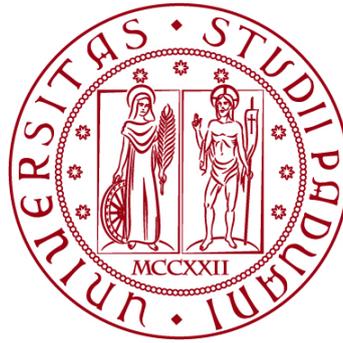


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

# **Controllo optogenetico dell'espressione genica nelle piante**

**Tutor: Prof. Tomas Morosinotto  
Dipartimento di Biologia**

**Laureando: Marco De Gennaro**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# INDICE

1. ABSTRACT .....	5
2. INTRODUZIONE .....	6
2.1 Sistemi di regolazione sintetici e caratteristiche funzionali .....	7
2.2 Optogenetica e piante.....	8
2.3 Descrizione del sistema PULSE .....	9
3. SCOPO DELLA TESI.....	10
4. MATERIALI E METODI .....	10
4.1. Costruzione dei plasmidi.....	11
4.2. Isolamento, trasformazione di protoplasti in <i>A. thaliana</i> e illuminazione .....	11
4.3. Luciferase assay nei protoplasti .....	12
4.4. Trasformazione transiente di <i>N. benthamiana</i> con <i>A. tumefaciens</i> .....	12
4.5. Analisi su <i>N. benthamiana</i> : imaging confocale e ROS burst assay.....	13
4.6. Trasformazione stabile di <i>A. thaliana</i> e Luciferase assay.....	13
4.7. Modello matematico.....	14
5. RISULTATI .....	15
5.1. Combinazione ottimale di PULSE e funzionalità nei protoplasti.....	15
5.2. Espressione PULSE-mediata di attivatore Cas9 derivato e TF vegetale .....	18
5.3. Trasformazione di foglie ed induzione di immunità .....	22
5.4. Transgenesi stabile in linee di <i>A. thaliana</i> .....	25
6. CONCLUSIONI .....	26

7. BIBLIOGRAFIA ..... 29

## 1. ABSTRACT

La regolazione dell'espressione genica permette la sintesi di un mRNA in risposta ad una data condizione ambientale. Quando si modifica del materiale genetico, poter controllare l'espressione spazialmente, temporalmente e quantitativamente, permette un ampio range di applicazioni. Classicamente vengono utilizzati sistemi chimici, basati su piccole molecole, fattori di trascrizione oppure sistemi basati sulla luce (optogenetica) [1]. Nelle piante quest'ultimo strumento è limitato a causa della presenza di sistemi in grado di assorbire la luce e che comportano possibili interferenze con un uso dell'optogenetica. Il sistema PULSE presentato nell'articolo permette una regolazione basata sull'induzione condizionata da luce rossa e non presente nelle normali condizioni di crescita della pianta ovvero luce bianca e di buio. Il sistema presenta un promotore con elementi regolatori che vengono legati da un induttore, attivo solo se presente luce rossa, e un repressore, attivo solo se presente luce blu. Dopo la caratterizzazione delle molecole e delle proprietà funzionali del sistema, si è provveduto a testarlo in variate condizioni ed applicazioni differenti per validarne l'efficacia e l'ampia versatilità. Viene presentato anche un modello matematico in grado di descrivere quantitativamente il comportamento del sistema e predire quali parametri vanno definiti per ottenere determinati output e per ottimizzare l'efficienza.

## 2. INTRODUZIONE

I meccanismi di controllo sono delle caratteristiche fondamentali per l'esistenza ed il corretto funzionamento di tutti gli organismi viventi. Questi meccanismi si basano sulla ricezione di input esogeni o endogeni, l'integrazione in network molecolari e circuiti di decision-making cellulari per conferire un determinato output coerente. L'attuazione dei meccanismi è generalmente permessa da mediatori di segnalazione che possono essere proteine, acidi nucleici o piccole molecole come gli ormoni. I segnali che possono essere recepiti riguardano aspetti della situazione ontogenetico-fisiologica dell'organismo o la presenza di determinanti ambientali che comportano, mediante integrazione codificata e controllata, appropriati adattamenti nello stato metabolico o genetico o strutturale delle singole cellule o dell'organismo intero. La comprensione molecolare, formale inerente all'organizzazione delle reti di regolazione, matematico-quantitativa, permette una sempre maggior capacità di manipolare in maniera mirata le reti metaboliche o di segnalazione endogene al fine di aumentare la comprensione teorica da un lato e l'applicazione biotecnologica e biomedica dall'altro. L'obiettivo fondamentale della contemporanea Biologia Sintetica, branca emergente e interdisciplinare che si occupa dello studio e dell'applicazione di device molecolari, è quindi quello di comprendere e caratterizzare sistemi naturali per poterli manipolare o per farsi ispirare nello sviluppo di nuovi apparati molecolari o sistemi cellulari con determinate caratteristiche di interesse. Il principio fondamentale è che tutta l'informazione necessaria all'esistenza e al funzionamento dei sistemi di controllo sia univocamente codificata nel materiale genetico di un organismo permettendo, mediante l'uso di strumenti per la manipolazione del materiale genetico, di agire a questo livello e variare l'assetto funzionale di un organismo. A differenza della classica Ingegneria Genetica del secolo scorso, nella Biologia Sintetica esistono vari livelli di studio che permettono di ottenere specifiche funzioni complesse in un organismo [2]. In ordine di complessità crescente troviamo il livello della caratterizzazione di molecular switches ovvero

molecole in grado di recepire un particolare input e determinare un output specifico, lo studio e l'implementazione della combinazione di molecular device per ottenere logiche combinatoriali di integrazione del segnale (ad esempio l'induzione di un output solo se si è in presenza di due input contemporaneamente) ed infine veri e propri networks di segnalazione molecolare che presentano proprietà emergenti come l'autoregolazione la periodicità o una sorta di memoria degli stimoli passati. Nell'articolo in esame ci soffermeremo sul livello basale dello sviluppo e caratterizzazione di uno switch molecolare.

### **2.1 Sistemi di regolazione sintetici e caratteristiche funzionali**

I sistemi di regolazione sintetici sono dei sistemi costruiti ad hoc per svolgere funzioni di interesse negli organismi manipolati. Presentano una natura modulare basata su un modulo in grado di recepire un determinato parametro ambientale-interno ed uno effettore in grado di indurre una specifica risposta cellulare. Il meccanismo molecolare sotteso a questa capacità è generalmente la variazione conformazionale indotta dall'interazione con il segnale e che permette o reprime un'interazione specifica. Esistono vari parametri che vengono considerati nel design, costruzione e caratterizzazione funzionale del sistema in esame che concernono il range dinamico (rapporto tra attivazione massima e basale), la leakiness (attività basale in assenza di segnale induttore), la cinetica e la possibilità di reversibilità, l'ortogonalità (la capacità del sistema di non interagire significativamente con porzioni intracellulari conferendo effetti indesiderati), la riproducibilità e la predicibilità generalmente permessa dallo sviluppo di modelli matematici. Esistono fondamentalmente due tipologie principali di interruttori genetici che differiscono per il segnale induttore: chimico o luce dipendente. Per quanto riguarda l'induzione chimica si intende un processo che prevede la presenza di una molecola particolare che induce come effetto una variazione dell'espressione genica. Esistono vari meccanismi molecolari particolari basati su promotori e

