



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Identificación del interactoma de proximidad de la proteína
CEREBLON de *Arabidopsis thaliana* mediante marcaje de
proximidad con TurboID

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Donderis Fagoaga, Carla

Tutor/a: Lozano Juste, Jorge

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

Identificación del interactoma de proximidad de la proteína CEREBLON de *Arabidopsis thaliana* mediante marcaje de proximidad con TurboID

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Universitat Politècnica de València (UPV) – Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-CSIC)

Autora: Carla Donderis Fagoaga

Tutor: Jorge Lozano Juste

Curso académico 2024-2025

Valencia, 10 de Enero de 2025

Identificación del interactoma de proximidad de la proteína CEREBLON de *Arabidopsis thaliana* mediante marcaje de proximidad con TurboID

RESUMEN

El estrés abiótico supone un grave impacto en el crecimiento, productividad y calidad nutricional de los cultivos. Un abordaje innovador para identificar proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y descubrir sus mecanismos subyacentes es el marcaje de proximidad basado en biotina. Un gran avance en el campo del marcaje de proximidad ha sido TurboID, una biotina ligasa desarrollada a través de la evolución dirigida. TurboID presenta diferentes ventajas respecto a los enzimas empleados tradicionalmente en el marcaje de proximidad, como su naturaleza no tóxica, su elevada eficiencia catalítica o su rápida dinámica de marcaje. Esta técnica ha demostrado especial eficacia en la detección de proteínas que interactúan débil o transitoriamente con la proteína de interés, así como en la identificación *in vivo* de proteomas locales restringidos espacial o temporalmente. CRBN es una proteína con actividad E3-ligasa muy importante en humanos, puesto que algunas mutaciones en esta proteína se relacionan con enfermedades graves como el retraso mental. A pesar de que se ha estudiado ampliamente en humanos, debido a su importancia como diana de fármacos basados en la tecnología PROTAC, no ha sido estudiada en plantas. En el laboratorio hemos identificado AtCRBN como el ortólogo funcional de HsCRBN en plantas. En este proyecto hemos aplicado la biología molecular para clonar diferentes fusiones de *TurboID_AtCRBN*, que nos han permitido realizar experimentos de expresión transitoria acoplada a microscopía confocal, empleando *Nicotiana benthamiana* como planta modelo. Tras la expresión transitoria de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN, analizamos su localización subcelular, que resultó ser núcleo-citoplasmática. A continuación, optimizamos el proceso de marcaje de proximidad basado en biotina, también mediante la expresión transitoria de las proteínas de fusión en hojas de *N. benthamiana*. Llevamos a cabo el proceso de marcaje de proximidad e identificamos mediante proteómica cuantitativa 10 proteínas candidatas a interactuar con AtCRBN *in vivo*. Dos de ellas, SGT1 y Hsp70, destacaron por su implicación previamente descrita en la formación de complejos E3-ligasa SCF y en el sistema de degradación proteica del Ubiquitina-Proteasoma. Paralelamente, también generamos plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN. Estas nuevas proteínas identificadas nos sugieren que AtCRBN forma parte de complejos E3-ligasa de tipo SCF en plantas y no de complejos CRL4 como está descrito en el caso de humanos. Estos datos nos ayudarán a desarrollar nuevos abordajes, empleando los complejos E3-ligasa como diana de pequeñas moléculas. Estas moléculas son los PROTACs, que destacan por su importancia en las nuevas terapias de degradación selectiva de proteínas diana en biomedicina. Mediante la selección de las dianas apropiadas a degradar, podríamos desarrollar PROTACs capaces de aumentar la resiliencia de las plantas frente al cambio climático, contribuyendo a alcanzar el Objetivo de Desarrollo Sostenible "Acción por el Clima".

Palabras clave:

TurboID; Cereblon (CRBN); complejos de proteínas; proteómica; transgénica; *Arabidopsis thaliana*; *Nicotiana benthamiana*.

Identification of the proximity interactome of CEREBLON protein of *Arabidopsis thaliana* through proximity labeling with TurboID

ABSTRACT

Abiotic stresses severely impact growth, productivity, and nutritional quality of crops. One innovative approach to identify stress-responsive proteins and unravelling their underlying molecular mechanisms is Biotin-based Proximity Labeling. A groundbreaking development in the field of Proximity Labeling is TurboID, a biotin ligase that has emerged through directed evolution. TurboID offers several distinct advantages over traditional protein-labeling enzymes, such as its non-toxic nature, time-saving capabilities, and remarkable catalytic efficiency. This technique has proven particularly effective in detecting transient or weak protein interactions, as well as revealing spatially or temporally restricted local proteomes within living cells. CRBN is an E3-ligase very important in humans, as mutations on this protein are related to serious diseases such as mental retardation. Although it has been deeply studied in humans, due to its importance as target of PROTAC-based drugs, it has not been fully explored in plants. In the laboratory we have identified AtCRBN as the functional counterpart of HsCRBN in plants. In this project we have applied molecular biology to clone different *TurboID_AtCRBN* fusions, enabling transient expression experiments coupled with confocal microscopy, using *Nicotiana benthamiana* as a model plant. After transient expression of GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN and GFP-TurboID_linker_AtCRBN fusion proteins, we analysed their subcellular localization, which was found to be nucleocytoplasmic. In the next step, we optimized the Biotin-based proximity labeling process, also with transient expression of fusion proteins in *N. benthamiana* leaves. We performed the proximity labeling assay and identified by quantitative proteomics 10 candidate proteins of being interacting *in vivo* with AtCRBN. Two of them, SGT1 and Hsp70, stood out because of their previously reported roles in E3 ligase complexes and in the Ubiquitin-Proteasome System. At the same time, we also generated transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN and GFP-TurboID_linker_AtCRBN fusions. This newly identified proteins suggest that AtCRBN is part of SCF E3-ligase complexes in plants and not part of CRL4 complexes as described in humans. These findings will help us to develop novel approaches, using E3-ligase complex as the target of small molecules. These molecules are PROTACs, which stand out due to their contribution in the new therapies based on targeted protein degradation in biomedicine. Choosing the appropriate degradation targets, we could develop PROTACs that increase plant resilience to climate change, directly contributing to achieve the Sustainable Development Goal number 13, "Climate Action".

Key words:

TurboID; Cereblon (CRBN); protein complex; proteomics; transgenic; *Arabidopsis thaliana*; *Nicotiana benthamiana*.

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Relación del TFM “Identificación del interactoma de proximidad de la proteína CEREBLON de *Arabidopsis thaliana* mediante marcaje de proximidad con TurboID” con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE	ALTO	MEDIO	BAJO	NO PROCEDE
ODS 1. Fin de la pobreza.			X	
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.			X	
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

La agricultura es el denominador común entre dos de los mayores problemas que enfrenta nuestra sociedad actualmente: el aumento de la población previsto para 2050 (llegando a 9.600 millones de personas) y el incremento de los fenómenos climatológicos extremos como la sequía, que se ven agudizados por el cambio climático. El sector de la agricultura consume alrededor del 70% de las reservas de agua dulce, y aun así no es capaz de paliar los efectos que provoca el estrés por sequía en los cultivos, causando graves pérdidas en la producción. A esta merma en el rendimiento de los cultivos ha de sumarse el crecimiento de la población mundial, que se estima que en los próximos 15 años exigirá un aumento del 70% de la producción de los cultivos básicos. La convergencia de ambos problemas deriva en la necesidad de encontrar soluciones que permitan garantizar la seguridad alimentaria a nivel global en un contexto de cambio climático. Este gran reto ha sido acuñado con el término Revolución Azul, y ha pasado a ser considerado por las Naciones Unidas una “prioridad urgente”. Dado que el presente trabajo se orienta hacia el desarrollo de moléculas químicas capaces de proteger a los cultivos de la sequía, aumentando su rendimiento bajo dicho estrés, los Objetivos de Desarrollo Sostenible más relacionados son “Hambre cero” y “Acción por el clima”.

En primer lugar, el objetivo 2 “Hambre cero” persigue el aumento del rendimiento agrícola acompañado de una producción alimentaria sostenible. La aplicación de PROTACs a cultivos básicos como el trigo o el arroz permitirá aumentar la productividad de dichos cultivos en regiones donde la disponibilidad de agua es limitada, contribuyendo a su vez a la consecución del objetivo 3 “Salud y bienestar”. Una vida saludable es absolutamente incompatible con el padecimiento de hambre severa, situación en la que se encuentran actualmente cerca de 135 millones de personas, y que se agravará en los próximos años si no somos capaces de remediar los efectos de la sequía en los cultivos. Además, este trabajo contribuirá al desarrollo de herramientas que permitan mantener la producción agraria con un menor gasto de recursos hídricos, relacionándose así con el objetivo 12 “Producción y consumo responsables”.

Por último, el objetivo 13 “Acción por el clima” insta a proveer a los países de herramientas para lidiar con los efectos del cambio climático. Dentro de estas herramientas podrían englobarse los PROTACs aplicados a la agricultura. Para el desarrollo de esta tecnología es necesario un estudio previo de la proteína CEREBLON en plantas, que permita conocer sus interactores y su función. Este trabajo se centra en la obtención de dicha información, contribuyendo al desarrollo de estas herramientas para hacer frente a los efectos del cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este último año, he dedicado gran parte de mi tiempo a este Trabajo de Fin de Máster, por lo que quisiera agradecer a todas aquellas personas que de un modo u otro han formado parte de él, acompañándome y haciendo de esta, una bonita etapa.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Jorge Lozano Juste, por haber confiado en mí para llevar a cabo los primeros pasos de uno de los proyectos centrales del Grupo, permitiéndome continuar con mi Trabajo de Fin de Grado. Gracias por tu entrega, por demostrar que te gusta tu trabajo y ser capaz de transmitir ese interés y motivación a mí y a todo el equipo. Agradezco enormemente tu cercanía y lo fácil que me ha sido tratar contigo siempre, sintiéndome acompañada, escuchada y valorada en todo momento.

Quiero agradecer también a todo el Chemical Biology Group los consejos que me han dado a lo largo del desarrollo experimental, por estar siempre dispuestos a explicarme con una sonrisa todo lo que saben y a ayudarme cuando lo he necesitado. En especial, quiero dar las gracias a María González, por ser mi guía y mi *hermanita mayor* en el laboratorio. Gracias por resolver mis dudas y respaldarme moralmente en las decisiones que tomo cuando Jorge no puede hacerlo; por tener siempre tiempo para escucharme y por nuestras “charlas” con *Paco*.

Agradezco también a María, a Laura y a Claudia su apoyo, por haber estado siempre ahí con una sonrisa o una palabra bonita que dedicarme, y ser capaces de hacer del ambiente del laboratorio un lugar de risas y no sólo de trabajo. Y, en general, a todo el Labo 1.10, en el que me acogieron desde el principio y me han hecho sentir como en casa.

Además, quiero destacar la importancia de mis amigos del máster, que me han acompañado durante esta etapa. Les agradezco las tardes después de clase, las comidas de *tupper* todos juntos, las tartas y cumpleaños sorpresa celebrados, los partidos de vóley y las fiestas que tanto hemos disfrutado. Gracias a todos ellos y, especialmente, a Yolanda, por las muchas horas de clase juntas intentando atender en vez de estar de *charreta*, por los interminables trabajos en nuestro *sofá de la inspiración* y por ser mi confidente; a Gabriel, por endulzar esta etapa de máster, no por ser un excelente cocinero (que también), sino por todas las bromas y risas volviendo a casa y en las muchas tardes juntos; a Xulia, por la paz que siempre me han dado las charlas con ella, ayudándonos mutuamente a desconectar entre risas, y por esa forma de ser tan suya que siempre me hace sentir valorada; y a Andrea, por sacarme una sonrisa en sus muchas visitas durante tardes interminables, por compartir conmigo horas de deporte y por nuestras maravillosas charlas en mitad del pasillo en las que nos daría tiempo a hacernos tres cafés.

También quiero dar las gracias a Luchi y a Jaume que, una a más de 300 km de distancia y otro siempre cerca han mostrado, cada uno a su manera, su interés y apoyo en forma de cariño. Gracias por comprender la importancia de este trabajo para mí, por demostrarme siempre vuestra confianza y por celebrar mis alegrías como si fueran las vuestras. A Nara, por ese interés genuino en mi trabajo a pesar de no tener ninguna relación con este ámbito, por esa curiosidad incansable y por no conformarse con entender que “estudio plantas”, yendo más allá y poniendo en valor la importancia y repercusión de la biotecnología vegetal en la sociedad.

Por último, agradecerles a mi madre y mi padre todas las oportunidades que me han brindado desde pequeña, implicándose en mi educación y formación más allá de lo académico. Gracias por vuestro constante apoyo, por vuestros sabios consejos y por ese orgullo silencioso que siempre me demostráis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La proteína E3 ligasa Cereblon y los complejos CRL4	1
1.2. Degradación dirigida de proteínas: PROTACs	4
1.3. Marcaje de proximidad	5
1.4. Antecedentes	9
1.5. Hipótesis	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Material bacteriano	12
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	12
3.1.1.1. Cepas empleadas	12
3.1.1.2. Medio y condiciones de cultivo	12
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.1.2.1. Cepas utilizadas	12
3.1.2.2. Medio y condiciones de cultivo	12
3.2. Material vegetal	12
3.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
3.2.1.1. Material vegetal.....	12
3.2.1.2. Condiciones de cultivo	12
3.2.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	13
3.2.2.1. Material vegetal	13
3.2.2.2. Condiciones de cultivo	13
3.3. Métodos con ácidos nucleicos	13
3.3.1. PCR de solape para la amplificación y clonación de <i>TurboID_AtCRBN</i>	13
3.3.1.1. Diseño de cebadores	13
3.3.1.2. Condiciones de amplificación de <i>TurboID</i> por PCR	13
3.3.1.3. Condiciones de amplificación de fusiones <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> por PCR de solape	14
3.3.2. Reacción TOPO de clonación	15
3.3.3. Reacción LR de clonación	15
3.3.4. Extracción de DNA plasmídico	16
3.3.5. Digestiones con enzimas de restricción de los plásmidos pCR8, pMDC43 y pAlligator2	16
3.3.6. Electroforesis de agarosa	17
3.3.7. Secuenciación y alineamiento de secuencias	17

3.4. Métodos con material bacteriano	18
3.4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	18
3.4.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
3.4.3. Glicerizados	18
3.5. Métodos con material vegetal	18
3.5.1. Transformación estable en <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.5.2. Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	19
3.5.2.1. Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	19
3.5.2.2. Infiltración con biotina	19
3.6. Métodos con proteínas	19
3.6.1. Extracción de proteínas a partir de material vegetal	19
3.6.2. Cuantificación de proteínas por Bradford	19
3.6.3. Western blot	20
3.6.4. Enriquecimiento en proteínas biotiniladas	20
3.6.5. Proteómica	20
3.7. Microscopía confocal láser	21
3.7.1. Preparación de muestras	21
3.7.2. Condiciones de adquisición de imágenes	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Clonaje de fusiones <i>TurboID_AtCRBN</i>	22
4.1.1. Amplificación por PCR de solape de <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i>	22
4.1.2. Clonaje de <i>TurboID</i> , <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pCR8/TOPO/GW	24
4.1.3. Clonaje de <i>TurboID</i> , <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pMDC43	26
4.1.4. Clonaje de <i>AtCRBN</i> , <i>TurboID</i> , <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pAlligator2	29
4.2. Expresión transitoria y localización subcelular de GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN	31
4.3. Optimización de las condiciones de marcaje de proximidad con biotina (<i>TurboID</i>) en <i>N. benthamiana</i>	33
4.4. Identificación de interactores de AtCRBN mediante TurboID acoplado a proteómica ...	34
5. DISCUSIÓN	38
5.1. Líneas futuras	43
6. CONCLUSIONES	44
7. BIBLIOGRAFÍA	45
8. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del complejo CRBN-DDB1.....	2
Figura 2. Representación del complejo CRL4(CRBN).....	3
Figura 3. Representación de la estructura y modo de acción de una molécula PROTAC.....	4
Figura 4. Flujo de trabajo seguido en la identificación de interacciones proteína-proteína mediante marcaje de proximidad basado en biotina en <i>Nicotiana benthamiana</i>	8
Figura 5. Estrategia de clonación mediante tecnología Gateway para el clonaje de un inserto de interés.....	16
Figura 6. Protocolo de transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante <i>floral dip</i>	18
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% de <i>TurboID</i> amplificado por PCR	22
Figura 8. Estrategia de amplificación por PCR de solape	22
Figura 9. Amplificación de los fragmentos necesarios para la PCR de solape de <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i>	23
Figura 10. Comprobación del clonaje de <i>TurboID</i> en pCR8.....	24
Figura 11. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_AtCRBN</i> en pCR8.....	25
Figura 12. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pCR8.....	26
Figura 13. Comprobación del clonaje de <i>TurboID</i> en pMDC43.....	27
Figura 14. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_AtCRBN</i> en pMDC43.....	28
Figura 15. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pMDC43.....	28
Figura 16. Comprobación del clonaje de <i>TurboID</i> en pAlligator2.....	29
Figura 17. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_AtCRBN</i> en pAlligator2.....	30
Figura 18. Comprobación del clonaje de <i>TurboID_linker_AtCRBN</i> en pAlligator2.....	30
Figura 19. Comprobación del clonaje de <i>AtCRBN</i> en pAlligator2.....	31
Figura 20. Comprobación de la expresión y localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN.....	32
Figura 21. Optimización de la concentración de biotina exógena requerida para la biotilación basada en TurboID en hojas de <i>N. benthamiana</i>	33
Figura 22. Seguimiento del proceso de enriquecimiento en proteínas biotiladas.....	35
Figura 23. Identificación de candidatos interactores de <i>AtCRBN</i> mediante marcaje de proximidad acoplado a proteómica cuantitativa.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes y condiciones empleadas en la amplificación por PCR de <i>TurboID</i>	13
Tabla 2. Componentes y condiciones empleadas en la amplificación por PCR de <i>TurboID</i> y <i>AtCRBN</i> para PCR de solape	14
Tabla 3. Componentes y condiciones empleadas en la PCR de solape para la amplificación de <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i>	14
Tabla 4. Componentes de la reacción para la adición de A en el extremo 3' de <i>TurboID_AtCRBN</i> y <i>TurboID_linker_AtCRBN</i>	15

LISTADO DE ABREVIATURAS

AirID	<i>Ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification</i>
APEX	<i>Engineered Ascorbate Peroxidase</i>
AP-MS	Purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas
Aux/IAA	<i>Auxin/Indole-3-Acetic Acid</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BIN2	Brassinosteroid insensitive 2
BioID	<i>Proximity dependent Biotin Identification</i>
coIP	Coinmunoprecipitación
CRBN	Cereblon
CRL	Cullin-RING E3 ligasa
CRL4	Cullin-4-E3 ligasa
DCAF	<i>DDB1-cullin 4-associated factor</i>
DDA	<i>Data Dependent Analysis</i>
DDB1	<i>Damaged specific DNA Binding protein 1</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
DCP1	<i>Decapping enzyme 1</i>
HECT	<i>Homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
CHMP1B	<i>Charged multivesicular body protein 1B</i>
IMiDs	<i>Immunomodulatory Drugs</i>
IP	Inmunoprecipitación
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
LC-MS/MS	Cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem
LFQ	<i>Label-Free Quantification</i>
LLD	Dominio Lon-like
EF1a	<i>Elongation factor 1-alpha</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding leucine-rich repeat</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	<i>Proximity Labeling</i> , marcaje de proximidad
PPI	<i>Protein-Protein Interaction</i> , interacción proteína-proteína
PROTACs	<i>Proteolysis Targeting Chimeras</i>
PUP-IT	<i>Pupylation-based Interaction Tagging</i>
PYL	<i>PYR1-like</i>
PYR1	<i>Pyrabactin Resistance 1</i>
RBR	RING-In Between-RING
RBX1	<i>RING Box Protein 1</i>
RCAR	<i>Regulatory Components of ABA Receptors</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
SCF	Skp1- Cullin1- F-box
SDS-PAGE	Sodio de dodecil sulfato - gel de electroforesis de poliacrilamida
SGT1	<i>Suppressor of G2 allele of Skp1</i>
TBD	<i>Talimide Binding Domain</i> , dominio de unión a la talidomida
TMT	<i>Multiplexed Tandem Mass tag isobaric labeling</i>
TPD	<i>Targeted Protein Degradation</i> , degradación dirigida de proteínas diana
UPS	Ubiquitin - Proteasome System
HSP70	Heat shock protein 70
Y2H	<i>Yeast two-Hybrid</i>

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es fundamental para abastecer alimentariamente a la población. Una población en constante aumento que, según lo previsto para 2050 por la organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), demandará un aumento del 70% de la producción de cultivos básicos (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Este crecimiento exigirá a su vez un aumento en el consumo de agua para alcanzar el rendimiento necesario. Sin embargo, resulta imprescindible añadir a la ecuación el cambio climático y sus efectos que, sin duda, juegan en nuestra contra. Las plantas se ven constantemente sometidas a estreses abióticos como la sequía, el aumento de las temperaturas o la elevada salinidad del suelo. Estreses que se agravan a causa del cambio climático, que acentúa los fenómenos meteorológicos extremos (Fedoroff *et al.*, 2010). Frente a este escenario, resulta urgente un cambio en las prácticas agrícolas que nos permita aumentar el rendimiento de los cultivos básicos en condiciones de sequía. Así lo ha expresado Naciones Unidas, que considera la Revolución Azul una prioridad. Esta persigue el diseño de soluciones innovadoras que garanticen la seguridad alimentaria en un contexto cada vez más extremo. Teniendo en cuenta que las sequías de los últimos años han reducido la productividad en los cultivos un 60%, y que hay poblaciones cuya alimentación se sustenta en cultivos básicos como el trigo o el arroz, resulta urgente establecer medidas que protejan la seguridad alimentaria (Pennisi, 2008).

