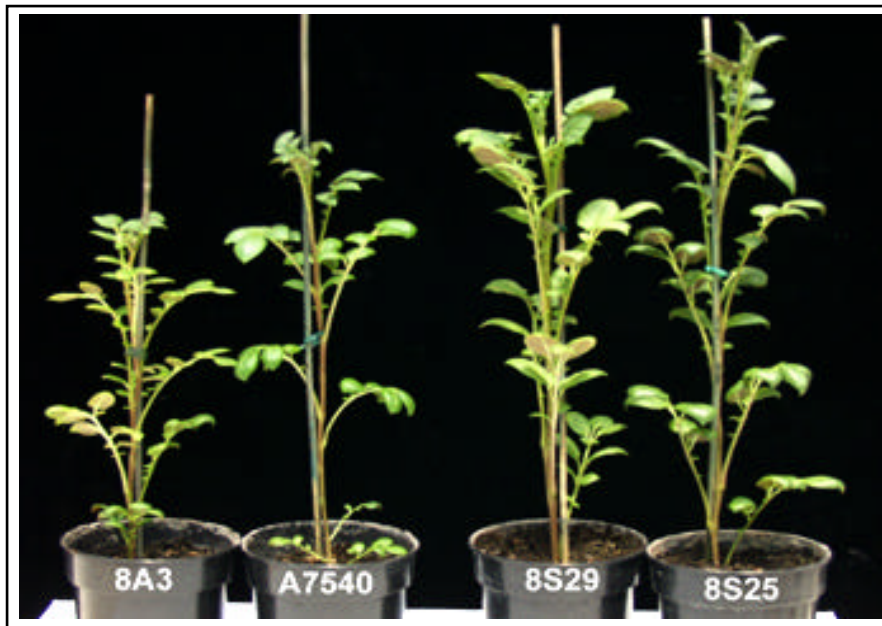
Es van seleccionar les línies transgèniques de *S. tuberosum* ssp *andigena* (A7540) que sobreexpressaven alts nivells de la proteïna PHOR1:GFP (8SPHOR1:GFP). La transformació del mutant *gal*, ténia l'objectiu d'estudiar la localització de la proteïna PHOR1:GFP a una planta deficient en GAs en comparació a la localització a les plantes no deficientes A75.40. Però la deficiència d'aquesta hormona afectar la regeneració *in vitro* de les fulles infectades per a la transformació. Tot i que aquestes van ser regenerades en un medi amb de GA<sub>3</sub>, no va ser suficient per obtenir una bona eficiència de regeneració amb el resultat de l'obtenció de molt pocs transformants finals. Tres van ser els transformant finalment aconseguits i com es pot observar a la figura 21, dues d'aquest sobreexpressen la proteïna PHOR1:GFP però a nivells molt baixos.

Es pretén fer estudis de la localització de PHOR1:GFP a les plantes A7540 i la *gal* transgèniques, tractant diferents línies transgèniques amb GAs i ancimídol i observar la seva localització mitjançant microscopia confocal de talls fins de diferents teixits de la planta i immunocitoquímica, incubant els talls ultrafins de les fulles amb una dilució del sèrum immune anti GFP.

Amb l'objectiu d'estudiar la funció del gen *Phor1* i la seva possible implicació en els processos regulats per les GAs i comparar d'aquesta manera els resultats obtinguts amb les transgèniques portadores de la construcció antisentit del cDNA de *Phor1*, es va analitzar el fenotip de les plantes transgèniques que sobreexpressen la proteïna PHOR1:GFP i aquest es va comparar amb el de les plantes control no transformades i les que sobre-expressen la proteïna GFP.

Les plantes transgèniques portadores de la construcció de sobreexpressió per a la proteïna de fusió PHOR1:GFP presenten un increment en la llargària dels entrenusos, a la part apical de la tija, un pecíol més allargat i unes fulles més gran, comparades amb les plantes control no transformades i les que sobre-expressen la proteïna GFP.

A)



B)



**Figura 22.** Canvis fenotípics, en quant a la llargària de la tija (A) i la morfològics en les fulles (B) de les línies transgèniques de *S. tuberosum ssp andigena* (A7540) que sobreexpressen alts nivells de la proteïna PHOR1:GFP (8S) comparades amb les línies transgèniques antisentit pel cDNA *PHOR1* (8A3) i les no transformades (A7540).

Es pretén fer estudis per comprovar si les línies transgèniques de *S. tuberosum ssp andigena* (A75.40) que sobreexpressaven alts nivells de la proteïna PHOR1:GFP són més sensibles a les GAs, mitjançant el tractament d'aquestes i plantes control amb diferents concentracions de GA<sub>3</sub> i ancimidol.