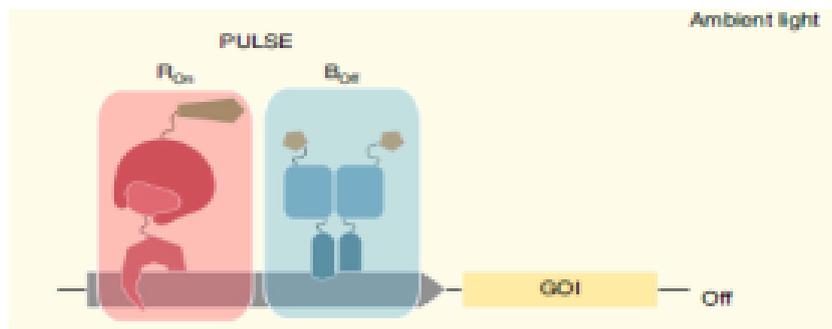
induttori eterologhi, come GAL4-UAS o lac operator-LacI [3], oppure basati sulla tecnologia Cas9 guidata da ormoni [4]. I principali problemi nell'utilizzo di questi sistemi riguardano la precisione di quantità di output prodotta o nella regolazione temporale, entrambe problematiche legate alla persistenza dell'induttore nel mezzo ed alla diffusione. Altri problemi riguardano la potenziale interferenza con i processi cellulari e la tossicità. Per ovviare alcuni di questi problemi sono stati sviluppate metodiche basate sull'induzione luce dipendente di fotorecettori batterici o vegetali e con le stesse caratteristiche formali precedentemente descritte. I principali vantaggi di un approccio di questo tipo sono la precisione di regolazione spazio-temporale, la precisione quantitativa e la non invasività.

## 2.2 Optogenetica e piante

Contrariamente all'utilizzo proficuo di questa tecnica nei mammiferi, nelle piante non è così immediata l'implementazione. La causa risiede nel fatto che le piante sono organismi fotosintetici, quindi, richiedono esposizione alla luce per poter sopravvivere e possiedono pigmenti sensibili alla luce o fotorecettori che potrebbero subire interferenze dalla luce induttrice. Questa esposizione alla luce potrebbe anche portare ad una attivazione non desiderata del regolatore sintetico. Per ovviare questi problemi sono stati sviluppati vari sistemi optogenetici per le piante basati sull'attivazione della red light e inattivazione del far red [5] oppure sull'utilizzo di un fotorecettore per la luce verde in quanto non viene assorbita dai sistemi endogeni [6]. Entrambe queste prime soluzioni presentavano problematiche legate alla compatibilità con la luce bianca oppure dalla necessità di cofattori difficilmente somministrabili alla pianta intera. Le conseguenze sono che si possono usare questi strumenti solo in cellule trasformate transientemente e mantenute in ambiente senza luce.

### 2.3 Descrizione del sistema PULSE

Per un utilizzo più efficace dell'optogenetica nelle piante è necessario sviluppare uno strumento che possa essere utilizzato nell'intera pianta e che non sia compromesso dallo spettro di luce solare. PULSE è uno strumento che rispecchia queste caratteristiche. È un sistema attivo solo se presente luce rossa ed inattivo altrimenti. Questo comportamento è permesso da due fotorecettori ad attività combinatoriale che regolano l'attivazione di un promotore. In particolare, si utilizza un attivatore dipendente da luce rossa ( $R_{On}$ ) basato su un fitocromoB, PhyB fuso al dominio di attivazione VP16 ed E-PIF6 [5] ed un inattivatore ( $B_{Off}$ ) costituito da un dominio di repressione trascrizionale (REP) fuso al fotorecettore EL222 di *Erythrobacter litoralis* che dimerizza in presenza di luce blu e lega la sequenza di DNA C120. Queste molecole sono costitutivamente espresse ed in grado di legare un promotore specifico ( $P_{Opto}$ ) formato dai domini  $(C120)_5$  e  $(etr)_8$  situati upstream a hCMV minimal promoter sequence a cui è fiancheggiato il GOI (fig.1).



**Figura 1.** PULSE composto nell'ordine da: Induttore, Repressore, Promotore regolato, Gene Of Interest

Pertanto, nella condizione di buio si ha il GOI non espresso perché  $R_{On}$  è inattivo per assenza di luce rossa, con luce bianca si ha GOI inespresso perché sia  $R_{On}$  che  $B_{Off}$  sono attivi ma il repressore inibisce l'inizio della trascrizione, in condizioni di sola luce rossa si ha solamente  $R_{On}$  attivo ed espressione del GOI.

### 3. SCOPO DELLA TESI

Questo studio tenta di caratterizzare un sistema molecolare che permetta l'espressione genica nelle piante in determinate condizioni di luce e non altrimenti. Vengono inoltre presentate varie applicazioni nelle foglie e nell'intera pianta per dimostrarne l'efficacia e l'applicabilità biotecnologica.

### 4. MATERIALI E METODI

Vengono utilizzati come organismi sia *Arabidopsis thaliana* che *Nicotiana benthamiana* per applicazioni con protoplasti, in trasfezioni transienti in foglie ed in modificazioni stabili. L'utilizzo di questi organismi modello presenta svariati vantaggi come le piccole dimensioni ed il ciclo vitale breve. Inoltre, la possibilità per entrambi questi organismi di generare facilmente piante transgeniche con l'utilizzo della trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* ne incrementa le possibilità di studio. Per quanto riguarda gli esperimenti è stata effettuata in primis una trasfezione nei protoplasti di *A. thaliana* per andare a caratterizzare e ottimizzare il repressore e per testare la funzionalità dell'intero sistema con anche l'induttore. È successivamente stato sviluppato il modello matematico per la predizione quantitativa del comportamento. Una ulteriore trasfezione del sistema nei protoplasti di *A. thaliana* ha permesso di saggiare l'applicabilità a vari sistemi regolatori, endogeni o sintetici basati su Cas9. Con la trasfezione di foglie di *N. benthamiana* è stata verificata prima l'applicabilità in un sistema multicellulare e poi l'induzione di processi come l'immunità e la localizzazione subcellulare mediante nanobodies. In ultimo sono state create piante transgeniche stabili di *A. thaliana* per verificarne l'applicabilità in un intero organismo.

#### 4.1. Costruzione dei plasmidi

I frammenti di DNA utilizzati per la costruzione dei plasmidi sono stati recuperati per restrizione da plasmidi precedentemente caratterizzati. Dopo la digestione si procede ad un'amplificazione di PCR mediante una polimerasi High Fidelity (Q5 HF DNA Polimerase) e ad un'estrazione dal gel mediante appositi kit. L'assemblaggio dei plasmidi è stato effettuato in vari modi usando il Gibson Assembly o il Golden Gate assembly prima della trasformazione in cellule di *E. coli* competenti per la replicazione del plasmide. In ultimo con kit di purificazione quali Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel) or GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) si estraggono e purificano i plasmidi replicati e si digeriscono per poterli sequenziare e saggiarne la sequenza.