Para atender a la demanda de las Naciones Unidas, es necesario el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la productividad de los cultivos, disminuyendo a su vez el aporte de agua requerido. Para ello, resulta imprescindible partir de una base de conocimiento sólida, obtenida a través de la investigación fundamental, que nos permita comprender los mecanismos de tolerancia al estrés de las plantas. Sólo de esta manera estaremos en disposición de diseñar soluciones al grave problema que supone la sequía. Además de emplear la información obtenida mediante la biología molecular y celular de plantas, las estrategias biotecnológicas diseñadas para solventar este problema pueden nutrirse de soluciones exitosas ya establecidas en ámbitos como la salud humana. El empleo de las técnicas e información disponible en este sector puede resultar de gran ayuda para solucionar exitosamente los problemas a los que se enfrenta la agricultura.

1.1. La proteína E3 ligasa Cereblon y los complejos CRL4

La proteína de *Homo sapiens* Cereblon (CRBN) fue descrita por primera vez en 2004 en un estudio que pretendía identificar causas genéticas de la discapacidad intelectual en niños (Higgins *et al.*, 2004). Sin embargo, el gran interés que suscitó CRBN fue causado por su condición de diana de la talidomida descubierta en 2010 (Ito *et al.*, 2010). Esto se debe a que en la década de los 50 del siglo pasado, la talidomida (α -phthalimidoglutaramida), se administró como fármaco a muchas mujeres embarazadas, causando estragos en la salud de miles de neonatos a consecuencia de su teratogenicidad (Vargesson, 2009). Mediante cromatografía de afinidad, Ito *et al.* identificaron que CRBN se une de manera específica a la talidomida, co-purificando a su vez la proteína DDB1 (*Damaged specific DNA Binding Protein 1*), que interacciona con CRBN. Además, fueron capaces de demostrar que mutaciones en CRBN evitaban los efectos teratogénicos de la talidomida, revelando que CRBN es una diana directa de la teratogenicidad de este compuesto (Ito *et al.*, 2010). Tras este descubrimiento, CRBN pasó a ser el centro de atención de muchos investigadores, motivados por las aplicaciones de la talidomida en el campo de la farmacología. La talidomida, a pesar de sus graves efectos en neonatos, tiene propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, interesantes para el desarrollo de fármacos como los ImMiDs (*ImmunoModulatory Drugs*), empleados en tratamientos contra el cáncer (Pan & Lentzsch, 2012).

Gracias a su gran interés en el ámbito de la salud humana, la elucidación estructural de la proteína CRBN se convirtió en una prioridad, y dos grupos de investigación lo consiguieron de manera simultánea mediante cristalografía de rayos X. Uno de ellos resolvió la estructura del complejo ternario formado por CRBN de *Homo sapiens* (*H. sapiens*) unida a DDB1 y a lenalidomida, que es un compuesto derivado de la talidomida (Chamberlain *et al.*, 2014). De igual modo, Fischer *et al.* elucidaron la estructura de DDB1 (*H. sapiens*) unida, esta vez, a la proteína CRBN de *Gallus gallus* y a talidomida. En

los dos trabajos se obtuvieron resultados muy similares (Chamberlain *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2014). En el caso de la estructura de CRBN de *H. sapiens*, se describió como una proteína de 442 aminoácidos, en la que se diferencian dos dominios importantes (**Figura 1.A. y B**). El primero de ellos, situado en N-terminal y que otorga nombre a la proteína, es el dominio Lon-like (LLD), comprendido entre los aminoácidos 76-318. Este dominio mantiene su homología estructural con el dominio Lon N-terminal de *Bacillus subtilis* (Duman & Löwe, 2010). Además, presenta, entre la posición 188 a la 248, el motivo de unión a DDB1 (**Figura 1.A.**). Por su lado, la proteína DDB1 contiene dos dominios “ β -propeller” A (BPA) y “ β -propeller” C (BPC) que permiten su interacción con CRBN (**Figura 1.B.**). La interacción entre CRBN y DDB1, a su vez facilita la interacción con CUL4 para formar parte del complejo CRL4 (Chamberlain *et al.*, 2014). CRBN se clasifica dentro de las proteínas denominadas DCAF (*DDB1–Cullin 4–Associated Factor*). Este tipo de proteínas suelen presentar alrededor de seis motivos WD40, formados por 40 o 60 aminoácidos entre los que destacan un triptófano (W) y un aspártico (D) en el extremo C-terminal (Higa & Zhang, 2007). Los motivos WD40 dan lugar a estructuras “ β -propeller”, que contribuyen a la interacción entre proteínas (Fonseca & Rubio, 2019). Sin embargo CRBN, a pesar de ser una DCAF, no contiene motivos WD40 (Chamberlain *et al.*, 2014). El segundo dominio destacable de CRBN es el dominio de unión a la talidomida (*Talidomide Binding Domain*, TBD), situado en la región C-terminal, entre los residuos 318 y 442 (**Figura 1.A. y B**). Está conformado por seis β -láminas antiparalelas, en las que destacan cuatro cisteínas en los residuos 323, 326, 391 y 394, que permiten la interacción de la proteína con un ion de zinc. También destacan tres residuos de triptófano (Trp380, Trp386 y Trp400) que forman un bolsillo hidrofóbico (tri-Trp pocket) que, junto a una fenilalanina en el residuo 402, dan lugar al bolsillo de unión al ligando (talidomida y derivados) (Ito *et al.*, 2010). El TBD presenta un grado de conservación muy elevado tanto en animales como en plantas, y sobre todo destaca la total conservación del tri-Trp pocket (Chamberlain *et al.*, 2014) (**Figura 1A**).

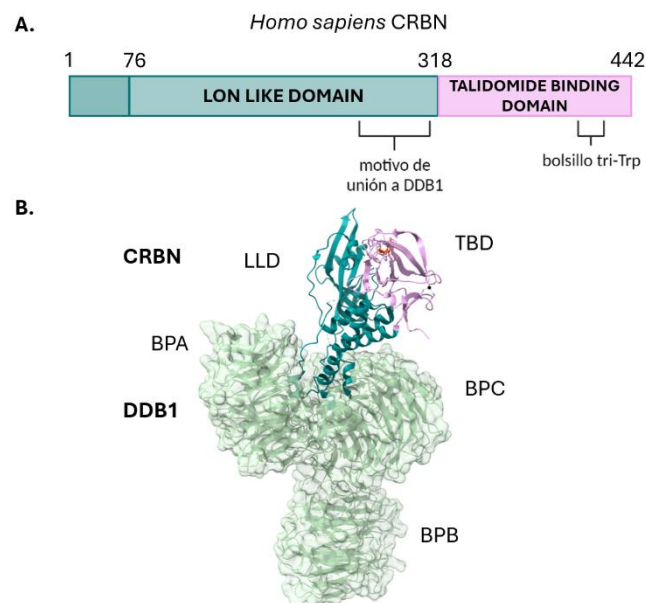


Figura 1. Estructura del complejo CRBN-DDB1. **A.** Esquema de la estructura primaria simplificada de la proteína Cereblon (CRBN) de humanos, en la que se indican los aminoácidos que delimitan cada uno de los dominios y los motivos de interés. **B.** Estructura tridimensional del complejo DDB1-CRBN-Lenalidomida. El dominio LLD de Cereblon (CRBN) se muestra en azul, el Dominio de Unión a la Talidomida (TBD) de CRBN en rosa y DDB1 se muestra en verde recubierta por su superficie, con los dominios β -propeller BPA, BPB y BPC etiquetados. La lenalidomida se representa con rojo y el ion de zinc como una esfera negra. Figura de elaboración propia con ChimeraX.

La proteína CRBN es una E3 ligasa (Ito *et al.*, 2010), que son proteínas con un papel fundamental en uno de los procesos más importantes de la célula, la degradación de proteínas. El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) es el responsable de aproximadamente el 80% de la degradación de las proteínas de las células eucariotas (Yamamoto *et al.*, 2022), y donde las E3 ligasas juegan un papel central. El proceso de ubiquitinación y degradación de proteínas UPS comienza con la acción de las proteínas E1, enzimas

encargadas de activar la ubiquitina mediante la formación de un complejo E1-ubiquitina en una reacción dependiente de ATP. La ubiquitina activada se transfiere a las proteínas E2, denominadas enzimas conjugadoras de ubiquitina. Estas interactúan con las proteínas E3, también conocidas como ubiquitin-ligasas, que se encuentran interactuando con su sustrato o proteína diana. De este modo, las proteínas E2 pueden transferir la molécula de ubiquitina a los residuos de lisina de la proteína a degradar, que está interactuando con la E3 ligasa. Una vez etiquetada la proteína diana con varias moléculas de ubiquitina (poliubiquitinada), es reconocida por el proteasoma, que la degrada (Nandi *et al.*, 2006).

Las E3 ligasas, a través de su interacción simultánea con su sustrato (la proteína a degradar) y el enzima conjugador de ubiquitina E2, otorgan al proceso de ubiquitinación la especificidad requerida para regular la degradación proteica. Esta especialización de las E3 ligasas se demuestra con el gran número de E3 ligasas expresadas por cada organismo. Por ejemplo, disponemos de más de 600 E3 ligasas codificadas en el genoma humano (Toma-Fukai *et al.*, 2020). Estas ubiquitin-ligasas se pueden clasificar en cuatro grupos: *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus* (HECT), *Really Interesting New Gene* (RING), U-box y RING-In Between-RING (RBR) (Yang *et al.*, 2021). Entre ellos, RING es el grupo que más E3 ligasas engloba, y todas ellas se caracterizan por tener un dominio de unión al zinc en el extremo N-terminal que les da nombre, el dominio RING. Dentro de este grupo, a su vez, se diferencian las E3 ligasas monoméricas y las multiméricas, siendo estas últimas las más abundantes. Un tipo de E3 ligasas multiméricas de tipo RING son las Cullin-RING Ligasas (CRLs), dentro de las cuales cabe destacar los complejos SCF y los complejos CRL4. Las CRLs de tipo SCF están conformadas por Skp1, Cullin1 y proteínas F-box, y son el tipo de E3 ligasas más numeroso (Xie *et al.*, 2019). En estos complejos, las proteínas F-box son esenciales para reconocer a los sustratos o proteínas diana, y es Skp1 la proteína que se encarga de unir la F-box pertinente al core catalítico, que es Cullin1. Esta última tiene función de andamiaje, propiciando la interacción con el enzima E2 mediante su interacción con RING-box-1 (RBX1) (Yang *et al.*, 2021). El otro tipo de CRLs a destacar es CRL4, en el que la proteína de andamiaje es Cullin4, a la que se une RBX1 en su extremo N-terminal, y en C-terminal se une DDB1 que ejerce de adaptadora para la DCAF (Vierstra, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, CRBN forma parte de complejos CRL4 en *H. sapiens*. Como se muestra en la **Figura 2**, el complejo CRL4^{CRBN} está compuesto por las proteínas CRBN-DDB1-Cul4-RBX1. En el complejo CRL4^{CRBN}, Cullin4 realiza la función de andamiaje, interactuando con RBX1 (que recluta al enzima E2) y con DDB1 que, actúa como adaptador. Por último, CRBN, ejerce de receptor específico de sustrato, interactuando con la proteína diana y con la parte catalítica del complejo para propiciar su ubiquitinación.

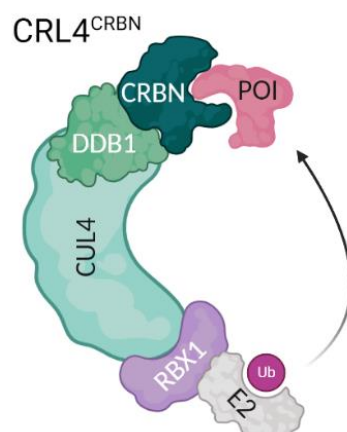


Figura 2. Representación del complejo CRL4(CRBN). Esta E3 ligasa establece interacciones con el enzima E2 y con la Proteína de Interés (POI), llevando a cabo su ubiquitinación. Abreviaciones: CRBN, Cereblon; DDB1, *Damaged specific DNA Binding Protein 1*; CUL4, Culina-4; RBX1, *RING Box Protein 1*, Ub, ubiquitina; CRL4^{CRBN}, cullin4-RING ubiquitin ligasa basada en CRBN. Figura obtenida de (Donderis-Fagoaga, 2023).

CRBN ha sido muy estudiada en animales ya que ofrece la posibilidad de modular su función mediante el uso de IMiDs. Estos fármacos, gracias a la interacción establecida entre CRBN y la talidomida, pueden facilitar la interacción de CRBN con nuevos sustratos permitiendo su degradación (Ito *et al.*, 2010). De este modo, además de interaccionar sobre los sustratos nativos para su ubiquitinación (Fischer *et al.*, 2014), CRBN puede actuar sobre otras proteínas, denominadas neosustratos. Los neosustratos no pueden ser reconocidos por la E3 ligasa CRL4^{CRBN} de manera natural, pero sí en presencia de IMiDs (Yamamoto *et al.*, 2022).

Actualmente, CRBN es la diana de muchas terapias para diferentes enfermedades humanas. Basándose en la afinidad de CRBN por la talidomida se han desarrollado más de 30 tratamientos exitosos que han convertido en neosustratos de CRBN proteínas de interés médico (Bricelj *et al.*, 2021). La gran mayoría de estos fármacos están basados en un tipo concreto de moléculas, las PROTACs.

1.2. Degradación dirigida de proteínas: PROTACs

Las PROTeolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) son moléculas químicas con capacidad de reclutar proteínas diana para su ubiquitinación y posterior degradación mediante el UPS, y se describieron por primera vez hace dos décadas. Las PROTACs son compuestos químicos heterobifuncionales, que integran tres elementos químicos bien diferenciados: un ligando a una E3 ligasa (*tail group*), un ligando a la proteína de interés (*head group*), y un *linker* que une ambas partes (Sakamoto *et al.*, 2001) (**Figura 3.A.**). De este modo, las PROTACs permiten la interacción de una E3 ubiquitin-ligasa con la proteína de interés, facilitando su degradación mediante el UPS (Ito *et al.*, 2021). Una vez realizada su función, la molécula PROTAC se libera, reciclándose para repetir el proceso con otra proteína diana (Sun *et al.*, 2019) (**Figura 3.B.**).

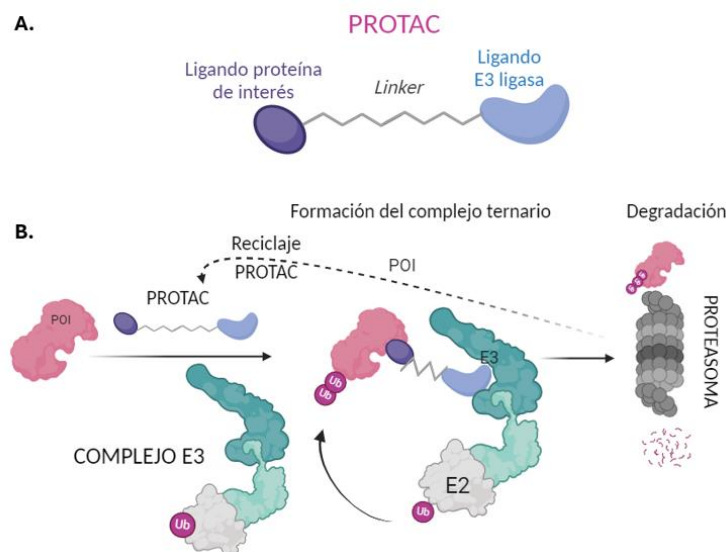


Figura 3. Representación de la estructura y modo de acción de una molécula PROTAC. **A.** Estructura simplificada de una PROTAC. **B.** Mecanismo de degradación de una Proteína de Interés (POI) inducida por una PROTAC (Proteolysis Target Chimera). Figura adaptada de (Donderis-Fagoaga, 2023).

En la última década, la relevancia de las PROTACs ha ido aumentando en el ámbito farmacológico gracias a su contribución en las terapias basadas en la degradación dirigida de proteínas diana (*Targeted Protein Degradation*, TPD) (Winter *et al.*, 2015). Gracias a su mecanismo de acción, las PROTACs presentan ciertas ventajas respecto a fármacos convencionales (inhibidores o activadores). La primera de ellas es su capacidad para controlar proteínas relacionadas con ciertas enfermedades para las que no se han podido encontrar tratamientos, las denominadas “*undruggable protein targets*”. Por otra parte, las PROTACs son altamente selectivas, ya que únicamente actúan cuando se forma el complejo ternario (proteína de interés-PROTAC-E3 ligasa), requiriendo la presencia e interacción de estos tres elementos para desempeñar su función. Otra ventaja es que actúan como súper inhibidores, ya que, en vez de inhibir la actividad de un enzima concreto mediante la interacción con su sitio activo, la degradan directamente (Békés *et al.*, 2022). Esto da pie a otro aspecto positivo de las PROTACs, que

es su capacidad de reciclaje. Al no tener que quedar inactivando permanentemente un sitio activo, establecen interacciones transitorias con la proteína diana hasta que es degradada, pudiendo degradar con una sola molécula PROTAC muchas proteínas diana idénticas (Mullard, 2021). Por último, al no requerir de un sitio activo concreto que inactivar, pueden interactuar con cualquier parte de la proteína, inhabilitando cualquiera de sus funciones y no sólo su actividad catalítica (Békés *et al.*, 2022).

A pesar de la gran variedad de E3 ligasas presentes en el proteoma humano, la gran mayoría de las PROTACs están diseñadas para interactuar y establecer el complejo ternario con CRBN, que es sin duda la E3 ligasa por excelencia en el uso de PROTACs. Así lo demuestran numerosos estudios que han dado lugar al desarrollo de fármacos antiinflamatorios (Bassi *et al.*, 2018), así como tratamientos de múltiples tipos de cáncer (Hansen *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2019; Krönke *et al.*, 2014; Matyskiela *et al.*, 2018; Surka *et al.*, 2021) o de enfermedades neurodegenerativas (Silva *et al.*, 2019). Todos estos fármacos son capaces de convertir en neosustratos de CRBN a proteínas de diferente naturaleza y función que intervienen negativamente en el desarrollo de estas enfermedades. Curiosamente, la técnica de marcaje de proximidad basada en biotina se ha empleado recientemente para estudiar el efecto de algunas PROTACs, identificando los neosustratos de CRBN en humanos mediante el uso de AirID (Yamanaka *et al.*, 2022).

Según el genético molecular de la Universidad de California Jian-Kang Zhu, “El estrés por sequía resulta tan complicado y difícil para la biología de plantas como lo es el cáncer para la biología animal” (Pennisi, 2008). Teniendo en cuenta el éxito de los tratamientos para el cáncer basados en PROTACs, y que la E3 ligasa CRBN está conservada también en las plantas, no resulta descabellado pensar que la tecnología PROTAC podría desarrollarse en el sector de la agricultura como solución al grave problema de la sequía.

Las PROTACs podrían emplearse para la degradación de manera dirigida de algunos elementos clave en la respuesta a la sequía. Esto permitiría dotar a los cultivos de una mayor resistencia a la sequía, soslayando la modificación genética y sus desventajas. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología exige un conocimiento previo sobre las dianas de las PROTACs en plantas. Concretamente, sobre el ortólogo de CRBN en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (AtCRBN) y el complejo E3 ligasa en el que participa. Para ello, disponemos de técnicas innovadoras como el marcaje de proximidad (PL).

1.3. Marcaje de proximidad

Las proteínas participan en la inmensa mayoría de los procesos celulares, por lo que entender su comportamiento resulta crucial. Se estima que el 80% de las proteínas ejercen su función mediante la formación de complejos, interactuando con otras moléculas, generalmente otras proteínas (Berggård *et al.*, 2007). Estas interacciones entre proteínas (*Protein-Protein Interactions*, PPIs) conforman una red, definida como interactoma. El interactoma engloba tanto aquellas interacciones permanentes y estables como aquellas que sólo se dan de manera reversible y transitoria (Elhabashy *et al.*, 2022). La gran implicación de estas interacciones en procesos biológicos fundamentales y en el desarrollo de la función celular, convierten el análisis de las PPIs en una prioridad para comprender las dinámicas de señalización y respuesta a nivel molecular. Por este motivo, han sido desarrolladas hasta la fecha numerosas técnicas para investigar las PPIs. Estas técnicas se clasifican en tres grandes grupos (Rao *et al.*, 2014). Los métodos *in vitro*, en los que se estudian las PPIs en un ambiente controlado, y que engloban técnicas como la cristalografía de rayos X, la cromatografía de afinidad, los *microarrays* de proteínas o la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear. El segundo grupo lo conforman técnicas *in silico*, como los abordajes basados en la estructura y la secuencia, o el estudio filogenético, entre otras. Todas ellas están basadas en simulaciones computacionales y, en los últimos años, el *machine learning* y la inteligencia artificial han demostrado su gran valía en el estudio de complejos proteicos (Lee, 2023). Por último, técnicas como Y2H (*Yeast two-Hybrid*), FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*) o la coimmunoprecipitación (coIP) forman parte del tercer grupo, las técnicas *in vivo* (Xing *et al.*, 2016). A este último conjunto resulta imprescindible añadir una nueva técnica de estudio de la interacción entre proteínas, el marcaje de proximidad.