### 3. Aïllament de proteïnes que interaccionen específicament amb PHOR1 mitjançant experiments de “doble híbrid” en llevat.

Els resultats de localització obtinguts *in vivo* en cèl·lules vegetals BY-2 mostren que el domini *armadillo* és el responsable de la migració de la proteïna PHOR1:GFP al nucli i el domini CPI el responsable de la retenció dependent de GAs de la proteïna al citoplasma, possiblement per la interacció d'aquest amb una proteïna citoplasmàtica. El domini *armadillo*, d'altra banda, és un domini caracteritzat per plegar-se en una estructura superhèlix molt estable, i formar un solc carregat positivament a la superfície de la proteïna que serveix com a domini d'interacció proteïna-proteïna, capaç de formar un complex amb els dominis acídics presents a d'altres proteïnes (Huber et al., 1997). El domini “arm-repeat” de la  $\beta$ -catenin/ARMADILLO és el responsable de la interacció d'aquesta proteïna amb E-cadherina, amb APC i amb la família de factors de transcripció Tcf/LEF-1 (Willert i Nusse, 1998). Així mateix, el domini *armadillo* de les  $\beta$ -importines és el responsable de la interacció amb les seqüències NLS (*Nuclear Localization Signal*) de diferents proteïnes per al seu transport al nucli (Conti et al., 1998). Per altre part, en plantes s'ha vist que el domini C-terminal/*armadillo* de la proteïna ARC1 (Arm Repet Containing 1) de *Brassica napus* és el responsable de mediar la interacció d'aquesta proteïna amb el domini quinasa de la proteïna SRK (S-locus receptor Kinase) en experiments de doble-híbrid, tot i que encara no s'ha demostrat quin és el significat biològic d'aquesta interacció (Gu et al., 1998). Existeixen doncs multitud de dades que indiquen que PHOR1 interacciona amb d'altres proteïnes a la cèl·lula, formant un complex tant a través del domini *armadillo* com del domini CPI. Amb l'objectiu d'aïllar i caracteritzar aquestes proteïnes, es van realitzar experiments de "doble-híbrid" en llevat.

#### 3.1. Preparació de les construccions per al cribatge "doble-híbrid".

La tècnica de "doble-híbrid" es basa en el caràcter bi-modular dels factors de transcripció, els quals són compresos per dos dominis separables que medien, respectivament, la unió al DNA i l'activació de la transcripció. Aquests dominis es

poden intercanviar entre factors diferents i obtenir proteïnes transcripcionalment actives. S'ha vist que poden expressar-se fusionats a proteïnes diferents i, si es dóna una interacció entre les proteïnes que apropi els dominis d'activació i d'unió al DNA, el complex format és funcional i pot activar la transcripció. En base a aquesta propietat, s'han desenvolupat vectors específics, basats en la proteïna reguladora GAL4 de llevat, en els quals la proteïna d'interès ("*bait*"; PHOR1 en el nostre cas) s'expressa fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 (DNA-BD) i la proteïna problema ("*prey*") s'expressa fusionada al domini d'activació de GAL4 (DNA-AD). En cas que es vulgui cercar aquesta última, es fusiona al DNA-BD de GAL4 una llibreria de cDNA sencera, que en ser transformada en llevat, ens permeti cercar la proteïna d'interès. Junt a aquests vectors s'han desenvolupat soques mutants de llevat deficientes en els gens que confereixen autotrofia per a l'histidina i l'adenina i que a la vegada, tenen aquests mateixos gens (*His3* i *Ade1*) i el gen *gal* (codifica l'enzim  $\beta$ -galactosidasa), sota control d'un promotor que conté les seqüències de DNA reconegudes per GAL4 (GAL4 UAS). La sobre-expressió a una mateixa cèl·lula de llevat de proteïnes "*bait*" i "*prey*" capaces d'interaccionar, o de la proteïna "*bait*" i una proteïna de la llibreria de cDNA capaç de formar un complex específic amb ella, posarà en contacte els dominis DNA-BD i DNA-AD de GAL4 i la proteïna dimèrica així formada activarà la transcripció dels gens anteriors, podent-se seleccionar aquestes cèl·lules en un medi sense His i sense Ade. Les cèl·lules seleccionades, d'altre banda, seran  $\beta$ -galactosidasa positives, el que s'utilitza per a confirmar la interacció.