#### 4.2. Isolamento, trasformazione di protoplasti in *A. thaliana* e condizioni di illuminazione

I vari esperimenti per testare la funzionalità di PULSE sono stati effettuati illuminando con differenti lunghezze d'onda dei protoplasti isolati e trasformati con i plasmidi di interesse. I protoplasti sono stati isolati da foglie di piante cresciute per 2 o 3 settimane in un regime di 16 h luce e 8 h buio. Le foglie sono state omogenizzate con un pestello e tenute overnight con una soluzione contenente cellulasi per poi poterne estrarre i protoplasti mediante floatation. La successiva trasformazione dei plasmidi è mediata da polietilen-glicole. Successivamente alla trasformazione i protoplasti sono stati divisi in piastre da 24 pozzetti in aliquote da 960  $\mu\text{L}$  per poter essere illuminate da un diodo con l'appropriata lunghezza d'onda ed intensità luminosa. Le lunghezze d'onda utilizzate sono: blue (461 nm), red (655 nm), far-red (740 nm) e white (4,000 K) con  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Il bianco è stato addizionato con blue e far-red in modo da avvicinarsi

quanto più possibile allo spettro di luce solare. L'emissione degli spettri è stata permessa da uno spettroradiometro (AvaSpec-ULS2048 with fiber-optic FC-UVIR200-2, AVANTES).

#### **4.3. Luciferase assay nei protoplasti**

Il saggio della luciferasi è stato utilizzato per validare l'effetto qualitativo, in termini di funzionamento condizionale desiderato e quantitativo, in termini di relazione tra intensità luminosa per l'induzione del sistema PULSE e l'effetto induttivo del sistema stesso verificato mediante rilevamento della lumiscenza. L'utilizzo di due luminescenze, una reporter regolata da PULSE e l'altra costitutivamente espressa, permette di normalizzare l'effetto della trasformazione dei plasmidi e permettere una misurazione assoluta della lumiscenza. Lo strumento per la misurazione è stato Berthold Centro XS3 LB 960 per FLuc e BertholdTriStar2 S LB 942 per RLuc. Quando possibile viene misurato e considerato il rateo tra le due misure. I protoplasti differenzialmente trasfettati vengono cresciuti in due piastre simultaneamente per poter essere misurate in parallelo.

#### **4.4. Trasformazione transiente di *N. benthamiana* con il batterio *A. tumefaciens***

Per valutare la funzionalità in un sistema multicellulare vengono trasfettate delle foglie di *N. benthamiana*. I ceppi elettro-competenti di *A. tumefaciens* C58 (pM90), GV3101 (pM90), contenenti pSOUP helper plasmid, o AGL1, vengono trasformati con i plasmidi di interesse. I cloni trasformati vengono quindi selezionati mediante antibiotico grazie al marker di selezione plasmidico e come ulteriore conferma dell'avvenuta trasformazione si compie una PCR su estratti di colonie. Colture del batterio trasformate con il costrutto di interesse o con il fattore di virulenza RNA-silencing suppressor p19, vengono incubate per 3 h al buio nella

porzione abassiale della foglia di *N. benthamiana* precedentemente cresciute per 4-5 settimane.

#### **4.5. Analisi su *N. benthamiana*: imaging confocale e ROS burst assay**

L'imaging confocale ha permesso di verificare la localizzazione subcellulare della proteina fluorescente GFP. I campioni sono stati estratti allo stesso tempo da tre differenti aree della foglia di due piante. Per ogni condizione sono state rilevate almeno 6 immagini con 2 fino ad 8 nuclei visualizzati per ogni immagine. Per ogni nucleo è stata selezionata un'area limite in modo da indicare se l'espressione era citoplasmatica o vicino alla membrana. L'emissione è stata rilevata a 500–550 nm mediante un microscopio confocale. Il ROS burst assay è stato effettuato per valutare l'induzione di risposta immunitaria successiva a trasfezione delle foglie di *N. benthamiana* con un fattore di riconoscimento eterologo (At-EFR) e trattamento con l'elemento responsivo immunogeno (elf18). La produzione di ROS è indice di risposta immunitaria in corso. La misurazione è stata effettuata mediante BMG CLARIOstar plate reader dopo aver sottoposto i campioni ad un trattamento che elimina la presenza di ROS prima dell'introduzione dell'elemento inducente (elf18). Viene quindi introdotto 1  $\mu$ M di elf18 e misurata la produzione dei ROS indotta dalla ricezione e trasduzione del segnale mediata da At-EFR.

#### **4.6. Trasformazione stabile di *A. thaliana* e Luciferase assay**

Il ceppo Columbia di *A. thaliana* cresciuto per 4-5 settimane è stato immerso in un mezzo d'inoculo batterico in presenza di un detergente che svolge un ruolo fondamentale per la trasfezione con *A. tumefaciens* (floral dip method). Gli ovuli sono il bersaglio dell'agrobatterio. La generazione T0 è quella infiltrata e i semi della T1 saranno in emizigosi per il transgene. L'autofertilizzazione delle piante T1 permetterà poi di ottenere semi della

generazione T2 eterozigoti e/o omozigoti per il transgene. Sono quindi state selezionate linee transgeniche stabili della T3 in omozigosi per il costrutto di interesse. I semi delle linee transgeniche (24 semi per ogni linea) e dei wild-type (6 semi) sono stati piantati in piastre da 96 pozzetti e tenute per 3-4 giorni al buio a 4°C per essere illuminate per 1h il quarto giorno. Successivamente vengono esposte ad un fotoperiodo di 16 h luce e 8 h buio per altri 4 d. Il quarto giorno si aggiunge 20 µL 1.667 mM del substrato di FLuc, la D-luciferin per poter misurare la luminescenza emessa. Le piastre vengono coperte con un film finemente perforato e la luminescenza viene misurata 1-2 d dopo con un Berthold Centro XS3 LB 960 microplate reader ogni ora per svariati giorni ad una precisa lunghezza d'onda. Il valore medio basale delle wild-type è stato utilizzato per sottrarlo alle transgeniche ad ogni punto.

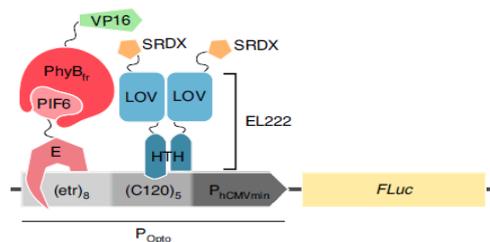
#### **4.7. Modello matematico**

Lo scopo di sviluppare un modello matematico relativo al sistema in esame è duplice: da un lato permette di comprendere quantitativamente la dinamica e le caratteristiche funzionali del sistema e dall'altro di guidare il design sperimentale di applicazioni future per quanto riguarda la scelta ottimale di lunghezza d'onda, intensità, durata. Il modello è un sistema di equazioni differenziali ordinarie la cui parametrizzazione è stata condotta mediante studi di cinetica on/off di PULSE nei protoplasti andando a monitorare i livelli di messaggero e di proteina FLuc. Per caratterizzare soglie di tempo ed intensità luminosa in relazione alla produzione di proteina sono stati condotti esperimenti dose-response basati sulla quantità di risposta ottenuta in funzione dell'input. Successivamente è stato utilizzato il modello per predire, dato un insieme di inputs, i rispettivi outputs raccolti in una Heat Map. È stata osservata una stretta corrispondenza tra i valori predetti dal modello ed i valori misurati negli esperimenti suggerendone la validità.