El marcaje de proximidad se basa en el uso de enzimas capaces de metabolizar un sustrato para convertirlo en un radical reactivo, que pueda unirse covalentemente a las proteínas situadas en un determinado radio de distancia. Estos enzimas se expresan fusionados a la proteína de estudio, consiguiendo un marcaje restringido en un espacio concreto. Así, los sustratos en su versión reactiva etiquetan las proteínas cercanas a la proteína de interés. Generalmente, estos abordajes de PL se acoplan a espectrometría de masas (MS), que permite identificar aquellas proteínas etiquetadas (Bosch *et al.*, 2021). Una de las ventajas más destacables de este método con respecto a otras técnicas *in vivo* es que permite el estudio de interacciones transitorias o débiles. Las proteínas que se encuentran próximas quedan etiquetadas con biotina tras interactuar con la proteína de interés, pudiéndose identificar las proteínas interactoras independientemente de si en el momento de extracción de la muestra se está dando dicha interacción. Esto a su vez aporta información a nivel espacial y temporal de las interacciones entre proteínas. Además, la identificación de los complejos no depende de la conservación de la estructura nativa de las proteínas, por lo que no es necesario mantener su conformación durante el procesado de la muestra. Por último, permite identificar interactores que no se unen directamente a la proteína de interés pero sí forman parte de un mismo complejo (Chien *et al.*, 2024; Kerbler *et al.*, 2021).

Dentro del marcaje de proximidad pueden destacarse cuatro grandes sistemas. El primero de ellos se basa en el uso de HRP (*HorseRadish Peroxidase*), una peroxidasa que, al activarse con H_2O_2 , es capaz de metabolizar el sustrato biotin-fenol, para que se una a los aminoácidos cargados negativamente de las proteínas vecinas (Li *et al.*, 2014). HRP se emplea en ambientes oxidativos, que se encuentran en orgánulos como el lumen del Retículo Endoplasmático y Golgi, o en el espacio extracelular. Sin embargo, su estructura se ve afectada en ambientes reductores, por lo que no es ideal para la identificación de complejos citosólicos (Hopkins *et al.*, 2000). Esta limitación propició el diseño de otro sistema de PL, basado en el uso del enzima APEX (*Engineered Ascorbate PeroXidase*). Este enzima, también derivado de plantas, mantiene la cinética y la base química del marcaje con HRP, siendo capaz de convertir su sustrato biotin-fenol en radicales reactivos en presencia de H_2O_2 . Además, es activo también en ambientes reductores como el del citosol (Rhee *et al.*, 2013). Tanto HRP como APEX han sido mejoradas mediante procesos de evolución dirigida, por lo que se dispone de diferentes versiones de estos enzimas (Cruz-Lopez *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019). El tercer sistema diseñado hasta la fecha para PL se denomina PUP-IT (*PuPylation-based Interaction Tagging*). Se trata de un sistema basado en el enzima bacteriano PafA, capaz de ligar una pequeña proteína llamada Pup a los residuos de lisina de las proteínas cercanas (Iyer *et al.*, 2008). A diferencia del resto de sistemas, cuyo sustrato es la biotina y derivados, el sustrato es el péptido Pup, que ha sido modificado para poder ser detectado con estreptavidina como en el resto de sistemas (Liu *et al.*, 2018).

Por último, destaca el sistema denominado BioID (*proximity dependent Biotin IDentification*), que es uno de los más empleados y mejorados a lo largo del tiempo. Para su desarrollo, se partió de la biotina ligasa BirA de *Escherichia coli* (*E. coli*), un enzima que es capaz de biotinilar los residuos de lisina de la acetil-CoA carboxilasa (Chapman-Smith & Cronan, 1999). Esta reacción consta de dos pasos. En un primer lugar, BirA es capaz de activar la biotina usando una molécula de ATP, convirtiéndola en el intermediario de vida corta y altamente reactivo biotinoyl-5'-AMP (bioAMP). Este bioAMP se une al péptido aceptor de biotina presente en la proteína diana, dando lugar a la proteína biotinilada (Choi-Rhee *et al.*, 2004). Inicialmente, esta aproximación se empleó para evaluar las interacciones entre dos proteínas concretas, fusionando BirA a una de las proteínas de estudio, y el péptido aceptor de biotina a la proteína candidata a interactuar con ella. Pero esta técnica no permite descubrir nuevos interactores. Por tanto, para el desarrollo del sistema de marcaje de proximidad BioID, fue crucial superar la extraordinaria especificidad entre las biotina ligasas y sus dianas, consiguiendo una biotina ligasa más promiscua. Para ello se mutó el sitio activo de BirA (R118G), dando lugar a BirA* o BioID, que es capaz de biotinilar cualquier proteína de su alrededor, sin que esta posea el péptido aceptor de biotina. Esto es gracias a que la mutación aumenta en 400 veces el ratio de disociación para bioAMP en comparación con BirA (Kwon & Beckett, 2000). De este modo, el intermediario bioAMP se libera del sitio activo de la biotina ligasa y reacciona de manera inespecífica con los grupos amino de las lisinas de las proteínas que se encuentran próximas (Choi-Rhee *et al.*, 2004; Cronan, 2005). El radio en el que

deben encontrarse las proteínas para ser etiquetadas con BioID es de alrededor de 10 nm, aunque esta medida depende de las condiciones celulares (Kim *et al.*, 2014). Una de las principales diferencias del sistema BioID en comparación con HRP y APEX es que, además de presentar una cinética más rápida, no emplea sustratos tóxicos para la célula. A diferencia del H₂O₂, la biotina no es dañina, por lo que el uso de BioID permite el marcaje de las proteínas cercanas sin afectar a las células, que deben mantenerse lo más intactas posible ya que se trata de técnicas *in vivo* (Yang *et al.*, 2021).

Para la identificación de PPIs mediante PL basado en biotina, deben tenerse en cuenta tres elementos que juegan un papel fundamental (Xu *et al.*, 2023). En primer lugar, el diseño de las construcciones es clave para la correcta expresión y función de la proteína de interés. Debe decidirse en qué extremo (N-terminal o C-terminal) se fusionará la biotina ligasa a la proteína diana, y bajo qué promotor se expresará la proteína de fusión resultante. Además, es conveniente seleccionar una etiqueta que permita detectar esta proteína de fusión, por lo que también debe decidirse en qué extremo fusionar la etiqueta. Ambas pueden afectar a la conformación nativa de la proteína diana, dificultando su interacción con otras proteínas. También resulta imprescindible emplear un control negativo adecuado al experimento. Este permite identificar aquellas proteínas que se han biotinilado de manera inespecífica debido a que se encuentran cerca de la proteína de interés, así como aquellas que son biotiniladas endógenamente, o que se unen inespecíficamente a los reactivos de purificación. El control ayuda a diferenciar los interactores reales, algo que la técnica *per se* no puede conseguir (Mair *et al.*, 2019). Para ello, puede expresarse, bajo el mismo promotor que la proteína de interés, la biotina ligasa fusionada a alguna etiqueta, a un péptido de localización subcelular o a la propia proteína diana truncada. El tercer parámetro de suma importancia son las condiciones de biotinilación. La concentración de biotina exógena aportada, así como el tiempo de marcaje y la temperatura de incubación, deben ser optimizadas para cada caso empíricamente (Xu *et al.*, 2023).

Una vez considerados estos aspectos, la proteína de fusión (biotina ligasa + proteína diana) debe ser expresada en el organismo de estudio, para posteriormente realizar el tratamiento *in vivo* con biotina en las condiciones previamente optimizadas (**Figura 4**). Tras la extracción de proteínas, la muestra se enriquece en proteínas biotiniladas mediante *beads* de estreptavidina, gracias a la elevada afinidad que muestra la estreptavidina por la biotina ($K_d=10^{-14}$ mol/L) (Updyke & Nicolson, 1984; Xu *et al.*, 2023). Las proteínas marcadas con biotina se digieren con tripsina para su análisis mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Dependiendo del experimento, se selecciona un método de cuantificación concreto, aunque los que más se emplean en la biología de plantas son LFQ (*Label-Free Quantification*), en el que la cuantificación se realiza en base a la intensidad de los picos (Huang *et al.*, 2020), y TMT (*Multiplexed Tandem Mass tag isobaric labeling*), en el que cada muestra se marca con una etiqueta isobárica para poder ser analizada como un código de barras único (Cho *et al.*, 2020). Los péptidos identificados gracias a su ratio masa-carga (*m/z*) y su tiempo de retención se comparan con la base de datos pertinente, obteniendo una lista de proteínas más abundantes en cada muestra. Tras la comparación de las proteínas identificadas en el control y en la muestra, es posible identificar interactores candidatos, que deben ser siempre validados con técnicas independientes como BiFC, Y2H o coIP (Chien *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023) (**Figura 4**).

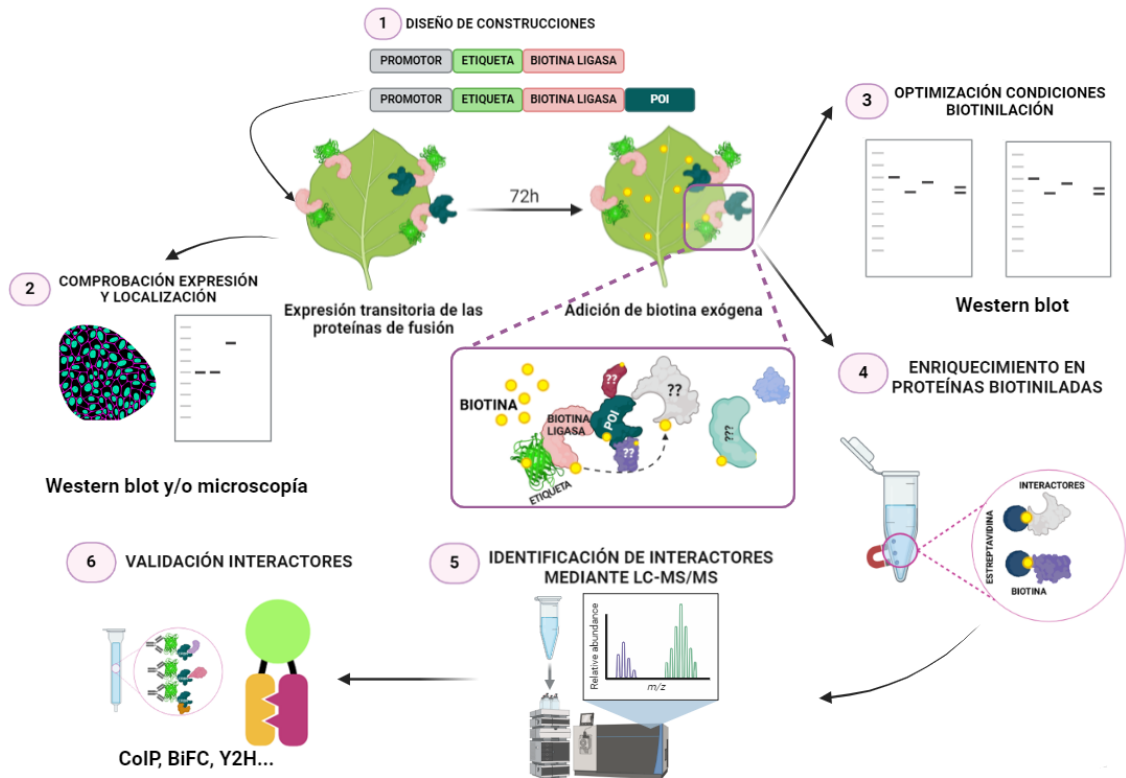


Figura 4. Flujo de trabajo seguido en la identificación de interacciones proteína-proteína mediante marcaje de proximidad basado en biotina en *Nicotiana benthamiana*. Los números indican el orden de los pasos a seguir. “POI” hace referencia a Proteína de Interés (*Protein Of Interest*); “??” a proteínas desconocidas; “CoIP” a ColnmuoPrecipitación, “BiFC” a *Bimolecular Fluorescent Complementation*; “Y2H” a Doble Híbrido de Levadura. Figura de elaboración propia con Biorender.com.

Una vez establecido el PL basado en biotina (BioID) como sistema para el estudio de las interacciones entre proteínas, se han ido desarrollando otras enzimas similares a BioID con ligeras variaciones en sus atribuciones. A pesar de que todas ellas mantienen la mutación de la arginina en posición 118 del sitio activo, se pueden diferenciar cuatro grupos de biotina ligasas según sus orígenes: las derivadas de BirA de *E. coli*, las derivadas de BirA de *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*), la derivada de *Bacillus subtilis* y una biotina ligasa sintética diseñada *de novo* (Xu *et al.*, 2023). En el grupo derivado de BirA de *E. coli* se encuentra BioID, que ha sido ampliamente utilizada debido a que fue la primera que se desarrolló. Sin embargo, su cinética de biotinilación es baja, requiriendo tiempos de incubación de casi 24h, lo que la inhabilita para ciertas aplicaciones. Para mejorar este aspecto, Branon y su grupo desarrollaron en 2018 TurboID y miniTurbo mediante evolución dirigida de la proteína BirA de *E. coli*. Al comparar otras mutaciones con respecto a la que presenta BioID (R118G), observaron que R118S duplica la actividad de biotinilación, por lo que decidieron partir de esta base. Realizando rondas sucesivas de mutagénesis y selección, fueron reduciendo el tiempo de biotinilación desde 18 horas a 10 minutos. Al final obtuvieron TurboID, con 15 mutaciones respecto a BirA; y miniTurbo, con 13 mutaciones y sin el dominio N-terminal que presenta BirA (Branon *et al.*, 2018). Además de *E. coli*, *A. aeolicus* también expresa una biotina ligasa BirA que ha sido la base para el desarrollo de BioID2, ultraID, y microID2 (Johnson *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2016; Kubitz *et al.*, 2022). Esta BirA es diferente de la de *E. coli* porque carece del dominio de unión al DNA en N-terminal. A partir de ella se desarrolló BioID2, con una mutación en su sitio activo R40G, que requiere un aporte menor de biotina exógena que BioID (Kim *et al.*, 2016). La evolución dirigida y la mutagénesis específica han permitido recientemente el desarrollo de ultraID y microID2, con una cinética de biotinilación más rápida que la de BioID2. Además, ambas presentan un tamaño menor, ya que su extremo C-terminal está truncado con respecto a BirA (Johnson *et al.*, 2022; Kubitz *et al.*, 2022). El tercer tipo de biotina ligasa lo conforma AirID (*ancestral BirA for proximity-dependent biotin identification*), un enzima sintético que ha sido diseñado *de novo* a partir de la reconstrucción de las BirA ancestrales y la mutagénesis dirigida. Su secuencia guarda un 82% de similitud con la de BioID, y su cinética de biotinilación es mayor (requiere entre 3 y 6 horas) (Kido *et al.*,

2020). Por último, BASU es una biotina ligasa promiscua que proviene de BirA de *Bacillus subtilis*, tras haberse insertado tres mutaciones y truncado su extremo N-terminal. Su actividad de biotilación es similar a BioID2 (Ramanathan *et al.*, 2018).

Entre todas las versiones descritas anteriormente, TurboID ha resultado ser la biotina ligasa más eficiente hasta la fecha, con una elevada cinética de biotilación que le permite actuar en solo 10 minutos. Además, presenta el rango de temperatura de trabajo más amplio (Branon *et al.*, 2018). Ambas propiedades (velocidad y temperatura) han facilitado su uso en un amplio abanico de especies y organismos modelo. A pesar de que en otros ámbitos hay una mayor variedad en la elección de biotina ligasas, en la biología de plantas el PL se ha implementado recientemente, y TurboID ha sido una de las más empleadas. Como refleja la bibliografía disponible, TurboID ha contribuido en el estudio de interactomas subcelulares (Chien *et al.*, 2024); interactomas de proteínas poco abundantes (Mair *et al.*, 2019); interacciones transitorias entre redes de señalización como la de la quinasa BIN2 (Kim *et al.*, 2023); e incluso interacciones entre E3 ligasas y sus sustratos (Zhang *et al.*, 2019). Cabe destacar que la práctica totalidad de estos trabajos se han desarrollado en las especies modelo *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*), y no en especies de interés agronómico.

En definitiva, el marcaje de proximidad se presenta como una técnica innovadora y útil para el estudio de las interacciones entre proteínas, también en la biología de plantas. Su uso podría ser de gran ayuda para conocer más acerca del interactoma de AtCRBN.

1.4. Antecedentes

El presente trabajo surge como continuación de uno de los principales proyectos en nuestro laboratorio, cuyo fin es el desarrollo de PROTACs que incrementen la resistencia al estrés causado por sequía. En los últimos meses, se han publicado algunas revisiones que presentan los PROTACs como una posible solución a problemas como la sequía o las plagas (Leon & Bassham, 2024; Su *et al.*, 2024). Sin embargo, hasta la fecha no existen publicaciones de herramientas basadas en PROTACs en la biología de plantas. Únicamente se dispone del comunicado de las empresas Arvinas y Bayer en 2019, cuando anunciaron su intención de colaborar en el diseño de PROTACs para lidiar con los graves retos que afronta la agricultura («Protein Degradors, from Clinic to Crops», 2019).

A la falta de información sobre proyectos en este ámbito, ha de sumarse la ausencia de estudios publicados sobre la E3 ligasa CRBN en plantas. En nuestro grupo, observamos que en el genoma de *A. thaliana* y de especies de interés agronómico como el arroz (*Oryza sativa*), el trigo (*Triticum aestivum*) o el tomate (*Solanum lycopersicum*) se encuentra una secuencia homóloga a CRBN de *H. sapiens*. Además, la secuencia y estructura de CRBN se conserva entre humanos y plantas, sobre todo en el TBD, que posibilita su unión a los PROTACs. Por último, la localización subcelular de CRBN de *H. sapiens* y la de su ortólogo en *A. thaliana* (AtCRBN) concuerdan, ya que ambas son núcleo-citoplasmáticas (Donderis-Fagoaga, 2023; Wada *et al.*, 2016).

El UPS está conservado también en plantas, por lo que gran parte de las proteínas que actúan en él también se encuentran conservadas. Es más, en el genoma de *A. thaliana* se han identificado más de 1500 E3-ligasas, una cifra que casi triplica las 600 identificadas en *H. sapiens*, lo que indica que el UPS podría ser más sofisticado en plantas que en humanos. Las E3 ligasas de plantas se clasifican de un modo similar a las de humanos (Vierstra, 2009), y destacan los complejos de tipo CRL por su intervención en numerosos procesos de la célula vegetal (Hua & Vierstra, 2011). Más concretamente, los complejos de tipo CRL4, a los que pertenece CRBN en humanos, también han sido identificados en plantas. Tanto la Culina4, que ejerce funciones de andamiaje, como las subunidades que interactúan con ella, otorgando función catalítica y especificidad RBX1, DDB1 y DCAF, se encuentran conservadas en plantas (Fonseca & Rubio, 2019). Curiosamente, una de las muchas funciones que se le atribuyen a los complejos CUL4-DDB1 es la degradación de PYL8, uno de los receptores del ABA (Irigoyen *et al.*, 2014). A pesar de que ya han sido identificadas un gran número de proteínas implicadas en el UPS, las DCAFs son las encargadas de aportar especificidad a las E3 ligasas, por lo que no resulta extraño que las células vegetales dispongan de una amplia gama de DCAFs. Muchas de ellas ya han sido

identificadas (120 en *A. thaliana*) (Lee *et al.*, 2011), pero es posible que aún quede una larga lista de DCAFs por identificar, entre las que podría encontrarse el ortólogo de CRBN. La existencia de un complejo CRL4^{CRBN} conservado en plantas ofrecería la oportunidad de emplear PROTACs en la agricultura.

Una de las técnicas más empleadas actualmente en la identificación de interactores y complejos proteicos es el marcaje de proximidad basado en biotina. Concretamente en plantas, ha contribuido al estudio de un gran número de complejos y vías de señalización, con el uso predominante de la biotina ligasa TurboID. Un ejemplo de ello es el estudio en *N. benthamiana* de los interactores del receptor inmune de tipo NLR N, en el que gracias al marcaje de proximidad con TurboID se identificó que está regulado por la E3 ligasa UBR7 (Zhang *et al.*, 2019). Por tanto, en este Trabajo Final de Máster se pretendía identificar mediante marcaje de proximidad los principales interactores de la proteína CRBN de *A.thaliana*, para avanzar en el desarrollo de PROTACs en la biología vegetal.