Així doncs, es va fusionar la regió codificant del gen *PHOR1* (nucleòtids 12 a 1270 del cDNA *PHOR1*) en fase darrera del domini d'unió al DNA de GAL4 (DNA-BD) en el plasmidi pAS2-1, utilitzant les dianes úniques *Bam*HI i *Pst*I, i es va transformar amb aquesta construcció la soca haploid MATa PJ69-2A de llevat ( $\text{His}^-$ ,  $\text{Ade}^-$ ,  $\text{Trp}^-$ ,  $\text{Leu}^-$  i  $\text{Gal}^-$ ). Les cèl·lules transformants es van seleccionar en medi SD-Trp. Per un altre banda, es va preparar una llibreria de cDNA de fulla de *Solanum lycopersicon* la qual es va clonar direccionalment a les dianes *Eco*RI i *Xho*I del vector pGAD424, per a obtenir les proteïnes corresponents fusionades darrera del domini activador (AD) de GAL4. Amb aquesta llibreria es va pre-transformar la soca haploid compatible MAT $\alpha$  Y187 ( $\text{His}^-$ ,  $\text{Ade}^-$ ,  $\text{Trp}^-$ ,  $\text{Leu}^-$  i  $\text{Gal}^-$  i alhora compatible amb la soca MATa PJ69-2A), per tal d'obtenir un mínim de  $1 \times 10^6$  clons independents, ja que s'ha estimat que amb aquest número de

---

clons hi ha una alta probabilitat que hi estiguin representats tots els missatgers de la planta. Les cèl·lules transformades es van seleccionar en medi SD-Leu, es van recuperar de les plaques i plaquejar de nou per a determinar el seu títol. El títol final de la llibreria pre-transformada va ser de  $2 \times 10^8$  cfu/mL.

Les dues soques compatibles prèviament transformades (contenen una d'elles la fusió PHOR1-GAL4BD i l'altre la fusió cDNA-GAL4AD) es van seguidament creuar entre elles, per tal d'obtenir diploids que contenen les dues construccions. Malgrat que la obtenció de la biblioteca de cDNA pre-transformada en llevat és laboriosa i consumeix temps (requereix l'amplificació i preparació de DNA plasmídic de la llibreria escindida, la transformació d'un cultiu de llevat de 2 L, i el plaquejar aquesta transformació a gran escala, titulant i al·liquotant els transformats per tal mantenint-los viables a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), té l'avantatge posterior que el creuament és un experiment molt senzill i reproduïble, en el qual només es precisa de créixer la soca PJ69-2A transformada amb la construcció d'interès (*pAS2-1/PHORI*) i barrejar-la amb la soca pre-transformada amb la llibreria. Al nostre cas es va utilitzar un cultiu de 200 mL de la soca PJ69-2A transformada amb el plàsmid *pAS2-1/PHORI*, el qual es va creuar durant 8 hores a  $30^{\circ}\text{C}$  amb una al·liquota de 500  $\mu\text{l}$  de la llibreria pre-transformada en la soca Y187 ( $1 \times 10^8$  cfu). L'eficiència de creuament entre les cèl·lules MATa i MAT<sup>-</sup>, als experiments de doble híbrid, sol ser de l'ordre del 5-20%. Per tant, amb 500  $\mu\text{l}$  de la llibreria pre-transformada s'obtidria de l'ordre de  $0,5-2 \times 10^7$  diploids cribats. Degut a que el creuament entre soques pre-transformades és molt més eficient que no pas la transformació de la soca portadora de la construcció *pAS2-1/PHORI*, permet que en un volum de cultiu petit, el número de clons cribats sigui elevat. De fet, per a cribar el mateix número de clons independents per co-transformació de les dues construccions en les soques MATa PJ69-2A o MATa AH109 o transformació d'aquestes soques prèviament transformades amb la construcció *pAS2-1/PHORI*, es precisaria d'un volum de cultiu de 1-2 L (veure les comparacions que es mostren a la taula 2 per a tots dos mètodes).

## RESULTATS

**Taula 2.** Comparació dels resultats obtinguts per transformació de la soca haploid MATa AH109, prèviament transformada amb la construcció *pAS2-1/PHOR1*, amb la llibreria de cDNA de *S. Lycopersicon* en el plàsmid *pGAD424* O per creuament entre les soques haploids MATa PJ69-2A transformada amb la construcció *pAS2-1/PHOR1* i la soca compatible MAT Y187 pre-transformada amb la llibreria de cDNA de *S. lycopersicon*.