## 5 RISULTATI

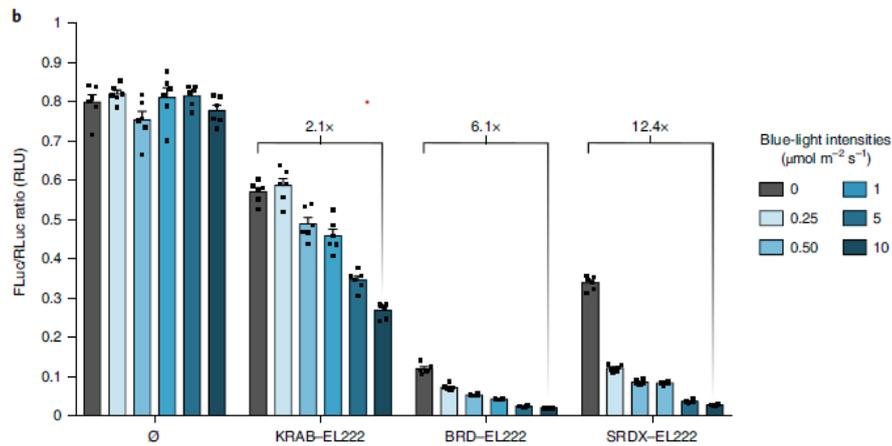
### 5.1. Combinazione ottimale di PULSE e funzionalità nei protoplasti

Il sistema PULSE permette di attivare un gene in sola presenza di luce rossa e non viceversa. Per far ciò è stato disegnato un sistema composto da un repressore ed un attivatore luce dipendenti ed un promotore specifico. Il repressore consiste di un dominio di repressione della trascrizione, in grado di inibire la trascrizione quando è in prossimità della RNA polimerasi, fuso ad un dominio fotorecettore (EL222) in grado di legare una porzione di DNA (C120) solo se è presente luce blu. L'attivatore presenta un dominio di attivazione della trascrizione (VP16 ed E-PIF6) fuso ad un dominio fotorecettore (PhyB) in grado di legare una porzione specifica di DNA (etr) solo se presente luce rossa. Il promotore regolatore ( $P_{Opto}$ ) è formato da 5 domini C120 per il legame con il repressore, 8 domini etr per il legame con l'attivatore ed una minimal promoter sequence (hCMV) che permette l'espressione del GOI. L'intero costrutto genetico PULSE (fig.2) prevede quindi una molecola attivatrice ed una repressiva costitutivamente espresse ed in grado di legare un promotore regolatore posizionato a monte del GOI. In questo modo si ottiene l'espressione del GOI solo nella condizione di presenza dell'attivatore e assenza del repressore cioè solo in presenza di luce rossa.



**Figura 2** Da sx attivatore, in rosso porzione fotorecettiva e legante il DNA, in verde la porzione di induzione della trascrizione. Il repressore con in blu il fotorecettore e in arancione i domini di repressione. Il promotore, nell'ordine da sx, dominio di binding dell'attivatore, del repressore e dominio minimale di espressione. Il sistema regola l'espressione del GOI.

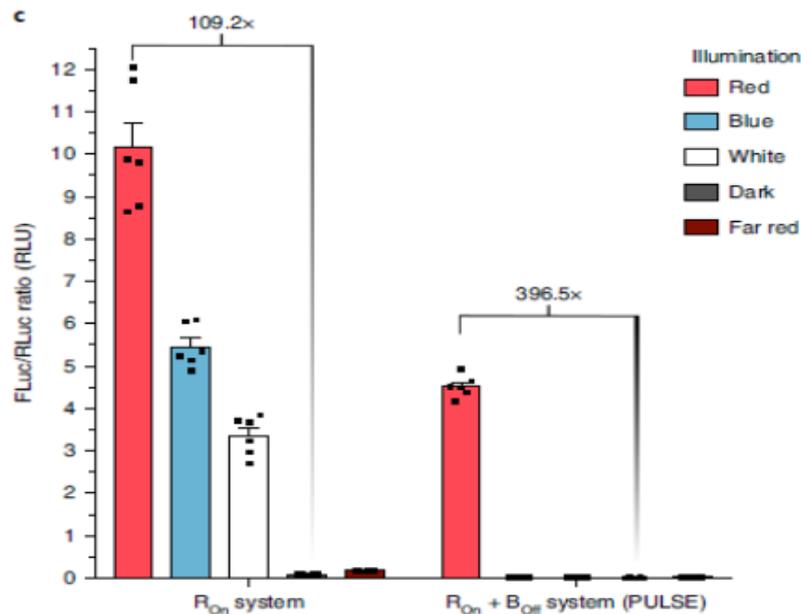
L'attivatore utilizzato è stato precedentemente caratterizzato [5] mentre per la caratterizzazione del repressore vengono testati 3 differenti domini di repressione (KRAB, BRD ed SRDX) rispettivamente fusi al dominio fotorecettore per la luce blu EL222. Viene effettuato un Dual Luciferase Assay in protoplasti di *A. thaliana*. Ognuno dei quattro campioni sotto esame è in grado di esprimere il gene fluorescente RLuc e, nell'ordine (fig. 3), alcun dominio di repressione, il dominio fotorecettore EL222 fuso al dominio di repressione KRAB, BRD o SRDX che regolano l'espressione del gene fluorescente FLuc. Il gene RLuc viene usato per normalizzare i risultati e quindi per poter comparare le misurazioni tra i vari campioni. L'utilizzo del campione senza dominio di repressione permette di avere un controllo negativo che verifica l'espressione costante del gene normalizzatore in ogni altro campione. I campioni vengono illuminati per 18h con luce blu ad intensità differenti (0, 0.25, 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in modo da saggiare l'efficacia di repressione dei domini a varie intensità luminose. Lo scopo dell'esperimento è quello di valutare l'efficienza di repressione dei vari domini in esame mediante la misurazione del rapporto FLuc/RLuc. Ogni campione in esame presenta lo stesso fotorecettore mentre l'espressione del gene FLuc è posta sotto il controllo dei domini di repressione quindi ciò che causa una variazione della quantità di espressione di FLuc e quindi di fluorescenza rilevata è solo l'efficienza di repressione dei domini in esame. Dall'analisi dei risultati (fig. 3) si nota che SRDX è il più efficiente in quanto, sebbene presenti minor repressione assoluta rispetto a BRD, presenta un'efficienza di repressione relativa intra-campione del 92% considerando il rapporto tra la condizione senza luce e quella con il massimo di intensità. Si può notare anche che la lunghezza d'onda considerata e l'intensità non interferiscono con la vitalità delle cellule ed infine che si ha repressione anche in assenza di luce blu.



**Figura 3.** Rapporto FLuc/RLuc in protoplasti esposti per 18h a differenti intensità della stessa lunghezza d'onda, nell'ordine: controllo negativo e domini di repressione sotto esame KRAB, BRD, SRDX

Una volta caratterizzati l'induttore (d'ora in avanti  $R_{On}$ ) ed il repressore ( $R_{Off}$ ), viene saggiato l'utilizzo dell'intero sistema nei protoplasti per validarne l'efficacia funzionale nelle cellule. In un Dual Luciferase Assay vengono illuminati per 18h 2 campioni di protoplasti trasformati rispettivamente con solo  $R_{On}$  o con il sistema PULSE completo. Le condizioni di illuminazione sono  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  di Rosso ( $\lambda = 655 \text{ nm}$ ), Blu ( $\lambda = 461 \text{ nm}$ ), Bianco, Buio, Far red ( $\lambda = 740 \text{ nm}$ ) e permettono di studiare il comportamento in un ampio spettro di lunghezze d'onda. Come gene normalizzatore viene usato RLuc mentre FLuc è il gene reporter sottoposto al controllo di  $R_{On}$  o di PULSE. Dalla relazione esistente tra quantità di fluorescenza emessa e quantità di proteina fluorescente sintetizzata, andando a misurare il rapporto di emissione di fluorescenza si può derivare il comportamento trascrizionale dei due campioni sotto varie condizioni luminose. Si può osservare (fig. 4) come  $R_{On}$  sia attivo maggiormente con luce rossa (sia nella condizione di solo rosso che nella luce bianca contenete rosso) e cross-attivato dalla sola luce blu mentre sia inattivo in assenza di luce o con ultrarosso a dimostrazione della funzionalità e condizionalità del sistema. Viceversa, si nota l'ottimo funzionamento di PULSE che presenta livelli di attivazione quasi nulli in tutte le condizioni non desiderate rispetto all'attivazione nel rosso (396.5 volte più fluorescente delle altre condizioni).