1.5. Hipótesis

La hipótesis del presente estudio es que podemos usar el marcaje de proximidad TurboID para identificar el interactoma de la proteína CRBN de *A. thaliana*. Además, puesto que el homólogo de CRBN en *H. sapiens* forma parte del complejo E3 ligasa de tipo CRL4^{CRBN} podríamos encontrar entre los interactores de AtCRBN proteínas que formen parte de ese complejo, posibilitando el funcionamiento de PROTACs basados en CRBN en la agricultura.

2. OBJETIVOS

La motivación del presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) es el estudio de los complejos proteicos de plantas, concretamente aquellos de los que forma parte la E3 ligasa Cereblon (CRBN), mediante marcaje de proximidad. Esto nos permitirá el desarrollo de pequeñas moléculas químicas que incrementen la resistencia a la sequía de los principales cultivos.

El objetivo general de este TFM es la generación de herramientas genéticas que permitan el análisis del interactoma de proximidad de la proteína CRBN de *Arabidopsis thaliana* (AtCRBN). El segundo objetivo general es la identificación mediante proteómica cuantitativa de las proteínas que forman parte del interactoma de AtCRBN. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar diferentes versiones de AtCRBN fusionada a la biotina ligasa TurboID en diferentes vectores binarios siguiendo el método de clonaje Gateway.
2. Confirmar la expresión de las proteínas de fusión de interés y analizar su localización subcelular mediante microscopía confocal.
3. Optimizar el protocolo de marcaje de proximidad basado en biotina con TurboID para *Nicotiana benthamiana* y AtCRBN.
4. Identificar proteínas candidatas a formar parte del interactoma de AtCRBN mediante un análisis proteómico por LC/MS-MS.
5. Generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) que expresen las construcciones de TurboID.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material bacteriano

3.1.1. *Escherichia coli*

3.1.1.1. Cepas empleadas

Se utilizaron células competentes de *E. coli* (DH5 α) elaboradas en el laboratorio según el protocolo descrito por Inoue *et al.*, 1990 y modificado por Untergasser, 2008.

3.1.1.2. Medio y condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue LB líquido (Luria-Broth, compuesto por 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl). En cuanto al LB sólido (LB agar), se adicionó agar bacteriológico 2.5%. Posteriormente, el medio fue esterilizado a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos. Dependiendo de la resistencia adquirida por las células, se adicionó el antibiótico de selección correspondiente.

El cultivo de *E. coli* se realizó a una temperatura de 37 °C, además de unas condiciones de agitación de 210 rpm en el caso del cultivo en medio líquido.

3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.2.1. Cepas utilizadas

Las cepas empleadas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron la C58C1, con el plásmido Ti desarmado pGV2260, y la cepa GV3101, con el plásmido Ti desarmado pMP90. Ambas fueron empleadas para la transformación estable de *A. thaliana*, y adicionalmente la cepa C58C1 fue empleada para la expresión transitoria en *N. benthamiana*.

3.1.2.2. Medio y condiciones cultivo

El crecimiento de *A. tumefaciens* se realizó en medio LB tanto líquido como sólido (detallado anteriormente). Además del antibiótico de selección pertinente, a todos los medios de cultivo se les adicionó Rifampicina (100 μ g/mL).

La temperatura de cultivo fue de 28 °C, además de unas condiciones de agitación de 180 rpm en el caso del cultivo en medio líquido.

3.2. Material vegetal

3.2.1. *Arabidopsis thaliana*

3.2.1.1. Material vegetal

Para llevar a cabo este trabajo se empleó la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Concretamente, se utilizó el ecotipo Columbia-0 como *wild-type* (WT).

3.2.1.2. Condiciones de cultivo

En cuanto al cultivo *in vitro*, las semillas de Col-0 fueron esterilizadas por dos métodos diferentes. Para un número y disposición variable de semillas, se incubaron con la solución de esterilización (30% lejía, 0.02% Tween-20), durante 10 minutos en agitación a 1400 rpm. Tras eliminar la solución de esterilización y repetir es proceso de lavado con agua destilada estéril 5 veces, se añadieron 480 μ L de TAP agar (agarosa 0.12%). Mediante el pipeteo de las semillas en este medio, se sembró un número variable de estas en placas Petri redondas de 9 cm de diámetro. Para la siembra de un número concreto de semillas, se empleó la solución de esterilización (70% etanol, 0,1% Tritón-X-100), con la que se incubaron las semillas durante 5 minutos en agitación a 1000 rpm. Tras retirar la solución de esterilización se añadió etanol 100% e inmediatamente se depositaron las semillas en un papel estéril.

Una vez evaporado el etanol, se sembraron las semillas individualmente con la ayuda de un palillo. Tras ambos modos de esterilización, se realizó la siembra de las semillas en medio Murashige y Skoog (0,5X sales MS (Duchefa Biochemie), 0,5% de sacarosa, 1% agar, tamponado con 1 M KOH a pH = 5.7). Después de la estratificación de las semillas a 4 °C en oscuridad durante 3 días, se incubaron las placas en un fitotrón a 22 °C en condiciones de día largo (16h luz: 8h oscuridad) a 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$. En el caso de los experimentos de selección de plantas transgénicas, tras la estratificación se aplicó un pulso de luz de 5h (80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$) para estimular la germinación. Se incubaron durante tres días en oscuridad a 22 °C y 72h en condiciones de día largo (16h luz: 8h oscuridad) con una baja intensidad de luz (Harrison *et al.*, 2006).

En el caso del cultivo en invernadero, las plántulas con una semana de crecimiento fueron trasplantadas a macetas con un sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita en las proporciones 1:0.5:0.5 (v/v). Las condiciones controladas del invernadero fueron 16 h de luz a una temperatura constante de 24 °C, y 8 h de oscuridad a temperatura constante de 21 °C, con una humedad relativa del aire del 60% y una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.2. *Nicotiana benthamiana*

3.2.2.1. Material vegetal

Para los experimentos de expresión transitoria usamos plantas de *Nicotiana benthamiana* de 3 semanas de edad.

3.2.2.2. Condiciones de cultivo

Las plantas de *N. benthamiana* fueron cultivadas en un fitotrón con las condiciones de cultivo controladas de 18 h de luz a 23 °C y 6 h de oscuridad a 21 °C.

3.3. Métodos con ácidos nucleicos

3.3.1. PCR de solape para amplificación y clonación de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_link_AtCRBN*

3.3.1.1. Diseño de cebadores.

El diseño de los cebadores (**Anexo I, Tabla 1**), se realizó empleando la herramienta Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>).

3.3.1.2. Condiciones de amplificación de *TurboID* por PCR.

Para el clonaje de *TurboID* en pCR8/GW/TOPO, primero se amplificó la secuencia que codifica *TurboID* mediante PCR usando como molde DNA plasmídico pUPD2/*TurboID*-FLAG-NLS (obtenido del laboratorio del Dr. David Alabadí). Para esta PCR se empleó la polimerasa *Phusion* (Thermo Scientific™), con capacidad de corrección de errores, los cebadores descritos en la **Tabla 1** del **Anexo I**, y las condiciones señaladas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Componentes y condiciones empleadas en la amplificación por PCR de *TurboID*.

Componentes (por reacción)		Programa PCR	
H ₂ O	35 μL	Desnaturalización	98 °C 30''
<i>Phusion Buffer</i> 5X	10 μL	Ciclo (x30)	Desnat 98 °C 10''
dNTPs (10 μM)	1 μL		Anillado 60 °C 30''
FW (10 μM)	1 μL		Extensión 72 °C 30''
RV (10 μM)	1 μL	Terminación	72 °C 10
DNA (10ng/ μL)	1.5 μL		
<i>Phusion</i> (2U/ μL)	0.5 μL		

3.3.1.3. Condiciones de amplificación de fusiones *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* mediante PCR de solape.

La secuencia de *AtCRBN* (At2g25740) fue previamente extraída de la base de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), y optimizada con GenSmart™ Codon Optimization, de GenScript (<https://www.genscript.com/>) a fin de facilitar su correcta expresión en *E. coli* y *A. thaliana*, y de eliminar sitios de restricción. El gen sintético con la secuencia optimizada de *AtCRBN*, fue empleado como molde de PCR, así como el DNA producto de PCR de *TurboID* (amplificación descrita anteriormente).

Las construcciones *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* se generaron mediante PCR de solape. En una primera ronda de PCRs se amplificaron por separado *TurboID* con un cebador reverso especial y *AtCRBN* con un cebador directo especial (**Anexo I, Tabla 1**). Estos cebadores contienen las últimas 20 pares de bases de los extremos 5' de *AtCRBN* y 3' de *TurboID* respectivamente.

Las condiciones de ambas reacciones de PCR se describen en la **Tabla 2**, y no varían entre *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*.

Tabla 2. Componentes y condiciones empleadas en la amplificación por PCR de *TurboID* y *AtCRBN* para PCR de solape.

Componentes (por reacción)		Programa PCR					
H ₂ O	A 50 µL	<i>TurboID</i>		<i>AtCRBN</i>			
<i>Phusion Buffer</i> 5X	10 µL	Desnaturalización	98 °C 30''	Desnaturalización	98 °C 30''		
dNTPs (10µM)	1 µL	Ciclo (x25)	Desnat	98 °C 10''	Ciclo (x25)	Desnat	98 °C 10''
FW (10µM)	1 µL		Anillado	60 °C 30''		Anillado	58 °C 30''
RV (10µM)	1 µL		Extensión	72 °C 30''		Extensión	72 °C 49''
DNA	25 ng	Terminación	72°C 10'	Terminación	72°C 10'		
<i>Phusion</i> (2U/µL)	0.5 µL						

Los productos de ambas reacciones de PCR purificados con el kit NZYGelpure (Nzytech) se emplearon posteriormente como molde para la tercera reacción de PCR. Gracias a la complementariedad de bases entre ambos fragmentos conseguida en las amplificaciones anteriores, el producto de PCR contendrá una fusión de ambos genes. Los cebadores se indican en la **Tabla 1** del **Anexo I**, y las condiciones y componentes en la **Tabla 3**. En las tres PCRs se empleó la polimerasa *Phusion* (Thermo Scientific™).

Tabla 3. Componentes y condiciones empleadas en la PCR de solape para la amplificación de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*.

Componentes (por reacción)		Programa PCR		
H ₂ O	Hasta 50 µL	Desnaturalización	98 °C 30''	
<i>Phusion Buffer</i> 5X	10 µL	Ciclo 1 (x5) Anillado homólogos	Desnat	98 °C 10''
dNTPs (10µM)	1 µL		Anillado	45 °C 30''
FW (10µM)	1 µL		Extensión	72 °C 1,10''
RV (10µM)	1 µL	Ciclo 2 (x18) Anillado cebadores	Desnat	98 °C 10''
DNA TurboID	15 ng		Anillado	58 °C 30''
DNA AtCRBN	25 ng		Extensión	72°C 1,10''
<i>Phusion</i> (2U/ µL)	0.5µL	Terminación	72 °C 10	

La comprobación de la obtención de los fragmentos de fusión *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se purificaron los productos de PCR empleando una versión optimizada del kit NZYGelpure (Nzytech). La concentración y pureza del DNA se confirmó con el equipo ND 100 Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000).

Finalmente, antes de que los amplicones fueran clonados en pCR8/GW/TOPO, se prepararon adicionando una base de adenina en el extremo 3'. Esta base resulta imprescindible para la reacción de clonaje. Para adicionar la adenina se incubó, durante 20 minutos a 72 °C, 50 µL de la mezcla descrita en la **Tabla 4**. Los productos quedaron así listos para su clonaje en pCR8/GW/TOPO.

Tabla 4. Componentes de la reacción para la adición de A en el extremo 3' de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*

Compuesto	Concentración final
Producto de PCR purificado	1.5 pmol
dATP (10mM)	0.2 mM
PCR buffer 10X	1x
<i>Taq</i> DNA polimerasa (Netzyme) (1U/ µL)	1U

3.3.2. Reacción TOPO de clonación

Para el clonaje de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* se utilizó el método de clonaje Gateway pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™), un plásmido que contiene los sitios de recombinación *attL*. Los ng de inserto requeridos se calcularon en función del número de bases que los componen (**Ecuación 1**). La concentración adecuada de inserto se preparó en 4µL, y se añadió además 1 µL de solución salina (Invitrogen™). Posteriormente se mezclaron 2.5 µL de la disolución previa con 0.5 µL de TOPO-vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™), y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Las bacterias de *E. coli* DH5α se transformaron mediante el procedimiento señalado en el apartado de métodos con material bacteriano, y se sembraron en medio LB sólido con espectinomicina, antibiótico para el que pCR8 otorga resistencia (Spect^R).

$$ng \text{ necesarios} = pb \times 0.007 \quad \text{Ecuación 1. (Untergasser, 2006)}$$

3.3.3. Reacción LR de clonación

La reacción LR se llevó a cabo para clonar *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*, en los vectores de destino pMDC43 y pAlligator2. Esta reacción se realizó con el enzima *LR Clonase*™, mediante la recombinación entre los sitios *attL* y *attR*. Para realizar la reacción LR se emplearon 25 ng del plásmido de entrada pCR8 (pCR8/*TurboID_AtCRBN* y pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN*), y 50 ng del vector de destino (pMDC43 o pAlligator2). En el caso de las reacciones LR cuyo vector de entrada y de destino tienen la misma resistencia a antibióticos, (pCR8 y pAlligator2), el vector de entrada pCR8 fue previamente digerido con *EcoRV* (descrito en el apartado 3.3.5.) a fin de linealizar los vectores de entrada y limitar la transformación de células competentes con ellos. Los vectores digeridos fueron recuperados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (apartado 3.3.6.) y posterior purificación a partir del gel empleando una versión optimizada del kit NZYGelpure (Nzytech). Tras adicionar 1 µL de *LR Clonase*™ (Invitrogen™ *LR Clonase*™ Enzyme Mix) se incubó la mezcla 1 h (para *TurboID_AtCRBN*) o 24 h (para *TurboID_linker_AtCRBN*) a temperatura ambiente y se añadieron 0.5 µL de *Proteinase K* (Invitrogen™). Una vez incubada esta solución a 37 °C durante 10 minutos, se transformaron las células competentes de la cepa DH5α (procedimiento descrito en métodos con material bacteriano), y estas fueron sembradas en medio LB sólido con el antibiótico kanamicina, para el cual pMDC43 otorga resistencia (Kan^R); o con espectinomicina, para la que pAlligator2 confiere resistencia. Es la coincidencia entre la resistencia que confieren pCR8 y pAlligator2 el motivo por el cual se realiza la digestión previa de pCR8 mencionada anteriormente. El proceso de clonación se representa en la **Figura 5**.

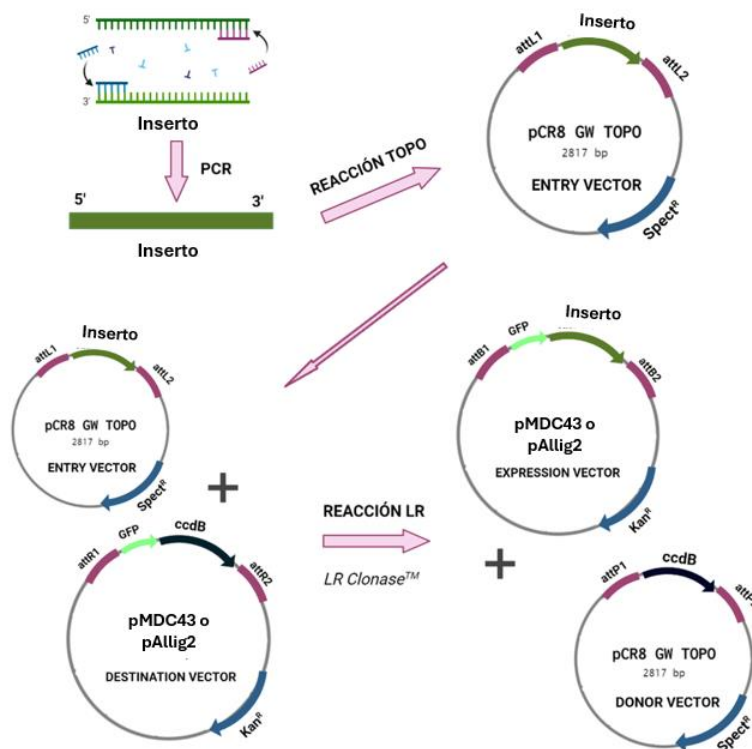


Figura 5. Estrategia de clonación mediante tecnología Gateway para el clonaje de un inserto de interés. El inserto de interés es amplificado mediante PCR y clonado en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO mediante la reacción TOPO. Este vector contiene el inserto de interés flanqueado por los sitios de recombinación *attL* que, como su nombre indica, recombinan con los sitios de recombinación *attR* del vector de destino pMDC43 o pAlligator2, que flanquean un “gen asesino” *ccdB*. De este modo, gracias a la acción del enzima *LR Clonase™*, el inserto de interés se introduce en el vector de destino, que pasa a denominarse vector de expresión, y el gen *ccdB* sustituye al inserto en pCR8, denominándose vector donante. Los plásmidos mantienen sus respectivas resistencias, y los sitios de recombinación se convierten en *attB* y *attP* respectivamente. Figura de elaboración propia creada con Biorender.com.

3.3.4. Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se siguió un protocolo modificado a partir del desarrollado en el QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Este método está basado en la lisis alcalina, y requiere 4 mL de cultivo saturado de *E. coli* como material de partida. Las soluciones empleadas para la extracción del DNA plasmídico fueron: P1 (50mM Tris-HCl pH=8.0; 10mM EDTA; 0.1 mg/mL RNasa A), P2 (0.1M NaOH; 10 mM EDTA; 2% SDS), N3 (4.2M cloruro de guanidinio, 0.9M KAc; pH 4.9), PE (10 mM Tris, 80% EtOH pH 7.6) y EB (10 mM Tris- HCl; pH 8.5).

Se cuantificó el DNA plasmídico resultante de la extracción mediante el NanoDrop ND-1000, mencionado anteriormente.

3.3.5. Digestiones con enzimas de restricción de los plásmidos pCR8, pMDC43 y pAlligator2

La digestión con enzimas de restricción se realizó para comprobar la correcta clonación de los insertos en los diferentes vectores. Para los clones en pCR8, la presencia o ausencia de inserto se confirmó realizando una digestión en un volumen final de 20 μ L con 0.3 μ L del enzima *EcoRI* y 2 μ L de *Buffer EcoRI* 10X. Respecto a la direccionalidad del inserto, esta fue evaluada en las construcciones de los tres plásmidos (pCR8, pMDC43 y pAlligator2) mediante el empleo de dos enzimas diferentes por construcción. En todos los casos, se seleccionó un enzima con su secuencia diana presente en el plásmido, y otro enzima cuya secuencia diana está en el inserto, estando presentes ambas secuencias únicamente una vez en la construcción completa. El diseño de las reacciones y selección de los enzimas de restricción se realizó *in silico* empleando la herramienta Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>).

Para las construcciones en pCR8 se empleó *XbaI*, que presenta su secuencia diana en el plásmido, por lo que fue empleado para la comprobación de las dos construcciones pCR8/TurboID_AtCRBN y pCR8/TurboID_linker_AtCRBN. Los otros dos enzimas empleados fueron *DraI*, cuya secuencia diana se encuentra en el inserto *TurboID_AtCRBN*; y *NcoI*, con su diana presente en el inserto *TurboID_linker_AtCRBN*. En un volumen final de 20 μL se adicionaron 0.3 μL de *XbaI*, 0.3 μL de *DraI* o de *NcoI* y 4 μL de Tango Buffer 10X, más 750 ng de plásmido. Por último, para la construcción pCR8/TurboID se empleó *EcoO109*, cuya secuencia diana está en el plásmido, y *Sall*, que corta en el inserto *TurboID*. La reacción de digestión también se realizó en un volumen final de 20 μL con 0.3 μL de *EcoO109*, 0.6 μL de *Sall* y 4 μL de Tango Buffer 10X, además de 750 ng de plásmido.

Para las construcciones en pMDC43, se empleó en todos los casos el enzima *HindIII*, cuya secuencia diana se encuentra una sola vez en el plásmido. En cuanto a los enzimas cuya secuencia diana se encuentra en el inserto, se seleccionó *Sall* para la comprobación de la construcción pMDC43/TurboID y *BglII* para pMDC43/TurboID_AtCRBN y pMDC43/TurboID_linker_AtCRBN. Para un volumen final de 20 μL se adicionaron 0.6 μL de *HindIII*, 0.6 μL de *Sall*, 4 μL de Buffer Tango 10X y 750 ng de material plasmídico pMDC43/TurboID. Para las otras dos construcciones, en el mismo volumen final se añadieron 0.3 μL de *HindIII*, 0.6 μL de *BglII*, 2 μL de R Buffer 10X y 750 ng de plásmido pMDC43/TurboID_AtCRBN o pMDC43/TurboID_linker_AtCRBN.

En el caso de las construcciones en pAlligator2, para comprobar la clonación del inserto *AtCRBN* se realizó una digestión en volumen final de 20 μL con 0.6 μL de *PvuII*, 0.6 μL de *BglII*, 2 μL de R Buffer y 750 ng del plásmido pAllig2/AtCRBN. Para las construcciones con el resto de insertos se empleó *HindIII*, cuya secuencia diana se encuentra en pAlligator2. El segundo enzima empleado para comprobar pAllig2/TurboID fue *Sall* (0.6 μL de *HindIII*, 0.6 μL de *Sall*, 4 μL de Buffer Tango 10X, 750 ng de plásmido para un volumen de 20 μL). En el caso de pAllig2/TurboID_AtCRBN y pAllig2/TurboID_linker_AtCRBN se emplearon 0.3 μL de *HindIII*, 0.6 μL de *BglII*, 2 μL de R Buffer y 750 ng de plásmido para un volumen final de 20 μL .