MÈTODE	VOLUM DE CULTIU	CRIBATGE	EFICIÈNCIA	DIPLOIDS OBTINGUTS
TRANSFORMACIÓ	2 L AH109	50-500 µg	10 <sup>4</sup> cfu/mg DNA	5X10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> cfu
CREUAMENT	500 µL Y197 200 mL PJ692-A	1X10 <sup>8</sup> cfu	10-20%	40-80X 10 <sup>7</sup> cfu

### 3.1.1 La proteïna PHOR1 fusionada al domini d'unió al DNA de GAL4 s'expressa correctament a llevat:

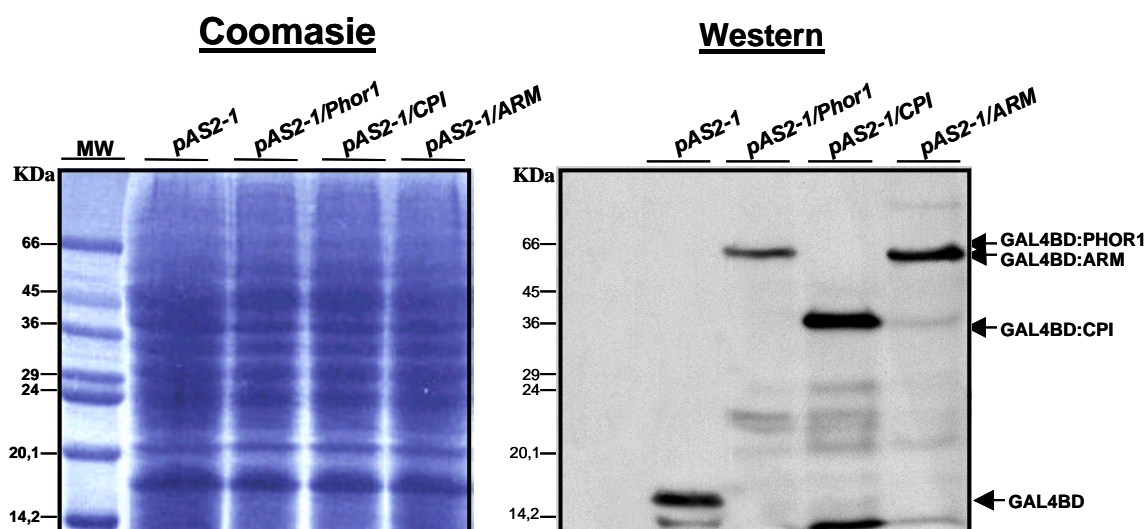
El experiments de doble híbrid a llevat, precisen d'una sèrie de controls previs, per assegurar que el protocol de cribatge funcioni correctament. Per exemple, cal comprovar que la proteïna a estudiar s'expressa correctament a llevat (aquesta comprovació és només possible si s'utilitza un vector com pAS2-1, que rendeix alts nivells d'expressió de la proteïna) i d'altre banda, que aquesta proteïna no es tòxica per la cèl·lula. L'expressió de la proteïna i la seva estabilitat en llevat es pot estudiar per *western blot*, mitjançant immunodetecció dels extractes proteics totals de llevat amb un anticòs específic en front de la proteïna o un anticòs comercial específic pel domini d'unió a DNA de GAL4. La toxicitat de la proteïna, per altre part, dona lloc a un creixement molt lent de les cèl·lules i posteriorment, una molt baixa eficiència de conjugació o transformació. Aquest problema es pot en part solventar utilitzant el vector pGBT9 que presenta nivells més baixos d'expressió de la proteïna de fusió, tot i que en aquest cas no es pot comprovar la correcte expressió de la proteïna per *western* o,



alternativament, fent els experiments de cribatge per co-transformació amb els dos vectors.

A la Figura 23 es mostra l'anàlisi *western* dels extractes totals de llevat corresponents a la soca de PJ69-2A transformada amb el vector pAS2-1 buit, amb la construcció pAS2-1/*PHOR1*, o amb les construccions parcials pAS2-1/*CPI* i pAS2-1/*ARM*, després de l'immunodetecció amb un anticòs monoclonal contra el domini d'unió al DNA de GAL4. Podem observar una banda de 62,4 KDa, que coincideix amb el pes molecular esperat per a la proteïna de fusió GAL4-BD:PHOR1, el que demostra la correcta expressió de la proteïna PHOR1. Les proteïnes parcials GAL4-BD:CPI i GAL4-BD:ARM donaren també bandes amb els pesos moleculars esperats.

D'altra banda, mitjançant l'anàlisi de la  $DO_{600}$  a diferents hores poguérem comprovar que el creixement de la soca que expressava la proteïna GAL4-BD:PHOR1 és bàsicament igual al de la soca PJ69-2A no transformada, i per tant que la proteïna PHOR1 no és tòxica (dada no mostrada).



**Figura 23.** Anàlisi *western* de les proteïnes de fusió GAL4-BD:PHOR1, GAL4-BD:CPI, GAL4-BD:ARM i del domini GAL4-BD expressades en la soca de llevat PJ69-2A.

Es van incubar 40  $\mu$ g dels extractes proteics totals de llevat amb una dilució 1/5000 de l'anticòs monoclonal de ratolí contra el domini d'unió al DNA de GAL4.