È da notare in ultimo la differenza di intensità (e quindi di proteina espressa) tra  $R_{On}$  e PULSE probabilmente a causa della presenza di  $R_{Off}$  che presenta un'attività inibitoria anche con luce rossa.

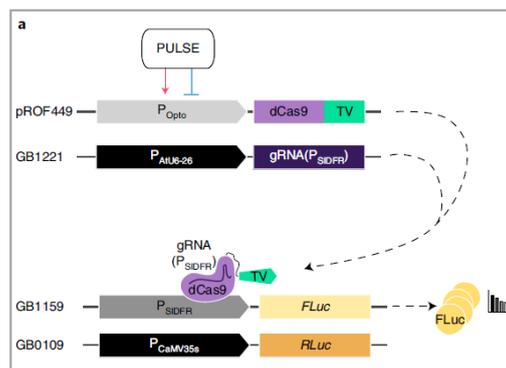


**Figura 4.** A sinistra valori risultanti da  $R_{On}$  in condizioni di illuminazione rossa, blu, bianca, senza luce, far red; a destra il sistema PULSE completo sotto le stesse condizioni di illuminazione

## 5.2. Espressione PULSE-mediata di attivatore Cas9 derivato e TF vegetale

Una prima applicazione interessante riguarda l'induzione controllata da PULSE di fattori di trascrizione sintetici ed endogeni che permette di valutare la funzionalità e l'applicabilità del sistema in esame nell'induzione di differenti tipologie promotoriali. In entrambi i casi si effettua la procedura sperimentale descritta per i primi risultati: Dual Luciferase Assay effettuato in protoplasti trasformati di cui viene misurata la fluorescenza del gene reporter posto sotto regolazione del promotore target. Nel caso dell'induzione mediata dal fattore sintetico viene usato una Cas9 derivante

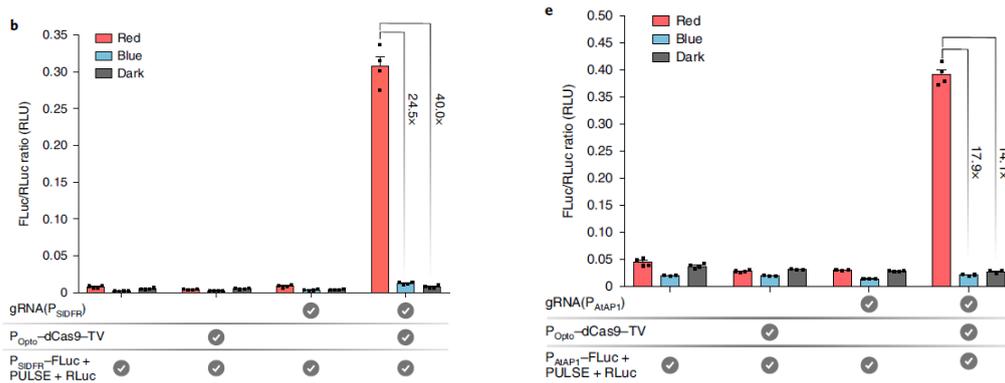
da *Streptococcus pyogenes* deleta della nucleasi e fusa ad un forte dominio di attivazione (fattore: dCas9-TV). Questo fattore di attivazione della trascrizione è sottoposto alla regolazione di PULSE, quindi, dovrebbe essere attivo solo nella condizione di luce rossa. Il fattore dCas9-TV è un attivatore trascrizionale che richiede una guida a RNA per poter legare il promotore di interesse, quindi, viene disegnata anche una guida costitutivamente espressa e complementare al promotore target. Il promotore target ( $P_{SIDFR}$  nel primo test e  $P_{AtAP1}$  nel secondo) regola l'espressione del reporter gene FLuc. Ci si attende che solo in presenza di tutti i componenti e della luce rossa il sistema PULSE sia attivo quindi venga espresso l'attivatore dCas9 che interagendo con la guida a RNA leghi il promotore di interesse e porta alla trascrizione di FLuc e quindi ad emissione di fluorescenza.



**Figura 5.** Descrizione del setup sperimentale: PULSE che regola l'attivazione dell'induttore dCas-TV. Guida ad RNA costitutivamente espressa, in grado di interagire con dCas e di legare per complementarità il promotore di interesse. Promotore di interesse che regola l'espressione del gene reporter. Gene per la normalizzazione.

Sia nel primo che nel secondo test vengono trasfettati protoplasti con sistema PULSE, promotore di interesse a monte del gene reporter FLuc e RLuc costitutivamente espresso. Successivamente vengono identificati 4 gruppi sperimentali aggiungendo, nell'ordine, alcun costrutto, promotore per PULSE che regola l'espressione di dCas9, guida a RNA ed in ultimo sia

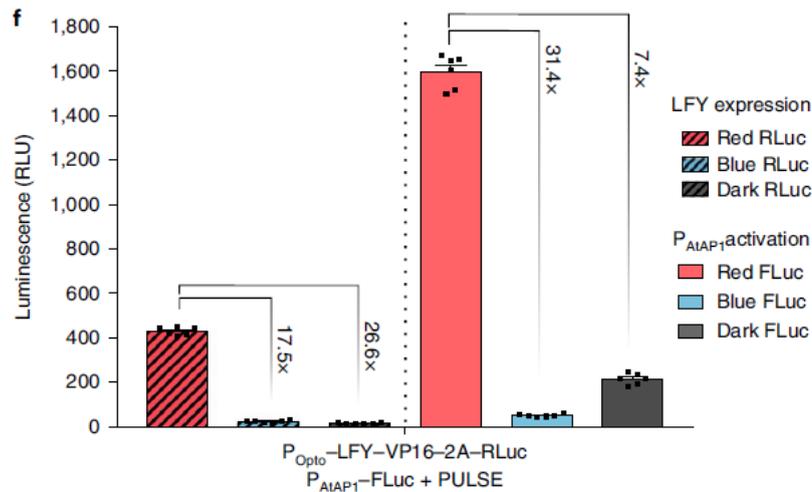
promotore per PULSE che regola dCas9 che la guida a RNA. Ci si aspetterebbe che solo nella quarta condizione che presenta tutti gli apparati molecolari necessari e solo nella condizione di luce rossa che permetterebbe di attivare PULSE, si dovrebbe notare emissione di fluorescenza da FLuc. Nel primo test il promotore target deriva da *Solanum lycopersicum* ( $P_{SIDFR}$ ) e risulta che (fig.6a) l'unica condizione in cui viene espresso il gene reporter è quella che presenta tutti i componenti precedentemente citati coerentemente con le attese. L'induzione sotto luce rossa è significativamente maggiore rispetto al blu (24.5-fold maggiore) e alla condizione di assenza di luce (40.0-fold maggiore). È da notare che il termine assoluto di induzione è notevolmente minore rispetto all'esperimento svolto precedente (da Rateo di 5 a 0.30) probabilmente a causa del doppio sistema di induzione luce / PULSE e dCas9-TV /  $P_{SIDFR}$ . Questo perché nell'esperimento al punto 5.1 il sistema era ad azione 'diretta' con la luce che attiva PULSE che induce l'espressione del reporter. Viceversa, in questo caso, l'azione di PULSE è 'mediata' da un altro fattore e quindi si può avere dissipazione del segnale a causa della diffusione di PULSE o della saturazione del promotore a cui si lega per poter sintetizzare dCas9 che quindi fungerebbe da fattore limitante per la risposta. Queste considerazioni suggerirebbero che in una eventuale applicazione vada considerata sia la 'forza' di PULSE che la relazione con il sistema eventualmente attivato a valle. Nel secondo test si ripete la procedura sperimentale appena usata e gli stessi materiali con la differenza del promotore target ( $P_{AtAP1}$  di *A. thaliana*) e della guida a RNA rispettivamente complementare. Analogamente al primo caso si ottengono gli stessi risultati (fig. 6b) ad indicare che l'applicabilità a promotori differenti è possibile. Si può notare che anche in questo caso il massimale di fluorescenza è paragonabile a quello della fig.6a e non a quello dell'esperimento precedente suggerendo un'evidenza ulteriore alla spiegazione data.