Por último, también se llevaron a cabo digestiones de las construcciones en pCR8 para facilitar la selección de colonias transformadas con pAlligator2 en detrimento de aquellas transformadas con pCR8, indiferenciables en el medio de selección con espectinomicina. Se empleó el enzima de restricción *EcoRV*. Para un volumen final de 40 μL se añadieron 1.2 μL de *EcoRV*, 4 μL de R Buffer y 1.5 μg de plásmido).

En todos los casos, la incubación para la reacción de digestión se llevó a cabo durante 1h a 37 °C.

3.3.6. Electroforesis en gel de agarosa

La comprobación de la obtención de productos de amplificaciones, clonajes y digestiones correctos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. La composición de los geles fue de 0.8% (p/v) para productos de menor tamaño y 1% (p/v) para productos de mayor tamaño en tampón TBE 0.5X con GelRed (Biotium) al 0.5 % (v/v). Se escogió como marcador de peso molecular el marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, y el voltaje empleado fue de 100V.

3.3.7. Secuenciación y alineamiento de secuencias

La correcta clonación de las construcciones *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* se comprobó primero mediante digestión con enzimas de restricción, descrito anteriormente, y por secuenciación Sanger. Las muestras positivas en las digestiones fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación del IBMCP, con un secuenciador capilar ABI 3130 XL (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para la secuenciación se indican en el **Anexo I, Tabla 1**.

Los resultados de secuenciación fueron procesados mediante su alineación con las construcciones diseñadas *in silico* con la herramienta Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>), permitiendo la comparación entre ambas secuencias.

3.4. Métodos con material bacteriano

3.4.1. Transformación *Escherichia coli*

Las células competentes DH5 α se transformaron con la técnica de choque térmico. La alícuota de 50 μ L de células DH5 α competentes se descongeló en hielo, y se incubó con el plásmido de interés durante 20 minutos en hielo. Se les aplicó un choque térmico de 42 °C durante 30 segundos, y se transfirieron inmediatamente a hielo durante 2 minutos. Se añadió 1 mL de medio SOC (2% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa), en el que se recuperaron las células durante 1 h a 37 °C y 200 rpm. Las bacterias se sembraron en placa Petri con los antibióticos correspondientes.

3.4.2. Transformación *Agrobacterium tumefaciens*

Las células de *A. tumefaciens* competentes de las cepas C58C1 y GV1301 se transformaron mediante la técnica de choque térmico. Para ello, una vez descongelada en hielo la alícuota de 100 μ L de células, se añadieron 5 μ L de plásmido, y la mezcla se incubó 5 minutos a 37 °C y 200 rpm para ser congelada posteriormente con nitrógeno líquido (N₂) durante 1 minuto. Tras su descongelación en hielo, se añadió medio LB líquido en el que las células se recuperaron durante 3 h a 28 °C y 180 rpm. Las células se sembraron en placas Petri con los antibióticos correspondientes.

3.4.3. Glicerizados

Las bacterias transformadas con el material plasmídico deseado (previamente validado mediante digestión y secuenciación) se glicerizaron en viales criogénicos (Cryoware, Thermo Scientific). Para ello se añadieron 500 μ L de cultivo saturado de células transformadas y 500 μ L de glicerol al 80%. Tras mezclarse ambos mediante vórtex, fueron inmediatamente congelados a -80 °C.

3.5. Métodos con material vegetal

3.5.1. Transformación estable en *Arabidopsis thaliana*

La transformación estable de *A. thaliana* se llevó a cabo mediante la técnica de *floral dip* (Clough & Bent, 1998). Las células de *A. tumefaciens* C58C1 y GV1301 transformadas con las construcciones de interés se cultivaron en LB líquido con Rifampicina (100 mg/L) y Kanamicina (50 mg/L) para las construcciones en pMDC43 o Espectinomomicina (100 mg/L) para las construcciones en pAlligator2. Una vez recuperadas mediante centrifugación (20 minutos a 4500 rpm) se resuspendieron en solución de infiltración (5% sacarosa, 10 mM MES pH 5.7, 0.02% SILWET-77). Las flores de *A. thaliana* de plantas de un mes de edad fueron sumergidas 30 segundos en dicha solución con bacterias transformadas. El protocolo se describe en la **Figura 6**.

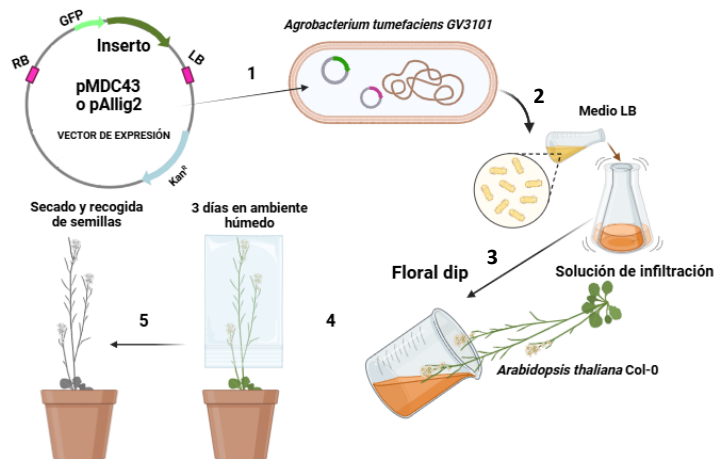


Figura 6. Protocolo de transformación estable de *Arabidopsis thaliana* mediante *floral dip*. **1.** Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pMDC43/AtCRBN. **2.** Cultivo de *A. tumefaciens* en medio

selectivo y preparación de la solución de infiltración. **3.** Floral dip, sumergiendo las flores en la solución de infiltración. **4.** Mantenimiento del ambiente húmedo con una bolsa de plástico durante 3 días. **5.** Crecimiento de las plantas transformadas, secado y recogida de semillas. Figura de elaboración propia creada con Biorender.com.

Para la selección de semillas transgénicas resistentes a higromicina, se sembraron las semillas en las condiciones descritas anteriormente y se les aplicó un pulso de luz de 5h. Posteriormente se envolvieron las placas en papel de aluminio y se incubaron durante tres días. Se retiró el papel de aluminio y se incubaron 72h a 22 °C con luz continua indirecta (Harrison *et al.*, 2006). Se seleccionaron aquellas plántulas que presentaron elongación del hipocotilo.

3.5.2. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

3.5.2.1. Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria de *N. benthamiana* se realizó mediante la infiltración de *A. tumefaciens* siguiendo el protocolo de Voinnet *et al.*, 2003. Las células de *A. tumefaciens* C58C1 transformadas con las construcciones de interés se cultivaron en LB líquido con Rifampicina (100 mg/L) y Kanamicina (50 mg/L). Una vez recuperadas mediante centrifugación (15 minutos 4000 rpm) se resuspendieron en solución de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6, acetosiringona 200 µM) y se ajustó la solución a una OD de 0.1. Por último, se infiltraron las hojas de *N. benthamiana* con la solución bacteriana, aplicando una jeringuilla de 1 mL en el envés de las hojas. El perímetro de la región infiltrada se marcó con rotulador permanente para su posterior identificación.

3.5.2.2. Infiltración con biotina

La infiltración con biotina se realizó 72h después de la agroinfiltración. Se infiltraron soluciones a dos concentraciones de biotina (Fischer Scientific) diferentes 50 µM (2.5 mM MgCl₂, 50µM biotina, 50 µM MG132) y 200 µM (2.5 mM Cl₂Mg, 200µM biotina, 50 µM MG132) y la solución control (2.5 mM Cl₂Mg, 0µM biotina, 50 µM MG132). El material infiltrado fue recogido 6 h después de la infiltración con biotina en nitrógeno líquido (N₂) y almacenado a -80 °C.

3.6. Métodos con proteínas

3.6.1. Extracción de proteínas a partir de material vegetal

Se llevó a cabo un protocolo rápido para la extracción de proteínas, para el que se trituraron con el equipo Hei-TORQUE Expert 100 (Heidolph) tres discos de hoja de *N. benthamiana* o 9 plántulas de *A. thaliana* crecidas durante 10 días. Durante su trituración, las muestras se mantuvieron permanentemente congeladas en nitrógeno líquido (N₂). Se adicionaron 250 µL de Laemmli 2x (125 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% glicerol, 4% SDS, 0.004% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol), y se incubaron durante 5 minutos a 95 °C. La mezcla fue centrifugada 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C, y se recogió sobrenadante, en el que se encuentran las proteínas. En el caso de las muestras que debían ser enriquecidas en proteínas biotiniladas, se sustituyeron los 250 µL de Laemmli 2x por 1 mL de tampón de extracción de proteínas (100 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% Glicerol, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1% cóctel de inhibidores de proteasas, 1 mM PMSF, 1% NP40) por cada 0.5 g de tejido. La mezcla se incubó en un rotor a 4 °C durante 30 minutos. En este caso la centrifugación de las muestras fue durante 15 minutos a 14000 rpm a 4°C, y se recuperó el sobrenadante.

3.6.2. Cuantificación de proteínas por Bradford

Las proteínas de las muestras extraídas fueron cuantificadas mediante el método Bradford (Bradford, 1976). Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. La recta de calibrado se realizó con concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (BSA), y se emplearon 2 µL de cada muestra problema. Para la reacción se usaron 150 µL de reactivo de Bradford (BioRad) por pocillo. Para la obtención de los resultados se empleó el lector de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad).

3.6.3. Western Blot

Las muestras de proteínas del apartado 3.6.1. preparadas con Laemmli fueron evaluadas mediante Western Blot. Se emplearon geles SDS-PAGE del 10% y del 12% de acrilamida (30% acrilamida, 1.5 Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED), dependiendo de la resolución requerida, con el sistema MiniProtean® de BioRad. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1% SDS) a un voltaje constante de 150V, durante aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente.

La transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ 0.45 µm NC) se realizó mediante transferencia húmeda a un amperaje constante de 90mA durante 16 h a 4 °C, en la solución de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol). La transferencia fue comprobada tiñendo la membrana con Ponceau-S (Sigma-Aldrich).

Tras la transferencia, se incubó la membrana con solución de bloqueo (1x TBS, 0.1% Tween-20, 5% w/v de leche desnatada en polvo) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-GFP (ChromoTek GFP Monoclonal antibody - 3H9) (1/1000) o con el conjugado streptavidin-HRP (Cytiva Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate) (1/5000) en solución de bloqueo (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente o 16 h a 4 °C. La membrana se lavó tres veces con solución de lavado T-TBS (1x TBS y 0.1% Tween-20). En el caso de haber empleado el anticuerpo anti-GFP, se incubó la membrana 1 h más a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rat-HRP (Amersham™ ECL Rat IgG) (1/10000) diluido en solución de bloqueo 1% (v/v). Tras lavar en las mismas condiciones que las anteriores, se reveló la membrana con el reactivo de detección SignalBright Pro Chemiluminescent Substrate (Proteintech®), y la detección se realizó utilizando el sistema de imagen LAS-3000 (Fuji).

3.6.4. Enriquecimiento en proteínas biotiniladas

La biotina libre presente en los extractos fue retirada usando columnas de desalado (PD-10 columns, Cytiva), que son previamente equilibradas con solución de equilibrado (100 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% Glicerol, 5 mM EDTA, 2 mM DTT). La fracción de eluido con proteínas se recuperó y se incubó con *beads* magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1, Invitrogen) en un rotor durante 3 h a 4 °C. Las *beads* magnéticas se lavaron con 5 tampones de lavado diferentes: I (0.5 % Dodecilsulfato sódico), II (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0.5% deoxicolato de sodio), III (10 mM Tris pH 7.5, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio), IV (50 mM Tris pH7.5) y V (1X TBS pH7.4). Se empleó el *rack* magnético DynaMag™-2 (Invitrogen) para la recuperación de las *beads*. Las proteínas se eluyeron de las *beads* en Laemmli 2x (125 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% glicerol, 4% SDS, 0.004% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol) a 95 °C durante 10 minutos. Protocolo adaptado de (Zhang *et al.*, 2021).

3.6.5. Proteómica

Las muestras fueron procesadas en las instalaciones de proteómica de la Universitat de València. La preparación y digestión de las muestras se realizó siguiendo el protocolo SP3 descrito por Müller *et al.*, 2020. El análisis de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se realizó en un sistema Evosep One con una columna analítica (PepSep c18 15 cm x 150 µm, 1,5 µm; Evosep) conectado a un espectrómetro de masas Tims TOF flexX (Bruker). Los péptidos eluidos se ionizaron en un aerosol cautivo con 1700 V a 200 °C y se analizaron en modo ddaPASEF. La identificación de proteínas con el sistema PASER (Bruker) empleó el algoritmo Sequest (ProLuCID), empleando SwissProt_230310 como base de datos. Se tuvieron en cuenta las proteínas con un FDR ≤ 1%. Para la identificación de proteínas en la base de datos Uniprot_Nicotiana_bentamiana_230921 se empleó la herramienta MSFragger. Para la identificación de homólogos en *A. thaliana* se empleó la herramienta BLAST en la base de datos TAIR. La comparación entre listas de proteínas se realizó empleando la herramienta bioinformática “Draw Venn Diagram” (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

3.7. Microscopía Confocal

3.7.1. Preparación de muestras

Las hojas de diferentes plantas agroinfiltradas con 72h de antelación (apartado 3.5.2.1.) fueron recogidas y con un sacabocados se obtuvieron discos de muestra. Estos se montaron en portaobjetos con el envés en la parte superior y con agua para mantener la humedad.

3.7.2. Condiciones de adquisición de imágenes

Las imágenes se adquirieron con el microscopio de escaneo láser Zeiss LSM 780 AxioObserver.Z1 y el objetivo de inmersión en agua C-Apochromat 40x/1.20 W. El fluoróforo GFP se excitó a una longitud de onda de 488 nm, y la fluorescencia de emisión se detectó a 500-530 nm. La clorofila se detectó en un rango de 650 a 700 nm. Todas las imágenes también se obtuvieron con luz transmitida. Las imágenes adquiridas se procesaron empleando el software ZEN (ZEISS Efficient Navigation) Lite 2012 e ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS

4.1. Clonaje de fusiones *TurboID*_AtCRBN

4.1.1. Amplificación por PCR de solape de *TurboID*_AtCRBN y *TurboID*_linker_AtCRBN

El inicio del presente trabajo se basó en la generación de herramientas genéticas que permitieran el desarrollo de la técnica de marcaje de proximidad TurboID para la identificación de proteínas interactoras de AtCRBN. Para ello, se generaron las construcciones *TurboID*, *TurboID*_AtCRBN y *TurboID*_linker_AtCRBN. Estas dos últimas difieren en la presencia de un *linker* entre *TurboID* y AtCRBN para evitar el impedimento estérico que pudiera causar la fusión de ambas proteínas. Para clonar *TurboID*, se realizó una PCR con los cebadores FW_TurboID_ol y RV_TurboID_pCR8 (**Anexo I, Tabla 1**) usando como molde un plásmido que contiene *TurboID* (cedido por el laboratorio del Dr. David Alabadí, IBMCP) y el enzima *Phusion* para minimizar la introducción de errores durante la amplificación. La correcta amplificación de *TurboID* se comprobó con una electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1% (**Figura 7**). Se obtuvo una banda correspondiente a un tamaño de aproximadamente 900 pb, lo que se corresponde con la longitud de *TurboID*.

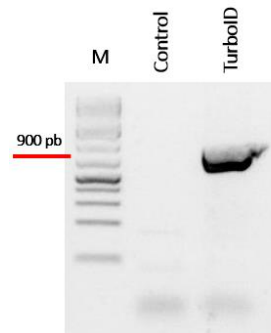


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% de *TurboID* amplificado por PCR. El carril “M” hace referencia al marcador; “Control” al control negativo (PCR en igualdad de condiciones, pero usando agua como molde); y producto de PCR para la amplificación de *TurboID*.

En cuanto a la generación de las fusiones *TurboID*_AtCRBN y *TurboID*_linker_AtCRBN, se obtuvieron mediante la técnica de PCR de solape, usando también el enzima *Phusion*. Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de los fragmentos que se van a fusionar. Para amplificarlos se utilizan cebadores con regiones solapantes de 20-30 pb entre los fragmentos. Posteriormente, estos productos de amplificación capaces de anillar entre ellos se emplean como molde para ensamblar los fragmentos fusionados mediante una PCR final (**Figura 8**).

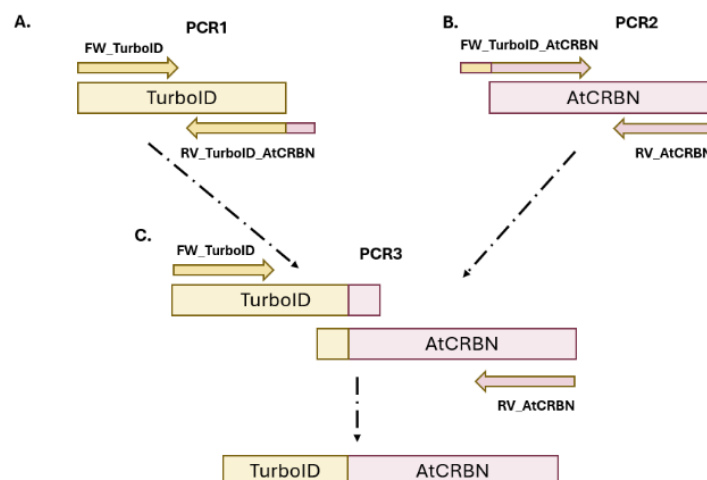


Figura 8. Estrategia de amplificación por PCR de solape. **A.** En la PCR1, el primer fragmento es amplificado con un cebador directo complementario al extremo 5' de su secuencia y un cebador reverso especial, complementario al extremo 3' de su secuencia seguido del inicio de la secuencia del extremo 5' del segundo fragmento. **B.** En la PCR2 el segundo fragmento es amplificado con un cebador reverso complementario a su extremo 3' y un cebador directo complementario al extremo 5' de su secuencia. **C.** El producto de la PCR3 es el fragmento fusionado TurboID-AtCRBN.

extremo 3', y un cebador directo especial cuyo inicio es complementario al extremo 3' del primer fragmento. **C.** En la PCR3 los productos de las PCR 1 y 2 actúan como molde y anillan por la complementariedad de bases en sus extremos. Empleando los cebadores directo y reverso se obtiene como producto de PCR la secuencia de ambos fragmentos fusionada.

Primero se amplificó de manera independiente *TurboID* y *AtCRBN*, empleando cebadores especiales para preparar ambos fragmentos para la PCR de solape. Estos cebadores tienen en su extremo 3' (en el caso de *TurboID*) o 5' (en el caso de *AtCRBN*) bases complementarias a la secuencia del otro fragmento, para posibilitar su posterior anillamiento. La amplificación de *TurboID* se realizó a partir del producto purificado de PCR de la secuencia de *TurboID*, y las parejas de cebadores FW_ TurboID_ol y RV_ TurboIDol_ AtCRBN para la fusión *TurboID_AtCRBN* o FW_ TurboID_ol y RV_ TurboIDol_ linker para la fusión *TurboID_linker_AtCRBN* (**Anexo I, Tabla 1**). Por su parte, para la amplificación de *AtCRBN* usamos como molde un gen sintético (IDT, <https://eu.idtdna.com/pages>), sometido a una optimización del uso de codones para su expresión en *E. coli* y *A. thaliana*, sobre la secuencia presente en la base de datos TAIR. Se utilizaron para ello las parejas de cebadores FW_ AtCRBNol_ TurboID y RV_ AtCRBN_ol para la fusión *TurboID_AtCRBN* o FW_ AtCRBNol_ TurboID_link y RV_ AtCRBN_ol para la fusión *TurboID_linker_AtCRBN* (**Anexo I, Tabla 1**), que diseñamos en base a la secuencia de *AtCRBN*. La amplificación de ambos productos de PCR fue comprobada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 9. A. y B.**).