**Figura 6.** Da sinistra condizione con  $P_{SIDFR}$  come promotore target, si nota che l'induzione avviene a livelli significativi solo negli esperimenti in cui è presente la combinazione di guida per dCas9-TV, PULSE e dCas9-TV. L'induzione sotto luce rossa è notevolmente maggiore rispetto alle altre condizioni. A destra condizione con  $P_{AtAP1}$  come promotore target, considerazioni analoghe a sinistra.

Nella seconda applicazione si cerca di esprimere un gene endogeno mediante un fattore di trascrizione di *Arabidopsis*, LFY, in grado di legare la porzione promotoriale  $P_{AtAP1}$ . LFY viene ingegnerizzato fondendolo al dominio di attivazione trascrizionale VP16 ed al gene reporter RLuc mediante la sequenza self-cleaving 2A che determina la sintesi di quantità equi molarli di proteine a partire dallo stesso trascritto. Poiché esiste una relazione nota tra fluorescenza emessa e proteina fluorescente presente, se il quantitativo di RLuc è uguale a LFY grazie al dominio 2A, è possibile conoscere la quantità di LFY intracellulare. Il fattore contenente LFY è regolato dal promotore PULSE-responsivo. Viene utilizzato anche un secondo costrutto comprende  $P_{AtAP1}$  che regola un secondo genere reporter Fluc. I protoplasti vengono suddivisi in due campioni trasformati con o senza LFY PULSE-inducibile ed entrambi contenenti il secondo costrutto  $P_{AtAP1}$ -FLuc. Una volta sottoposti a 3 condizioni luminose: rosso, blu e assenza di luce, si osservano i risultati (fig.7) della condizione con LFY a sx: in ordine notiamo la luminescenza di RLuc che rispecchia l'andamento desiderato da PULSE e che dà anche informazioni sulla quantità di RLuc e quindi di LFY espressa (grazie al modulo 2A). Nella porzione di dx rappresentante il campione con tutti i costrutti possiamo notare che la

luminescenza assoluta di FLuc, derivante dal promotore  $P_{AtAP1}$  indotto da LFY, sia notevolmente maggiore di RLuc derivante dal promotore indotto da PULSE ad indicare un effetto di amplificazione del segnale causato dal fattore di trascrizione LFY.

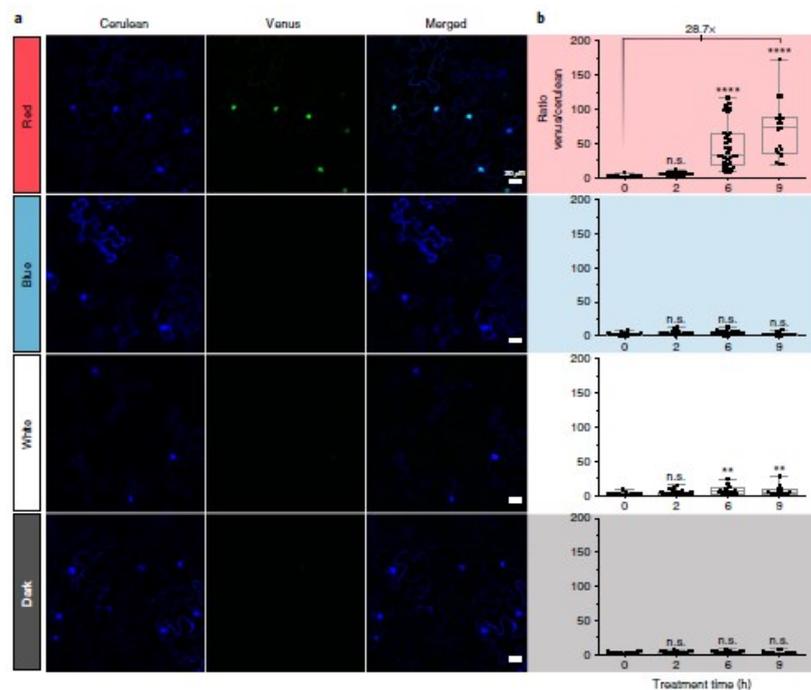


**Figura 7.** Da sinistra condizione con solo LFY espresso sotto la regolazione di PULSE, rilevamento di RLuc basale, a destra luminescenza di FLuc derivante da attivazione del promotore  $P_{AtAP1}$  mediata da LFY

### 5.3. Trasformazione di foglie ed induzione di immunità o targeting subcellulare mirato

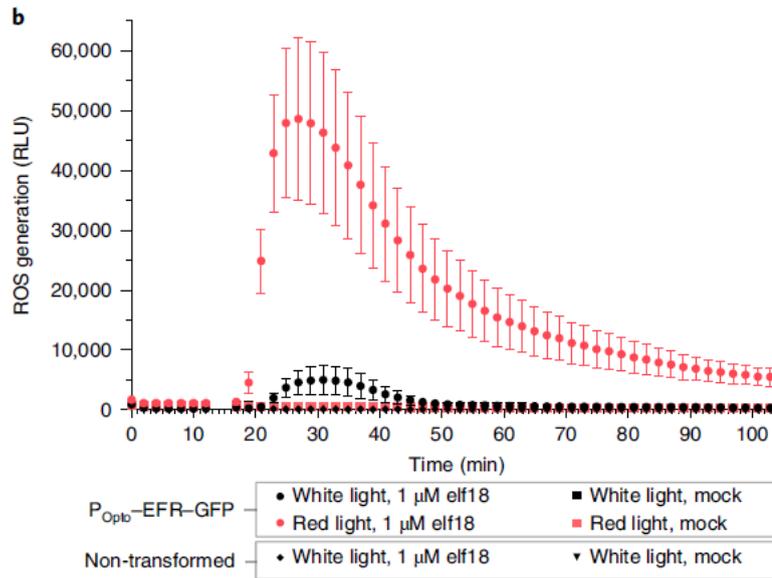
Un ulteriore passo nello studio di PULSE è rappresentato dai test svolti direttamente nella pianta. Per far ciò vengono costruiti un set di vettori che saranno trasformati mediante *A. tumefaciens* in foglie di *N. benthamiana*. I costrutti comprendono un gene reporter (Venus) fuso all'istone H2B per la localizzazione nucleare e controllato da  $P_{Opto}$ , PULSE costitutivamente espresso ed un altro reporter (Cerulean) costitutivamente espresso per la normalizzazione dell'efficienza di trasformazione o come cassetta di selezione. Le foglie infettate con il batterio vengono tenute al buio per 2.5 d per poi essere trattate con luce e misurate mediante microscopia confocale a 2, 6, 9 h. L'esperimento viene triplicato per dare significatività statistica ai dati. L'analisi statistica viene effettuata mediante