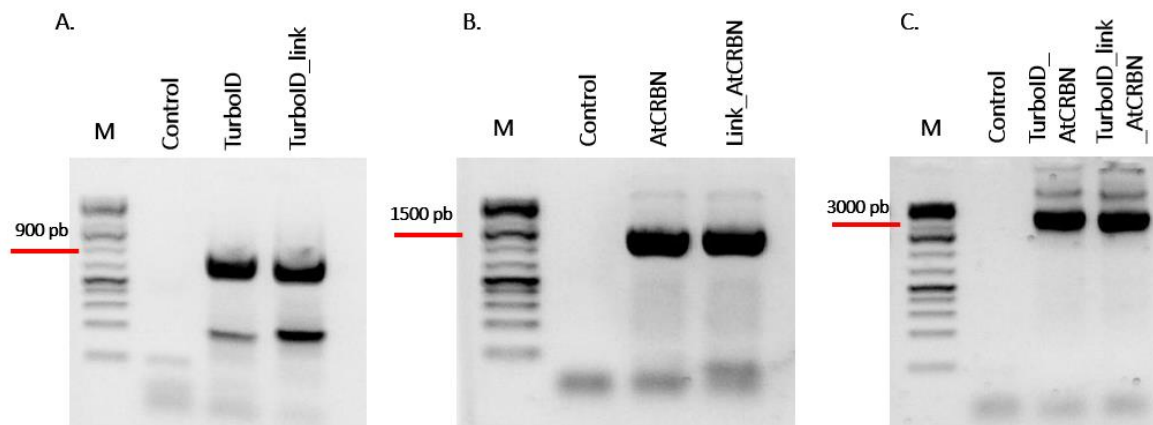


Figura 9. Amplificación de los fragmentos necesarios para la PCR de solape de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR. **A.** Electroforesis del producto de PCR1 realizada para la preparación de *TurboID* para la PCR de solape. El carril “M” hace referencia al marcador; “Control” hace referencia al control negativo (PCR en igualdad de condiciones, pero usando agua como molde); “TurboID” a la amplificación de *TurboID* para su fusión a *AtCRBN* sin *linker*; y “TurboID_linker” a la amplificación de *TurboID* para su fusión a *AtCRBN* mediante un *linker*. **B.** Electroforesis del producto de PCR2 realizada para la preparación de *AtCRBN* para la PCR de solape. “AtCRBN” es el producto de amplificación de *AtCRBN* para su fusión con *TurboID* sin *linker*; y “linker_AtCRBN” para su fusión con *TurboID* mediante *linker*. **C.** Electroforesis del producto de la PCR3 de solape entre los fragmentos *TurboID* y *AtCRBN* obtenidos en las PCR1 y PCR2 (apartados **A.** y **B.**).

En el caso de la amplificación de *TurboID* para la adición en su extremo 3' de las primeras 26 bases complementarias al extremo 5' de *AtCRBN*, y en su caso del *linker* entre ambos genes, el fragmento esperado era de alrededor de 900 pb. Como se observa en la **Figura 9.A.**, las bandas con mayor intensidad tienen el tamaño esperado. Las bandas de menor intensidad observadas alrededor de 150 pb podrían corresponderse con productos de amplificación inespecífica de una región del gen *TurboID* menor que el gen completo.

Por otra parte, el gen *AtCRBN* se amplificó con cebadores específicos a fin de adicionar a su extremo 5' 22 bases complementarias al extremo 3' de *TurboID*. En la **Figura 9.B.** se observa el correcto funcionamiento de la PCR, ya que el tamaño de las bandas (alrededor de 1500 pb) se corresponde con las 1644 pb esperadas que codifican para el gen *AtCRBN*.

A fin de eliminar el material genético no deseado producto de ambas PCR (cebadores, nucleótidos o amplificaciones inespecíficas), se realizó otra electroforesis en gel de agarosa al 1% con la totalidad del producto de PCR, para recuperar el DNA de interés mediante purificación del DNA a partir de banda de gel de agarosa. Tras la evaluación de la integridad del DNA purificado, se llevó a cabo la PCR de solape empleando como molde los productos de PCR purificados y los cebadores FW_TurboID_ol y RV_AtCRBN_ol (**Anexo I, Tabla 1**) tanto para *TurboID_AtCRBN* como para *TurboID_linker_AtCRBN*. Los productos de amplificación fueron una vez más comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (**Figura 9.C.**). La fusión entre *TurboID* (960 pb) y *AtCRBN* (1644 pb) resulta en un producto de 2604 pb (*TurboID_AtCRBN*), y 2625 en el caso de la construcción con *linker* (*TurboID_linker_AtCRBN*). Este tamaño se corresponde con el tamaño observado en la **Figura 9.C.** Ambas construcciones resultaron ser válidas *a priori* para el clonaje en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (pCR8).

4.1.2. Clonaje de *TurboID*, *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en pCR8/TOPO/GW

El clonaje del material genético de interés se realizó empleando el sistema TOPO de Gateway, clonando *TurboID*, *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en pCR8/TOPO/GW (Invitrogen™). Para ello se utilizó el kit pCR8/GW/TOPO® TA Cloning®, que aúna las tecnologías de TOPO® y Gateway®, permitiendo la clonación de productos de PCR en un solo paso, en 5 minutos y con una eficacia teórica superior al 95%. La reacción se transformó en *E. coli* DH5α y la clonación se comprobó mediante la digestión del DNA plasmídico extraído de colonias seleccionadas en medio LB con espectinomicina. Se diseñó y realizó una digestión por inserto, con la que se evaluó tanto su presencia o ausencia como su direccionalidad.

Para evaluar el clonaje de *TurboID* se extrajo DNA plasmídico de siete colonias transformadas distintas (eventos de transformación independientes), y se digirió con los enzimas de restricción *EcoO109*, cuya secuencia diana se encuentra en pCR8, y *Sall*, que tiene su secuencia diana en *TurboID* (**Anexo II, Figura 1.**). Con los productos de la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evaluar el patrón de bandas resultante (**Figura 10.A.**). A pesar de que en la electroforesis no se pueden determinar los tamaños de banda de manera precisa, sí se diferenciaron dos patrones diferentes. Como se observa en la **Figura 10.A.**, las muestras 1,2,3 y 7 presentan una segunda banda de un tamaño menor que las muestras 4,5 y 6. En caso de que *TurboID* se hubiera clonado en el sentido correcto, los fragmentos resultantes de la digestión debían ser de 3400pb y 377pb. En cambio, clonado en *antisense* debería observarse una banda de un tamaño mayor, de 818 pb. Por tanto, las muestras 1,2,3 y 7 podrían ser las positivas, ya que presentan una banda de menor tamaño. Por ello, las muestras consideradas candidatas para pCR8/*TurboID* fueron la 1, 2, 3 y 7 (a partir de ahora pCR8/*TurboID*#, siendo # el número correspondiente).

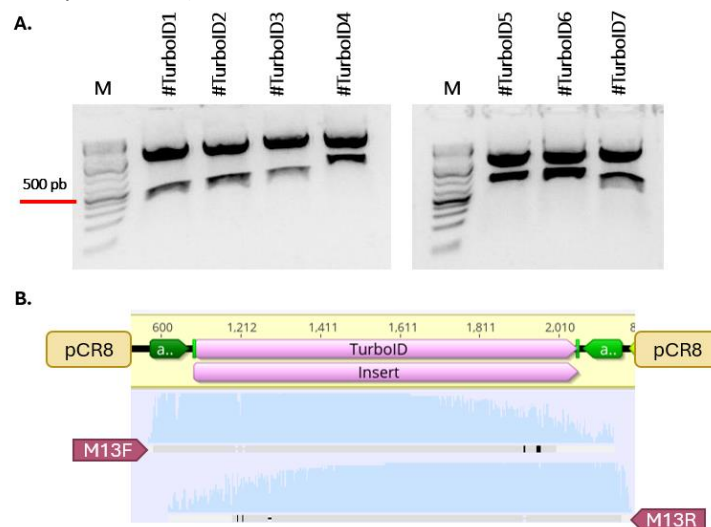


Figura 10. Comprobación del clonaje de *TurboID* en pCR8. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *EcoO109* y *Sall* del DNA plasmídico tras la reacción TOPO para el clonaje de *TurboID*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pCR8/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia

de pCR8/TurboID y los resultados de secuenciación de la construcción pCR8/TurboID1. Los cebadores empleados son M13F y M13R. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

Una vez seleccionadas mediante digestión y electroforesis las muestras candidatas a haber incorporado el inserto en sentido correcto, pCR8/TurboID1, pCR8/TurboID2, pCR8/TurboID3 y pCR8/TurboID7 fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación del IBMCP, usando los cebadores M13F y M13R (**Anexo I, Tabla 1.**) que anillan en el plásmido antes (5') y después (3') del inserto (**Anexo II, Figura 1**). Los resultados de secuenciación se evaluaron con la herramienta bioinformática Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>) (**Figura 10.B.**). Tanto pCR8/TurboID1 como pCR8/TurboID7 se confirmaron como construcciones correctas con el inserto *TurboID* clonado en pCR8 en la dirección correcta, ya que no presentaron mutaciones. Como se observa en la **Figura 10.B.** la coincidencia de bases tras el alineamiento se colorea de gris, y la discordancia de negro. Se seleccionó arbitrariamente pCR8/TurboID1 como construcción final.

Igualmente, para comprobar el clonaje de *TurboID_AtCRBN* se digirió el DNA plasmídico extraído de 8 colonias transformadas con los enzimas *XbaI*, que tiene su secuencia diana en pCR8, y *DraI*, cuya secuencia diana está en el inserto en *AtCRBN* (**Anexo II, Figura 2.**). Los resultados de la electroforesis realizada con los productos de digestión se muestran en la **Figura 11.A.** La presencia o ausencia de inserto se confirmó con la visualización de dos bandas por muestra, y todas las muestras presentaron este patrón. Sin embargo, se observan diferencias sutiles entre los patrones de las muestras 1, 3, 5 y 7 y el resto, que se deben al sentido del inserto. Se esperaban bandas de 3825 pb y 1596 pb en caso de clonarse el inserto en sentido correcto, y de 3942 y 1479 pb en *antisense*. Por tanto, las muestras candidatas para pCR8/TurboID_*AtCRBN* fueron la 1, 3, 5 y 7 (a partir de ahora pCR8/TurboID_*AtCRBN*#, siendo # el número correspondiente).

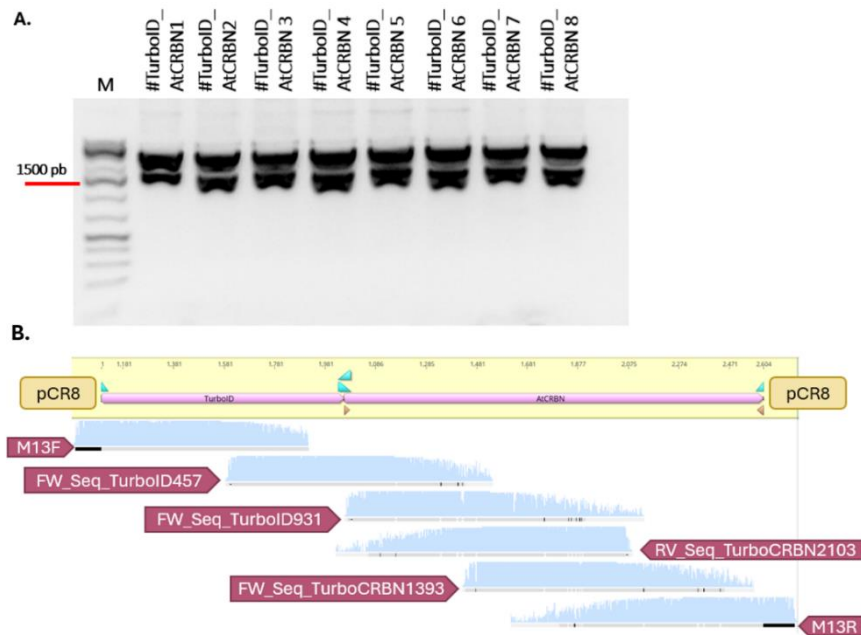


Figura 11. Comprobación del clonaje de *TurboID_AtCRBN* en pCR8. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *XbaI* y *DraI* del DNA plasmídico tras la reacción TOPO para el clonaje de *TurboID_AtCRBN*. El carril "M" hace referencia al marcador, y "#" se corresponde con pCR8/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pCR8/TurboID_*AtCRBN* y los resultados de secuenciación de la construcción pCR8/TurboID_*AtCRBN*1. Los cebadores empleados son M13F, FW_Seq_TurboID457, FW_Seq_TurboID931, y RV_Seq_TurboCRBN2103, FW_Seq_TurboCRBN1393 y M13R. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

Las muestras seleccionadas fueron secuenciadas igual que en el caso de pCR8/TurboID. Como se observa en la **Figura 11.B.**, pCR8/TurboID_*AtCRBN*1 fue validada por secuenciación, ya que la totalidad de las bases alinearon con la secuencia de referencia y no se encontró ninguna mutación generada en el proceso de amplificación. El resto de las construcciones candidatas presentaron deleciones de entre

5 y 20 pares de bases. Para secuenciar también la región central del inserto, diseñamos nuevos cebadores FW_Seq_TurboID457, FW_Seq_TurboID931, FW_Seq_TurboCRBN1393 y RV_Seq_TurboCRBN2103 (**Anexo I, Tabla 1.**) que anillan a lo largo de las secuencias de *TurboID* y de *AtCRBN*, para su secuenciación completa validando la totalidad del inserto (**Figura 11.B.**).

Por último, el clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN* se evaluó digiriendo el DNA plasmídico extraído de 8 colonias transformadas con *XbaI* y *NcoI*, que tiene su secuencia diana en el *linker* del inserto (**Anexo II, Figura 3.**). El patrón de bandas esperado tras esta digestión eran dos bandas, una de 3555 pb y otra de 1887 pb. Como se observa en la **Figura 12.A.**, las muestras 9, 10 y 16 son las que presentan un patrón más similar a lo esperado. Las muestras 12 y 13, que presentan bandas con mayor diferencia de tamaño, probablemente contengan el inserto clonado en *antisense*, para el que el patrón esperado son una banda de 4218 pb y otra de 1224 pb. Las muestras 14 y 15 no tienen DNA, y la muestra 11 presenta un patrón de bandas diferente correspondiente a tres sitios de restricción. Por tanto, las muestras candidatas para pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN* fueron la 9, 10 y 16 (a partir de ahora pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN*#, siendo # el número correspondiente). Estas muestras se secuenciaron y pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN*9 fue validada, ya que los resultados de secuenciación mostraron identidad con la secuencia de referencia como se observa en la **Figura 12.B.**

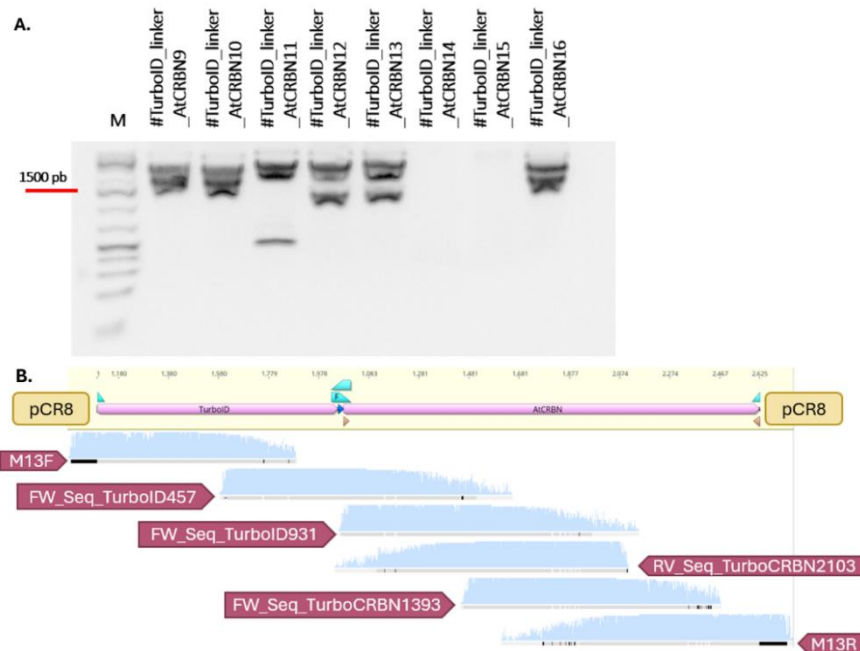


Figura 12. Comprobación del clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN* en pCR8. A. Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *XbaI* y *NcoI* del DNA plasmídico tras la reacción TOPO para el clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pCR8/. B. Alineamiento entre la secuencia de referencia de pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN* y los resultados de secuenciación de la construcción pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN*9. Los cebadores empleados son M13F, FW_Seq_TurboID457, FW_Seq_TurboID931, y RV_Seq_TurboCRBN2103, FW_Seq_TurboCRBN1393 y M13R. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

4.1.3. Clonaje de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en pMDC43

Para la expresión en planta de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_*AtCRBN* y GFP-TurboID_*linker_AtCRBN* se seleccionó el vector binario de destino pMDC43. Este vector tiene el promotor fuerte 35S para la expresión constitutiva en planta, seguido de la proteína GFP6; además de los sitios de recombinación *attR*, que flanquean el gen *ccdB*; y el gen de resistencia a kanamicina (**Anexo II, Figura 4.**). Los insertos de interés se clonaron en pMDC43 mediante el uso del enzima *LR Clonase*TM II Enzyme mix, que posibilita la recombinación entre los sitios *attR* de pMDC43 y los sitios *attL* de los clones positivos pCR8/*TurboID*1, pCR8/*TurboID_AtCRBN*1 y pCR8/*TurboID_linker_AtCRBN*9. La reacción se transformó en *E. coli* DH5 α y se seleccionaron las bacterias transformadas en medio LB con

kanamicina. Igual que en el clonaje en pCR8 (apartado 4.1.2.), las construcciones se validaron mediante análisis de restricción y secuenciación.

El clonaje de pMDC43/TurboID se evaluó mediante la extracción del DNA plasmídico de 10 colonias y posterior digestión con los enzimas *HindIII*, cuya secuencia diana está en pMDC43, y *Sall*, cuya diana está en el inserto *TurboID* (**Anexo II, Figura 5.**). Como se observa en la **Figura 13.A.**, todas las muestras presentaron el mismo patrón de bandas tras la electroforesis de los productos de digestión. Se esperaba una banda de 9958pb y otra banda de 1834pb en caso de que el inserto se hubiera clonado en el sentido correcto, por lo que la totalidad de las muestras fueron consideradas positivas. Se seleccionaron para secuenciación arbitrariamente las muestras 1, 2 y 8 (a partir de ahora pMDC43/TurboID#, siendo # el número correspondiente). Los cebadores empleados para secuenciar todas las construcciones en pMDC43 fueron GFP_pMDC43_SeqF y pMDC43_SeqR (**Anexo I, Tabla 1; Anexo II Figura 5.**), que amplifican desde el final de la secuencia que codifica para GFP (5' del inserto) hasta el inicio de pMDC43 tras el sitio de recombinación (3' del inserto). Las tres muestras se validaron y seleccionamos pMDC43/TurboID1 (**Figura 13.B.**).

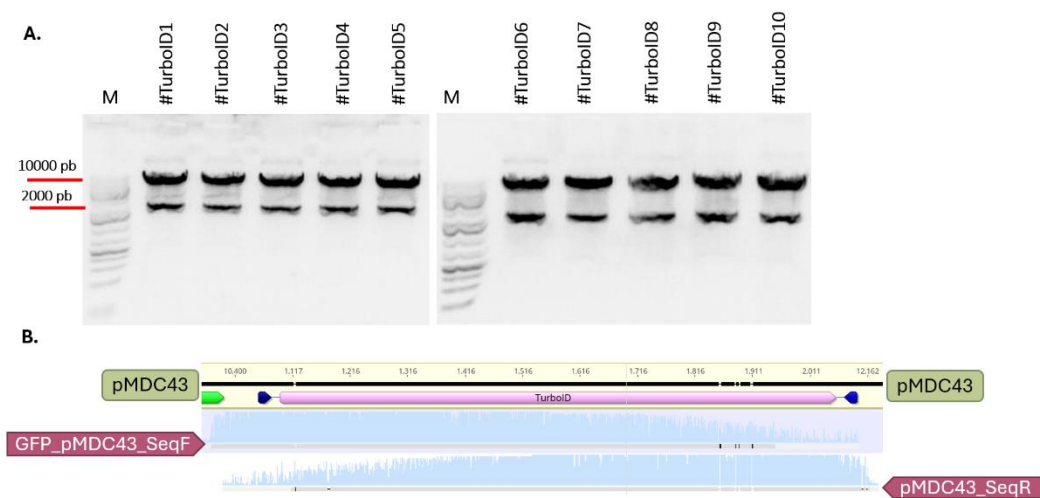


Figura 13. Comprobación del clonaje de *TurboID* en pMDC43. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *HindIII* y *Sall* del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pMDC43/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pMDC43/TurboID y los resultados de secuenciación de la construcción pMDC43/TurboID1. Los cebadores empleados son GFP_pMDC43_SeqF y pMDC43_SeqR. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

El correcto clonaje de *TurboID_AtCRBN* en pMDC43 se confirmó digiriendo con los enzimas *HindIII* y *BglII*, cuya secuencia diana se encuentra en el inserto (**Anexo II, Figura 6.**). Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis (**Figura 14.A.**), para identificar las muestras con el patrón de bandas deseado: una banda a 9857 pb y otra banda a 3579 pb si el inserto está en el sentido correcto. Todas las muestras de la 1 a la 5, así como la 7, 9 y 10 mostraron dicho patrón. Por ello fueron seleccionadas para secuenciación arbitrariamente las muestras 1, 2 y 6 (a partir de ahora pMDC43/TurboID_AtCRBN#, siendo # el número correspondiente). Todas ellas resultaron ser correctas, y se seleccionó pMDC43/TurboID_AtCRBN1 (**Figura 14.B.**).

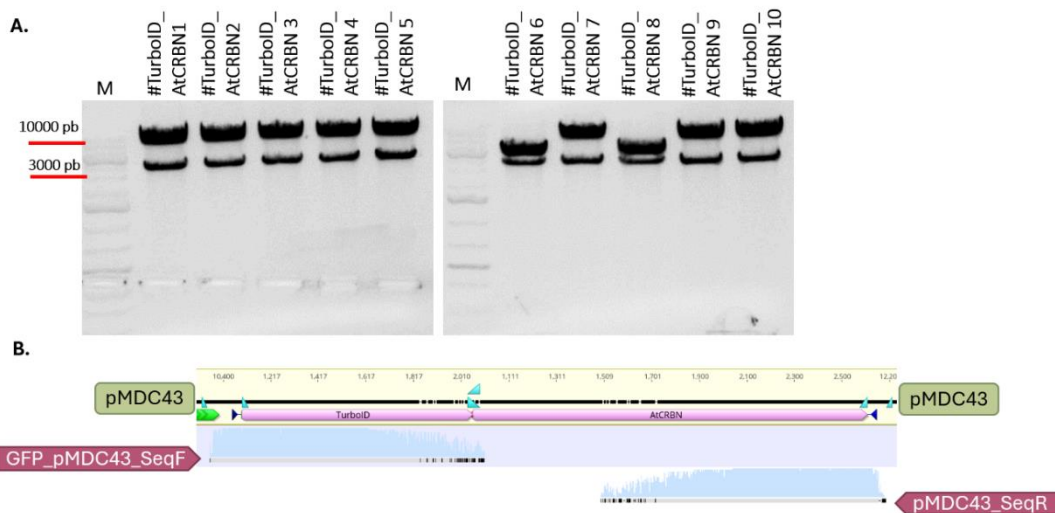


Figura 14. Comprobación del clonaje de *TurboID_AtCRBN* en pMDC43. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *HindIII* y *BglII* del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID_AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pMDC43/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pMDC43/*TurboID_AtCRBN* y los resultados de secuenciación de la construcción pMDC43/*TurboID_AtCRBN1*. Los cebadores empleados son GFP_pMDC43_SeqF y pMDC43_SeqR. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

Para evaluar el clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN* en pMDC43, se seleccionaron 10 colonias transformadas y se digirió su DNA plasmídico con los enzimas *HindIII* y *BglII* (**Anexo II, Figura 7**). El patrón esperado tras esta digestión era una banda a 9857 pb y otra banda a 3600 pb si el inserto se encuentra en el sentido correcto. Todas las muestras presentan dicho patrón (**Figura 15.A.**), excepto la 6, que parece mostrar una banda de un tamaño ligeramente menor, y la 7. Se secuenciaron con los cebadores mencionados anteriormente las muestras 1, 2 y 6 (a partir de ahora pMDC43/*TurboID_linker_AtCRBN*#, siendo # el número correspondiente). Seleccionamos pMDC43/*TurboID_linker_AtCRBN1* (**Figura 15.B.**).

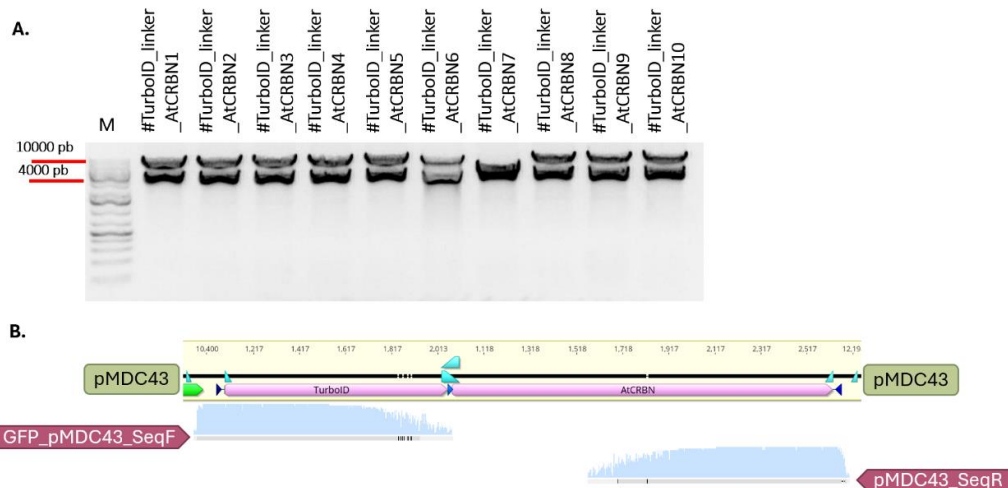


Figura 15. Comprobación del clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN* en pMDC43. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *HindIII* y *BglII* del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pMDC43/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pMDC43/*TurboID* y los resultados de secuenciación de la construcción pMDC43/*TurboID_linker_AtCRBN1*. Los cebadores empleados son GFP_pMDC43_SeqF y pMDC43_SeqR. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

Los insertos *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* no fueron secuenciados en su totalidad porque ya habían sido secuenciados con anterioridad estando clonados en pCR8, por lo que sólo debían de comprobarse los extremos para confirmar que la continuidad entre el inserto y el vector se mantiene intacta tras la inserción de los fragmentos.

4.1.4. Clonaje de *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en pAlligator2

Para aumentar las probabilidades de éxito, y no depender exclusivamente de la correcta expresión de las construcciones en pMDC43, se realizó paralelamente el mismo proceso de clonación en el vector de expresión pAlligator2. Este vector tiene el promotor fuerte 2x35S para la expresión constitutiva en planta, seguido de la etiqueta 3xHA; además de los sitios de recombinación *attR*, que flanquean el gen *ccdB*; y el gen de resistencia a espectinomicina (**Anexo II, Figura 8.**). Por tanto, estas construcciones permiten la expresión en planta de las proteínas de fusión 3xHA-TurboID, 3xHA-TurboID_AtCRBN y 3xHA-TurboID_linker_AtCRBN.

Los mismos clones positivos pCR8/TurboID1, pCR8/TurboID_AtCRBN1 y pCR8/TurboID_linker_AtCRBN9 se emplearon para la reacción LR. Sin embargo, en este caso fueron previamente digeridos con el enzima *EcoRV* (**Anexo II, Figuras 1, 2 y 3**). pCR8 y pAlligator2 otorgan resistencia al mismo antibiótico (espectinomicina), por lo que en medio LB con espectinomicina las colonias de *E. coli* seleccionadas podrían ser transformadas tanto con pCR8 como con pAlligator2. Para reducir la tasa de bacterias transformadas con pCR8, se linealiza el plásmido, permitiendo la reacción LR de recombinación, pero previniendo su transformación en *E. coli* ya que no es un plásmido circular. Tras la transformación y selección en medio LB con espectinomicina, se extrajo DNA plasmídico de las colonias positivas y se procesó mediante análisis de restricción y secuenciación.

La digestión para evaluar el clonaje de *TurboID* en pAlligator2 se realizó con los enzimas *HindIII*, cuya secuencia diana está en pAlligator2, y *Sall*, cuya diana está en el inserto *TurboID* (**Anexo II, Figura 9.**). Como muestra la **Figura 16.A.**, únicamente la muestra 4 presentó dos bandas, similares a los tamaños esperados (1139 pb y 9218 pb si el inserto está en el sentido correcto). Las demás muestras probablemente se correspondan con el vector donante en pCR8. La muestra 4, a partir de ahora pAllig2/TurboID4 fue secuenciada con los cebadores 35S_seq y NosT_seq (**Anexo I, Tabla 1.**), que anillan en los extremos del plásmido que flanquean al inserto (**Anexo II, Figura 9**). La secuenciación confirmó la direccionalidad y la ausencia de mutaciones en la construcción (**Figura 16.B**).

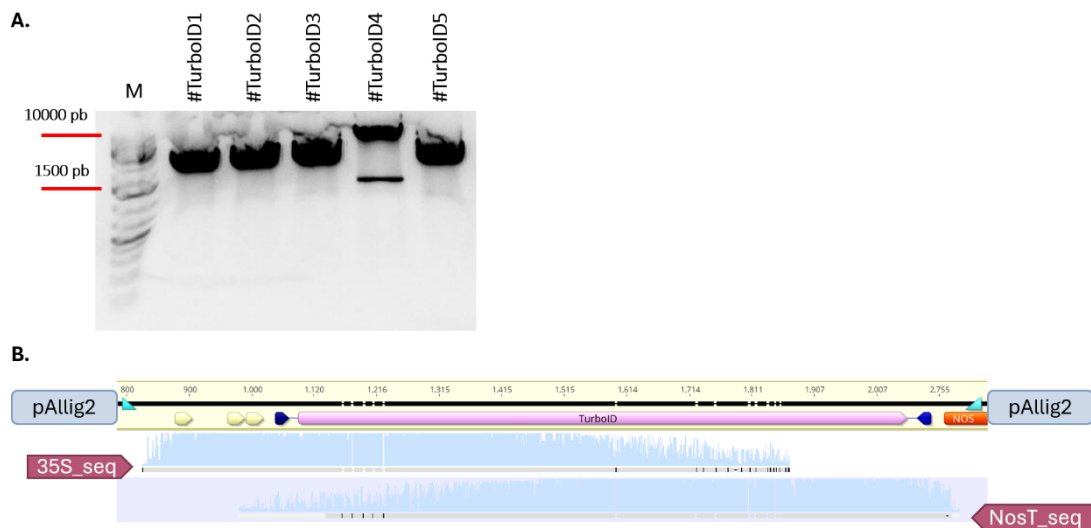


Figura 16. Comprobación del clonaje de *TurboID* en pAlligator2. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *HindIII* y *Sall* del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pAllig2/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pAllig2/*TurboID* y los resultados de secuenciación de la construcción pAllig2/*TurboID*4. Los cebadores empleados son 35S_seq y NosT_seq. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

El clonaje de *TurboID_AtCRBN* y de *TurboID_linker_AtCRBN* se comprobó igual que en el caso de pMDC43 con *HindIII* y *BglII* (**Anexo II, Figuras 10. y 11.**). Como se observa en la **Figura 17.A.**, todas las muestras del clonaje de *TurboID_AtCRBN* presentaron un patrón de corte similar, ajustado a lo esperado (una banda de 2884 pb y otra de 9177 pb). Todas las muestras se consideraron positivas. Se

seleccionaron arbitrariamente para comprobar por secuenciación las muestras 1 y 2 (a partir de ahora pAllig2/TurboID_AtCRBN#, siendo # el número correspondiente). La secuenciación, con los mismos cebadores que para pAllig2/TurboID4, permitió validar la construcción pAllig2/TurboID_AtCRBN1, ya que su direccionalidad y correspondencia de bases era la adecuada (**Figura 17.B.**).

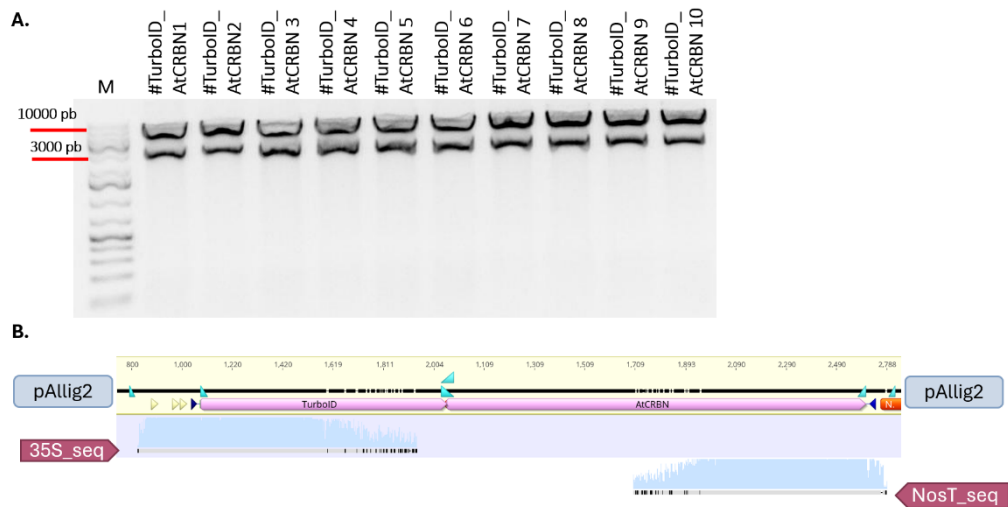


Figura 17. Comprobación del clonaje de *TurboID_AtCRBN* en pAlligator2. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *Hind*III y *Bgl*II del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID_AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pAllig2/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pAllig2/*TurboID_AtCRBN* y los resultados de secuenciación de la construcción pAllig2/*TurboID_AtCRBN*1. Los cebadores empleados son 35S_seq y NosT_seq. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

En el caso de *TurboID_linker_AtCRBN* (**Figura 18.A**), la electroforesis reveló un patrón de bandas similar al esperado (una banda de 2905 pb y banda de 9177 pb) en todas las muestras excepto en la 1. Se comprobó por secuenciación la muestra 2 con los mismos cebadores que las dos anteriores, pAllig2/*TurboID_linker_AtCRBN*2 resultó ser correcta (**Figura 18.B.**).

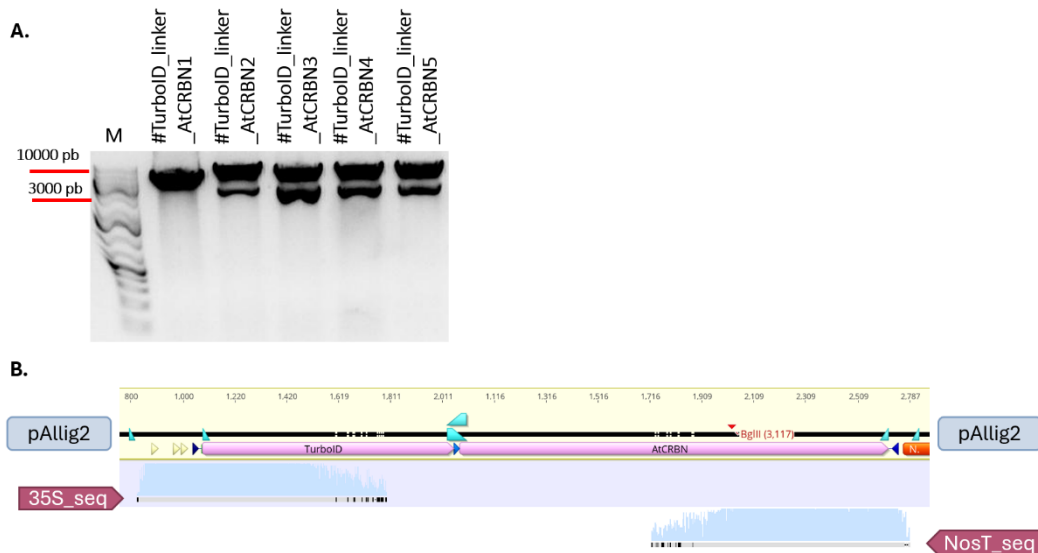


Figura 18. Comprobación del clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN* en pAlligator2. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *Hind*III y *Bgl*II del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *TurboID_linker_AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pAllig2/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pAllig2/*TurboID_linker_AtCRBN* y los resultados de secuenciación de la construcción pAllig2/*TurboID_linker_AtCRBN*2. Los cebadores empleados son 35S_seq y NosT_seq. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

Por último, *AtCRBN* ya había sido clonado previamente en pCR8 y en pMDC43 durante mi TFG, por lo que se clonó también en pAlligator2 mediante una reacción LR. El DNA plasmídico extraído de las colonias seleccionadas se digirió con *PvuII* y *BglII* (**Anexo II, Figura 12.**). Todas las muestras presentaron el patrón de banda esperado, con una banda de 10534 pb y otra banda de 507 pb (**Figura 19.A.**). Se secuenciaron con los mismos cebadores que anteriormente las muestras 1, 2 y 6 (a partir de ahora pAllig2/AtCRBN#, siendo # el número correspondiente). Como se observa en la **Figura 19.B.**, pAllig2/AtCRBN1 alineó perfectamente con la secuencia de referencia, quedando validada la construcción.

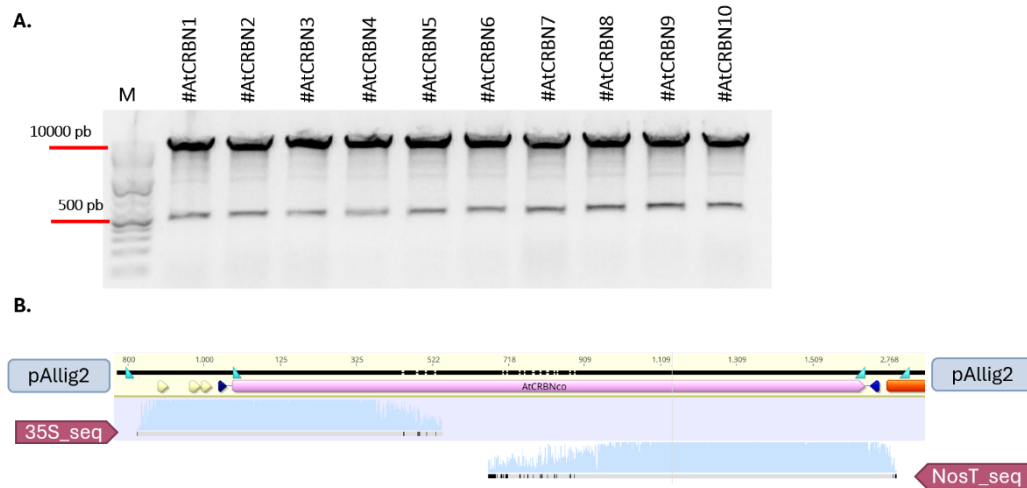


Figura 19. Comprobación del clonaje de *AtCRBN* en pAlligator2. **A.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de digestión con *PvuII* y *BglII* del DNA plasmídico tras la reacción LR para el clonaje de *AtCRBN*. El carril “M” hace referencia al marcador, y “#” se corresponde con pAllig2/. **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia de pAllig2/AtCRBN y los resultados de secuenciación de la construcción pAllig2/AtCRBN1. Los cebadores empleados son 35S_seq y NosT_seq. El color azul indica la cobertura de secuenciación y el gris coincidencia entre bases.

4.2. Expresión transitoria y localización subcelular de GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN

Para comprobar el correcto funcionamiento de las construcciones de interés antes de generar transformaciones estables en *A. thaliana*, llevamos a cabo experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana*. Transformamos *A. tumefaciens* con las construcciones pMDC43/TurboID1, pMDC43/TurboID_AtCRBN1 y pMDC43/TurboID_linker_AtCRBN1, y se preparó la solución de infiltración a una OD = 0.1. con las bacterias transformadas. A la solución de infiltración añadimos también *A. tumefaciens* transformada para expresar el supresor de silenciamiento p19 de TBSV (*Tomato Bushy Stunt Virus*). La clonación de los insertos de interés en pMDC43 y la agroinfiltración de *A. tumefaciens* transformadas con dichas construcciones permite detectar la expresión de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN en *N. benthamiana*. Esto es gracias a que pMDC43 contiene la secuencia codificante de GFP antes del sitio de recombinación, quedando en el extremo 5' del inserto.