test comparativo e si usano differenti P value per ogni condizione: 0.9696, 0.0001 e 0.0001 rispettivamente per 2, 6, 9 h d'illuminazione. Il valore relativo alla condizione di 2h presupporrebbe che vada accettata la quasi totalità dei dati sperimentali quindi si ipotizza che derivi da un errore di battitura in fase di stesura del test. Coerentemente con le attese si nota dalla fig.8 che nelle condizioni di illuminazione diverse dal rosso, che dovrebbero comportare l'inattivazione di PULSE e, quindi, la non espressione di Venus, si ha la sola luminescenza dovuta a Cerulean costitutivamente espresso. Nella condizione con luce rossa che attiva PULSE e quindi Venus, si misura una luminescenza dovuta a quest'ultimo e localizzata a livello nucleare grazie al fattore istonico. Altro aspetto da rilevare è l'andamento crescente di emissione di fluorescenza nel tempo dovuto all'accumulo di proteina fluorescente e all'attivazione saturata di PULSE.



**Figura 8.** Risultati di imaging confocale ottenuti da un sistema di espressione costitutivo per Cerulean (rilevato in ogni condizione di illuminazione) e per Venus regolato dal sistema PULSE. A destra boxplot con i risultati ottenuti dopo 2, 6, 9 h di misurazioni. Si noti la variazione di 28.7-fold tra condizione di controllo e dopo 9 h sotto luce rossa.

Successivamente viene testata un'applicazione riguardante una funzione cellulare. Si ha un esempio di induzione dell'immunità usando *N. benthamiana* che non è in grado di rispondere all'infezione mediata da batteri che presentano il MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) elf18 in quanto priva del fattore EF-Tu receptor. In piante come *Arabidopsis*, EF-Tu recepisce elf18 ed induce un incremento di ROS per combattere l'infezione. È noto che introducendo il fattore eterologo AtEFR di *Arabidopsis* in *N. benthamiana* si induce la possibilità di rispondere a MAMP come elf18 [7]. Nell'esperimento vengono testati due campioni: il primo, di controllo, costituito da cellule non trasformate mentre il secondo composto da cellule dell'epidermide fogliare di *N. benthamiana* trasformate mediante *A. tumefaciens* con un costrutto contenente EFR fuso a GFP e sotto il controllo di PULSE. Viene applicata una soluzione 1  $\mu$ M di elf18 e misurato il livello di produzione di ROS sotto le varie condizioni di illuminazione. Andando a sottoporre i campioni al fattore esogeno elf18 ci si aspetta che nel caso di controllo non siano rilevati ROS in quanto manca il fattore di ricezione-trasduzione del segnale di infezione mentre, nel caso del campione transfettato ci si aspetta produzione di ROS solo in presenza di luce rossa che andrebbe ad attivare PULSE e quindi AtEFR. Dai risultati riportati in fig.9 si osserva che nella condizione di controllo (rappresentata nel grafico da rombi neri) si ha un valore nullo di ROS nonostante l'esposizione al fattore scatenante mentre, nel campione transfettato, si ha produzione di ROS notevolmente maggiore nella condizione di luce rossa (cerchi rossi) rispetto alla condizione di luce bianca (quadrati neri). È da sottolineare che la presenza di ROS nella condizione di luce bianca nel campione transfettato e l'assenza nel campione di controllo, suggerisca l'esistenza di una espressione minima di AtEFR e quindi un non perfetto silenziamento attuato da PULSE in presenza di luce bianca. L'esistenza di una espressione basale dovuta a PULSE è un importante punto da considerare in applicazioni future.

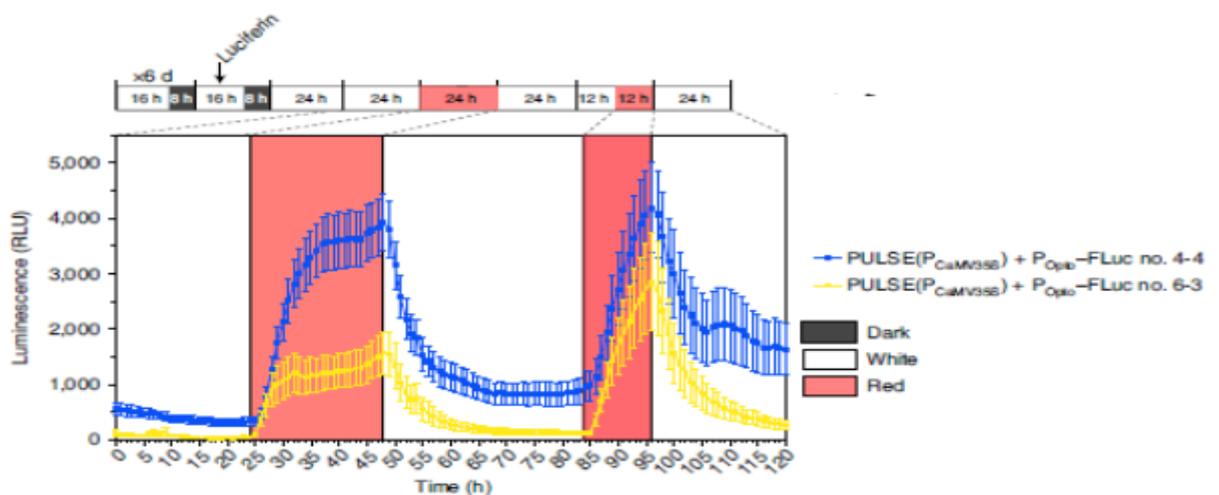


**Figura 9.** Misurazione di ROS indotti da *elf18* nella condizione di controllo senza *EFR* (nella figura linea con ordinata nulla), nella condizione senza e con luce rossa.

#### 5.4. Transgenesi stabile in linee di *A. thaliana*

L'ultimo esperimento mira a testare un'applicazione di PULSE in linee transgeniche stabili. Semi di *A. thaliana* vengono trasfettati con il costrutto contenente FLuc regolato dal promotore PULSE-reattivo, i semi selezionati da un marker vengono fatti crescere e le piante incrociate per due volte fino ad ottenere delle linee omozigotiche di terza generazione per il costrutto. I semi di terza generazione vengono fatti crescere per 7 d prima di essere esposti al substrato per la luciferasi, la D-luciferina, in modo da poter misurare l'emissione di fluorescenza. Dalla misurazione effettuata ad ogni ora per 6 d consecutivi con un fotoperiodo di 16-h luce e 8-h buio (fig.10) si nota che le linee trasfettate 4-4 e 6-3 rispondono positivamente al trattamento con luce rossa mediante emissione di fluorescenza mentre, se riportate in condizione di buio, la fluorescenza decresce per poi riaumentare se nuovamente esposte a luce rossa ad indicare la reversibilità del sistema. Le due linee transgeniche presentano un andamento della luminescenza paragonabile con crescita sotto il rosso e decrescita in altre condizioni benché i livelli assoluti raggiunti per ogni momento siano notevolmente diversi. Questo esperimento potrebbe suggerire due

problematiche: la prima è la differenza di intensità massima di luminescenza misurata trattando le piante con le stesse quantità di luce ovvero una differente responsività del sistema ad uno stesso input. Una soluzione del problema potrebbe essere quello di utilizzare una linea transgenica standard per le varie applicazioni oppure di caratterizzare nell'host di interesse, in ogni nuovo sistema di applicazione, l'emissione di fluorescenza per tenere conto anche dell'incidenza del contesto di funzionamento di PULSE. Il secondo problema riguarda il non raggiungimento di uno zero assoluto in condizioni di buio: sicuramente la luciferasi anche se non espressa ha un tempo di decadenza e quindi ci vorrà del tempo prima di raggiungere il minimo (evidenziabile dalla decrescita graduale del grafico in assenza di luce rossa) però soprattutto nel caso della linea 4-4 non si raggiunge nelle 24h di buio un livello di luminescenza nullo. Questo può essere dovuto o ad un discreto livello basale di espressione nella linea oppure ad un tempo di decadimento della proteina maggiore del tempo di esposizione al buio. Il non raggiungimento di uno stato OFF potrebbe essere un problema in determinate applicazioni, quindi, sarebbe una caratteristica importante da analizzare nel futuro.



**Figura 10.** Misurazione nel tempo della fluorescenza emessa da FLuc in due linee omozigoti transgeniche per il costrutto. In corrispondenza di attivazione di PULSE con luce rossa si ha un'emissione crescente nel tempo ad indicare un maggior numero di FLuc espressa e funzionale. In fase di inattivazione si ha decrescenza dell'intensità dovuta alla degradazione della proteina maggiore rispetto alla sua sintesi (per l'inibizione di PULSE)

## 6. CONCLUSIONI

Dal lavoro in esame si è visto come il sistema PULSE possa essere utilizzato sia per applicazioni di tipo biotecnologico, come l'induzione di immunità ad un MAMP in *N. benthamiana*, sia per studiare dei processi o dei complessi macromolecolari. L'utilizzo nella regolazione dell'espressione genica di sostanze chimiche come regolatori porta ad una serie di svantaggi dovuti alla limitata risoluzione spazio-temporale, alla diffusione delle molecole nel mezzo, alla potenziale tossicità o cross-reattività con altre molecole presenti ed alla lentezza di de-induzione del sistema (che necessita la degradazione o inattivazione della molecola da parte dell'apparato cellulare). [1] L'utilizzo della luce come sistema di induzione permette di superare alcuni di questi vincoli. Per quanto riguarda PULSE, le principali novità e punti di forza rispetto ai sistemi optogenetici precedentemente [5,6] sviluppati per le piante sono l'assenza di responsività alla luce ambientale, condizione necessaria alla crescita dell'organismo, e l'attivazione condizionata ad uno specifico e ristretto spettro di lunghezza d'onda, entrambe caratteristiche che permettono l'attivazione controllata dall'operatore solo in presenza di luce rossa. Ovviamente uno delle possibili controindicazioni dell'utilizzo di questo sistema deriva dal possibile cross-talk dovuto al modulo proteico induttore e repressore. In particolare, l'attenzione ricadrebbe sul repressore che potrebbe interagire con il signaling di PhyB. Un tentativo di soluzione del problema è stato quello di utilizzare solo la porzione N-terminale di PhyB-PIF6, porzione fotoricettrice dell'attivatore, che dovrebbe diminuire la probabilità di cross-reazione. Anche l'utilizzo di EL222 volutamente scelto di origine batterica dovrebbe minimizzare questa eventualità. Altri accorgimenti da tenere in considerazione sono la responsività differenziale del sistema ad uno stesso input, come evidenziato dagli esperimenti con linee transgeniche, ovvero la difficile predicibilità quantitativa della relazione input-output. Altra caratteristica da prendere in considerazione è che il sistema ha più volte dimostrato di non presentare, nella condizione di luce inattivante, uno stato di inattivazione totale ma uno stato di espressione

basale. Entrambi questi accorgimenti andrebbero considerati nello specifico e adattati ad ogni situazione particolare di applicazione. Lo sviluppo di un modello quantitativo ne dimostra l'importanza sia relativamente all'ambito della biologia, per quanto riguarda la comprensione e descrizione precisa di proprietà e processi di un sistema come nel caso della definizione computazionale di un range dinamico, sia per il risvolto biotecnologico-applicativo in quanto permette di definire anticipatamente quali valori di intensità luminosa, di lunghezza d'onda e per quanto tempo è meglio esporre il sistema per ottenere una specifica quantità di prodotto. Gli autori suggeriscono prospettive future di applicazione o estensione nell'uso di PULSE in particolare riguardo alla possibilità di porlo sotto la regolazione di promotori tessuto specifici andando quindi ad aumentare la possibilità di controllo spaziale. La principale caratteristica che andrebbe sperimentata riguarda il range di applicazione del sistema dovuto alla differente forza di un promotore tessuto-specifico rispetto a quello costitutivo usato per la caratterizzazione nell'articolo. Un'altra possibile innovazione riguarderebbe l'introduzione di una regolazione mediata dalla luce nei processi cellulari e non più nella regolazione dell'espressione genica, così come già avviene nei mammiferi. Ad esempio, sistemi di recettori, chinasi, trasportatori regolati dalla presenza/assenza di una particolare lunghezza d'onda oppure da proteine specifiche con moduli che ne regolino la localizzazione o la degradazione luce-dipendente.

## 7. Bibliografia

1. **Andres, J., Blomeier, T. & Zurbriggen, M. D.** Synthetic switches and regulatory circuits in plants. *Plant Physiol.* 179, 862–884 (2019).
2. **Cameron, D., Bashor, C. & Collins, J.** A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* 12, 381–390 (2014).
3. **Wilde RJ, Shufflebottom D, Cooke S, Jasinska I, Merryweather A, Beri R, Brammar WJ, Bevan M, Schuch W** Control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator-repressor system. *EMBO J* 11: 1251–1259 (1992).
4. **Khakhar A, Leydon AR, Lemmex AC, Klavins E, Nemhauser JL** Synthetic hormone-responsive transcription factors can monitor and reprogram plant development. *eLife* 7: e34702 (2018).
5. **Müller, K. et al.** A red light-controlled synthetic gene expression switch for plant systems. *Mol. Biosyst.* 10, 1679–1688 (2014).
6. **Chatelle C, Ochoa-Fernandez R, Engesser R, Schneider N, Beyer HM, Jones AR, Timmer J, Zurbriggen MD, Weber W.** A Green-Light-Responsive System for the Control of Transgene Expression in Mammalian and Plant Cells. *ACS Synth Biol.* (2018) 7(5):1349-1358
7. **Lacombe, S. et al.** Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 28, 365 (2010).

ARTICOLO:

**Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light**

(<https://www.nature.com/articles/s41592-020-0868-y>)