Transcurridas 72 horas desde la agroinfiltración en las hojas de plantas independientes de *N. benthamiana*, recogimos las muestras para analizarlas con el microscopio confocal Zeiss LSM 780 AxioObserver.Z1. Excitando el fluoróforo de GFP, observamos que GFP-TurboID se expresa en el núcleo y en el citoplasma de las células de manera abundante (**Figura 20.B.**). Las proteínas de fusión GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN también se expresaron, pero la intensidad detectada fue menor que la de GFP-TurboID (**Figura 20.C. y D.**). Por tanto, la expresión de las proteínas de fusión con la proteína de interés *AtCRBN* fue núcleo-citoplasmática tal y como es de esperar y fue más reducida que la de GFP-TurboID (**Figura 20.**)

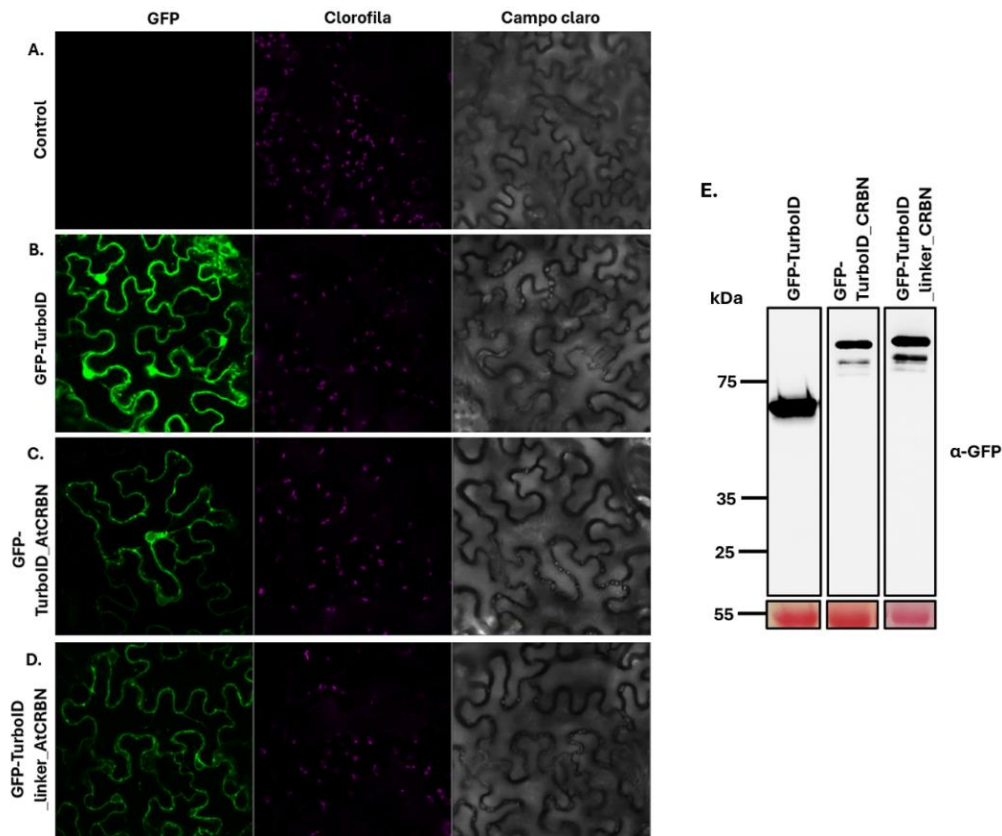


Figura 20. Comprobación de la expresión y localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN. **A-D.** Imágenes de microscopía confocal láser del envés de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas: **A.** control negativo sin infiltración; **B.** con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID + p19; **C.** con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID_AtCRBN + p19; **D.** con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID_linker_AtCRBN + p19; siendo “p19” el supresor de silenciamiento de TBSV (*Tomato Bushy Stunt Virus*). La primera columna de las imágenes (de izq. a dcha.) se corresponde con el canal de fluorescencia de GFP Ch1 (en color verde), seguida del de autofluorescencia de la clorofila Ch2 (en color magenta) y de luz transmitida (indicado como campo claro). **E.** Detección mediante Western blot de GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN extraídas de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Western blot con los anticuerpos mAb anti-GFP (1/1000) y anti-rat-HRP (1/10000), revelado mediante quimioluminiscencia. El control de carga fue la tinción de Ponceau-S (RubisCO, 55 kDa).

Para determinar si la señal de GFP obtenida mediante microscopía confocal corresponde a la versión completa de las proteínas de fusión, la expresión de las proteínas de interés también se analizó mediante Western blot (**Figura 20.E.**). Extrajimos la proteína total de las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las bacterias de *A. tumefaciens* descritas anteriormente, y realizamos una electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%. Tras la transferencia a membrana se realizó la tinción con Ponceau-S, que se empleó como control de carga. Como muestra la **Figura 20.E.**, la banda teñida con Ponceau-S correspondiente a la proteína RubisCO de 55 kDa es uniforme en los tres carriles, indicando que se cargó la misma cantidad de proteína en todos los experimentos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario anti-GFP (dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario anti-rat-HRP (1:10000), y la detección de señal en las membranas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia usando ECL como sustrato para la peroxidasa HRP. Los experimentos de Western blot confirmaron la expresión de las proteínas de interés, con una banda a 62kDa, correspondiente al tamaño de GFP-TurboID (27kDa-35kDa); y bandas alrededor de 124kDa correspondientes al tamaño de GFP-TurboID_CRBN (27kDa-35kDa-62kDa) y de GFP-TurboID_linker_AtCRBN (27kDa-35kDa-0,4kDa-62kDa). Este experimento independiente de la microscopía confocal confirmó la menor expresión de las construcciones con AtCRBN. A pesar de que las membranas son independientes y no se puede establecer una diferencia cuantitativa entre ellas, los resultados del Western blot parecen concordar con las imágenes de microscopía confocal, mostrando una mayor expresión de GFP-TurboID que de GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN (**Figura 20.**).

4.3. Optimización de las condiciones de marcaje de proximidad con biotina (TurboID) en *N. benthamiana*

Para llevar a cabo el marcaje de proximidad mediante TurboID, primero optimizamos las condiciones de biotinilación. A pesar de que las plantas contienen un nivel basal de biotina endógena, la técnica TurboID requiere la adición de biotina exógena, que en el caso de hojas de *N. benthamiana* se lleva a cabo mediante infiltración. Para determinar la concentración de biotina adecuada, se infiltraron tres concentraciones de biotina diferentes (0 μ M, 50 μ M y 200 μ M), empleando una hoja por concentración previamente agroinfiltrada con pMDC43/TurboID, pMDC43/TurboID_AtCRBN y pMDC43/TurboID_linker_AtCRBN, 72 horas después de la agroinfiltración. Transcurridas 6 horas desde la infiltración con biotina se recogieron las muestras, de las que se extrajo la proteína total. Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE 10%, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para analizar las muestras mediante Western blot. Primero, para la detección de proteínas biotiniladas, se incubaron las membranas con el conjugado streptavidin-HRP (dilución 1:5000), basado en la afinidad entre la estreptavidina y la biotina.

Como se observa en la **Figura 21.A.**, en los carriles en los que se infiltró la solución control sin biotina no se obtuvo señal. En las muestras infiltradas con biotina 50 μ M y 200 μ M y agroinfiltradas con construcciones con AtCRBN se obtuvieron bandas definidas, con una intensidad y patrón similares para ambas concentraciones. Sin embargo, en las muestras agroinfiltradas con el control GFP-TurboID se observó diferencia entre las muestras infiltradas con biotina 50 μ M y 200 μ M, presentando esta última concentración una mayor intensidad y una menor definición en las bandas. Las manchas blancas en los dos carriles de GFP-TurboID 50 μ M y 200 μ M se deben a la gran cantidad de proteínas biotiniladas presente en esas regiones, a la que se adhiere gran cantidad de estreptavidina y por tanto de HRP. Esta abundancia de peroxidasa consume el sustrato a tal velocidad que al exponer la imagen ya no queda, no pudiendo detectarse señal en esta región (**Figura 21.A.**). Teniendo en cuenta la saturación alcanzada con una concentración de biotina 200 μ M para GFP-TurboID, consideramos que la concentración óptima de la biotina exógena infiltrada es de 50 μ M.

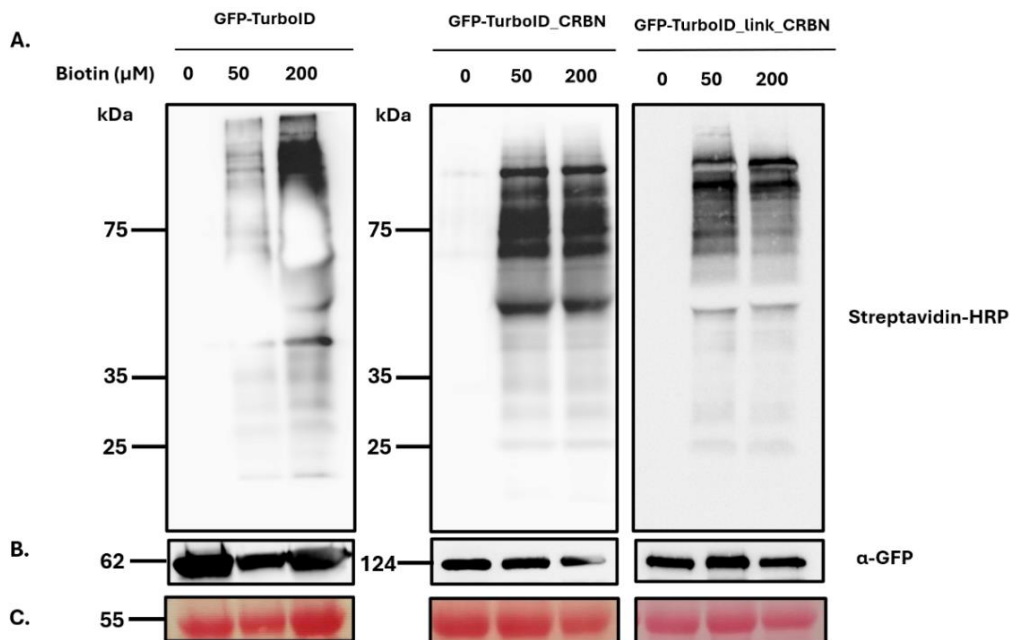


Figura 21. Optimización de la concentración de biotina exógena requerida para la biotinilación basada en TurboID en hojas de *N. benthamiana*. **A.** Correlación entre la eficiencia de biotinilación de TurboID y la concentración de biotina. El análisis Western blot se realizó a partir de muestra de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID, TurboID_AtCRBN y TurboID_linker_AtCRBN e incubadas con diferentes concentraciones de biotina durante 6 horas. Las proteínas biotiniladas se detectaron con streptavidin-HRP (1:5000). **B.** Control de carga y de expresión de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltrada con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID, TurboID_AtCRBN y TurboID_linker_AtCRBN. Western blot realizado con los anticuerpos

primario anti-GFP (1:1000) y secundario anti-rat-HRP (1:10000). **C.** Control de carga con tinción de Ponceau-S. Se observa la banda correspondiente a la RubisCO (55 kDa).

Para confirmar que las diferentes muestras presentaban una correcta expresión de las proteínas de fusión con GFP, la membrana fue sometida a un *stripping* para retirar el conjugado streptavidin-HRP y poder incubarla con el anticuerpo monoclonal primario anti-GFP (dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario anti-rat-HRP (1:10000). Como se observa en la **Figura 21.B**, las proteínas de fusión GFP-TurboID (62 kDa), GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN (124 kDa) se expresaron en todas las muestras. Tuvieron niveles de expresión similares entre muestras agroinfiltradas con la misma construcción (dentro de un mismo Western blot).

Las membranas fueron teñidas con Ponceau-S antes de la incubación con anticuerpos para confirmar que en todos los carriles se cargó la misma cantidad de proteína. En todos ellos se observan cantidades similares de la proteína RubisCO, a una altura de 55kDa (**Figura 21.C.**).

4.4. Identificación de interactores de AtCRBN mediante TurboID acoplado a proteómica

Una vez validadas las diferentes construcciones con TurboID y optimizada la concentración de biotina, se llevó a cabo la purificación de proteínas biotiniladas para la posterior identificación de las proteínas del interactoma de AtCRBN.

Agroinfiltramos hojas de *N. benthamiana* con *A. tumefaciens* transformada con las construcciones pMDC43/TurboID y pMDC43/TurboID_AtCRBN generadas y validadas en los apartados 4.1. y 4.2., y se llevó a cabo el protocolo optimizado en el apartado 4.3. Tras 72 horas desde la agroinfiltración, se infiltraron las hojas con solución de biotina 50 μ M. Transcurridas 6 horas desde la infiltración de biotina, se recogió la muestra y se extrajo la proteína total mediante un *buffer* de extracción descrito previamente. Estas muestras se enriquecieron en proteínas biotiniladas para ser identificadas mediante análisis proteómicos siguiendo diferentes pasos. En primer lugar, el exceso de biotina libre se eliminó purificando los extractos crudos con columnas PD-10. En un segundo paso, las muestras de proteínas sin biotina libre se incubaron con *beads* magnéticas de estreptavidina. Posteriormente, las *beads* de estreptavidina se sometieron a numerosos pasos de lavado usando *buffers* con diferentes fuerzas iónicas y detergentes. Por último, las proteínas biotiniladas fueron eluidas de los *beads* de estreptavidina mediante la incubación con tampón 2x Laemmli a 95°C durante 10 minutos.

A lo largo del proceso de enriquecimiento de las muestras en proteínas biotiniladas, se tomaron diferentes fracciones de muestra que fueron analizadas mediante Western blot (**Figura 22.**) para realizar un seguimiento al proceso y poder detectar pasos limitantes. En concreto, se tomaron muestras antes de eliminar la biotina libre (extracto crudo, CE), tras purificar los extractos (extracto crudo sin biotina, CEb-) y tras eluir las proteínas biotiniladas de los *beads* (IP). Se realizó una electroforesis en paralelo en dos geles SDS-PAGE 10%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La primera (**Figura 22.A.**) fue incubada con el conjugado streptavidin-HRP (dilución 1:5000), y la segunda (**Figura 22.B.**) con el anticuerpo monoclonal primario anti-GFP (dilución 1:1000) y el secundario anti-rat-HRP (dilución 1:10000). Las membranas se tiñeron con Ponceau-S para establecer el control de carga. En ambas membranas se observó una cantidad similar de RubisCO para las muestras correspondientes a los extractos crudos (CE) y a los extractos tras eliminar la biotina libre (CEb-). Como se esperaba, en los carriles correspondientes a las inmunoprecipitaciones (IP) con *beads* de estreptavidina no se observó señal por Ponceau-S. En la **Figura 22.A.** se observa que el patrón de proteínas biotiniladas y su intensidad se mantienen entre el extracto crudo y el extracto sin biotina libre de cada construcción. Esto indica que en el proceso de filtración en gel mediante la columna PD-10 no perdimos proteínas. En las muestras que expresan GFP-TurboID (CE1), la banda más intensa se corresponde con dicha proteína de fusión (62 kDa), que se auto-biotinila. En el caso de las muestras GFP-TurboID_AtCRBN (CE2), el patrón y la intensidad también se mantienen. Sin embargo, la señal de GFP-TurboID_AtCRBN (124 kDa) es mucho menos intensa que la de GFP-TurboID. Mientras que para la IP de GFP-TurboID pudimos observar claramente bandas detectando tanto biotina como GFP, la intensidad de las bandas correspondientes a las muestras GFP-TurboID_AtCRBN fue menor (CE2, CEb-2) o nula (IP2).

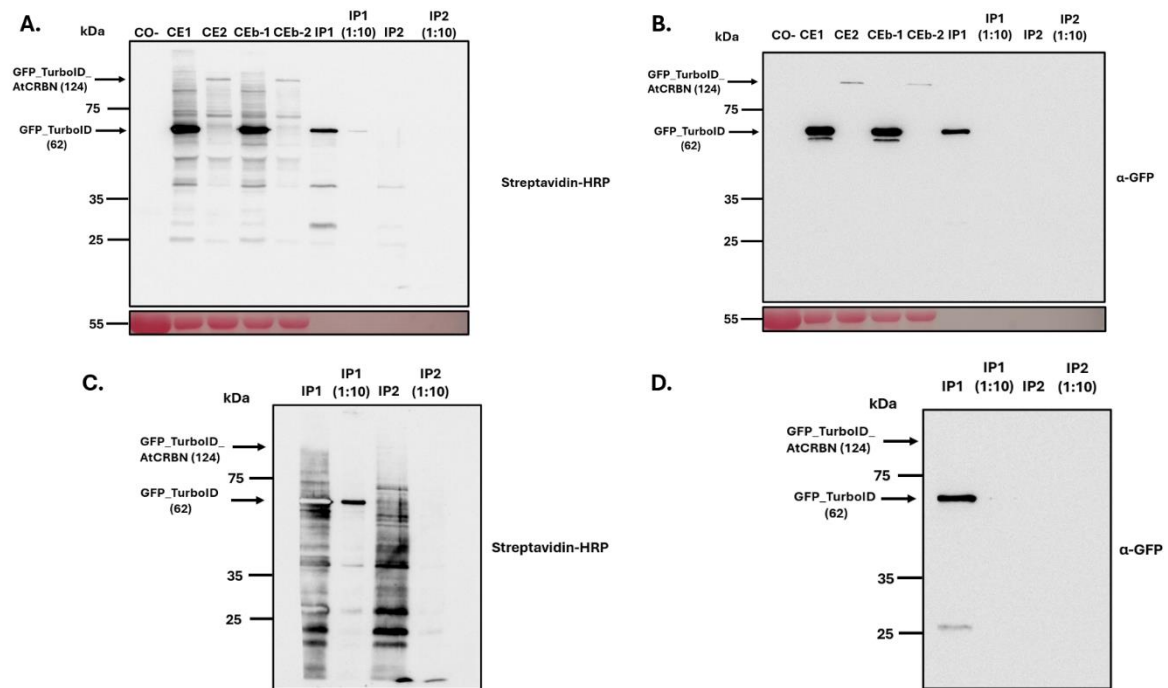


Figura 22. Seguimiento del proceso de enriquecimiento en proteínas biotiniladas. Análisis Western blot a partir de muestras de hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID y pMDC43/TurboID_AtCRBN; e incubada 6 horas con solución de biotina 50 μ M. “CO-” hace referencia al control negativo, muestra extraída de *N. benthamiana* sin agroinfiltrar y sin biotina; “CE” es extracto crudo; “CEb-” es extracto crudo sin biotina libre tras filtración; “IP” es inmunoprecipitación, el extracto enriquecido en proteínas biotiniladas tras su recuperación con *beads* de estreptavidina magnéticas; “IP (1:10)” es una dilución 1:10 del producto de la inmunoprecipitación. “1” se corresponde con las muestras GFP-TurboID y “2” con las muestras GFP-TurboID_AtCRBN. **A.** Detección mediante western blot de proteínas biotiniladas en diferentes pasos del proceso de enriquecimiento, con el conjugado streptavidin-HRP (1:5000). El panel inferior muestra la RubisCO (55 kDa) tras la tinción con Ponceau-S como control de carga. **B.** Detección de las proteínas de fusión GFP-TurboID y GFP-TurboID_AtCRBN en distintos pasos del proceso de enriquecimiento, con el anticuerpo monoclonal primario anti-GFP (1:1000) y el secundario anti-rat-HRP (1:10000). El panel inferior muestra la RubisCO (55 kDa) tras la tinción con Ponceau-S como control de carga. **C.** Detección mediante Western blot con streptavidin-HRP (1:5000) de las proteínas biotiniladas tras el enriquecimiento estas. **D.** Detección mediante Western blot con el anticuerpo monoclonal primario anti-GFP (1:1000) y el secundario anti-rat-HRP (1:10000) de las proteínas de fusión con GFP tras el enriquecimiento.

Para analizar mejor las muestras tras el enriquecimiento en proteínas biotiniladas (IPs), se sometió a las membranas a un *stripping* y se recortaron, para repetir el proceso únicamente con los últimos cuatro carriles (**Figura 22.C. y D.**). En el caso de la membrana incubada con streptavidin-HRP (**Figura 22.C.**) se incrementó la señal detectada para ambas muestras, confirmando que la IP había funcionado y en las muestras había proteínas biotiniladas. La banda correspondiente a GFP-TurboID_AtCRBN no se detectó, a diferencia de la correspondiente a GFP-TurboID. La ausencia de GFP-TurboID_AtCRBN se observó también cuando usamos el anticuerpo anti-GFP (**Figura 22.D.**), pudiendo detectar GFP-TurboID, pero ninguna banda en el caso de la IP2 correspondiente a GFP-TurboID_AtCRBN. La banda observada a 27 kDa se corresponde con GFP, producto del procesamiento de GFP-TurboID. La menor expresión de GFP-TurboID_AtCRBN con respecto a GFP-TurboID ya había sido constatada previamente con un experimento independiente (**Figura 20**), pero no fue tan acentuada.

A pesar de no haber detectado por Western blot GFP-TurboID_AtCRBN tras la IP, los proteomas enriquecidos en proteínas biotiniladas se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis realizado fue Dependiente de los Datos (*Data Dependent Analysis*, DDA). Este tipo de análisis permite la identificación inequívoca de las proteínas más abundantes de cada muestra, aportando consistencia a los resultados. Se analizó una muestra de GFP-TurboID, como control, y una muestra de GFP-TurboID_AtCRBN, nuestra muestra problema. Para cada una de las muestras se obtuvo una lista de proteínas identificadas usando la base

de datos Uniprot (**Anexo III, Tablas 1 y 2**). De estas listas se eliminaron aquellas proteínas de *H. sapiens* y otros mamíferos propias de la manipulación y no del proceso de marcaje de proximidad en la célula de *N. benthamiana*.

Comparamos las proteínas identificadas en ambas muestras mediante un diagrama de Venn (**Figura 23.A**). Encontramos que 15 proteínas se hallaban en ambas muestras (**Figura 23.C**). De ellas destaca la proteína GFP, que fue la proteína detectada con mayor intensidad tanto en GFP-TurboID como en GFP-TurboID_AtCRBN. Esto se debe a que TurboID, en su función de marcar a las proteínas de su entorno, tiene gran facilidad para biotinar a GFP, ya que están en permanente contacto en las proteínas de fusión expresadas. Las proteínas identificadas en esta lista presentan diversidad de función y localización subcelular. Además, algunas de ellas como la Ribulosa bis-fosfato, la Glucosa 6-fosfato 1-deshidrogenasa o la subunidad Q del fotosistema 1 son proteínas extremadamente abundantes en la célula vegetal. La enzima conjugadora de ubiquitina (*E2* ligasa) *Solanum lycopersicum* Uev (Suv) resultó llamativa, ya que podría ser también una candidata de interactuar con AtCRBN según la literatura. Sin embargo, está presente en ambas muestras y la intensidad en cada una de ellas no sugiere diferencias que nos permitan considerarla como interactora específica de AtCRBN. En cualquier caso, resulta imprescindible destacar que solo se analizó una réplica para el control y otra para el problema, sin posibilidad de realizar cálculos estadísticos ni correcciones de errores técnicos o metodológicos.

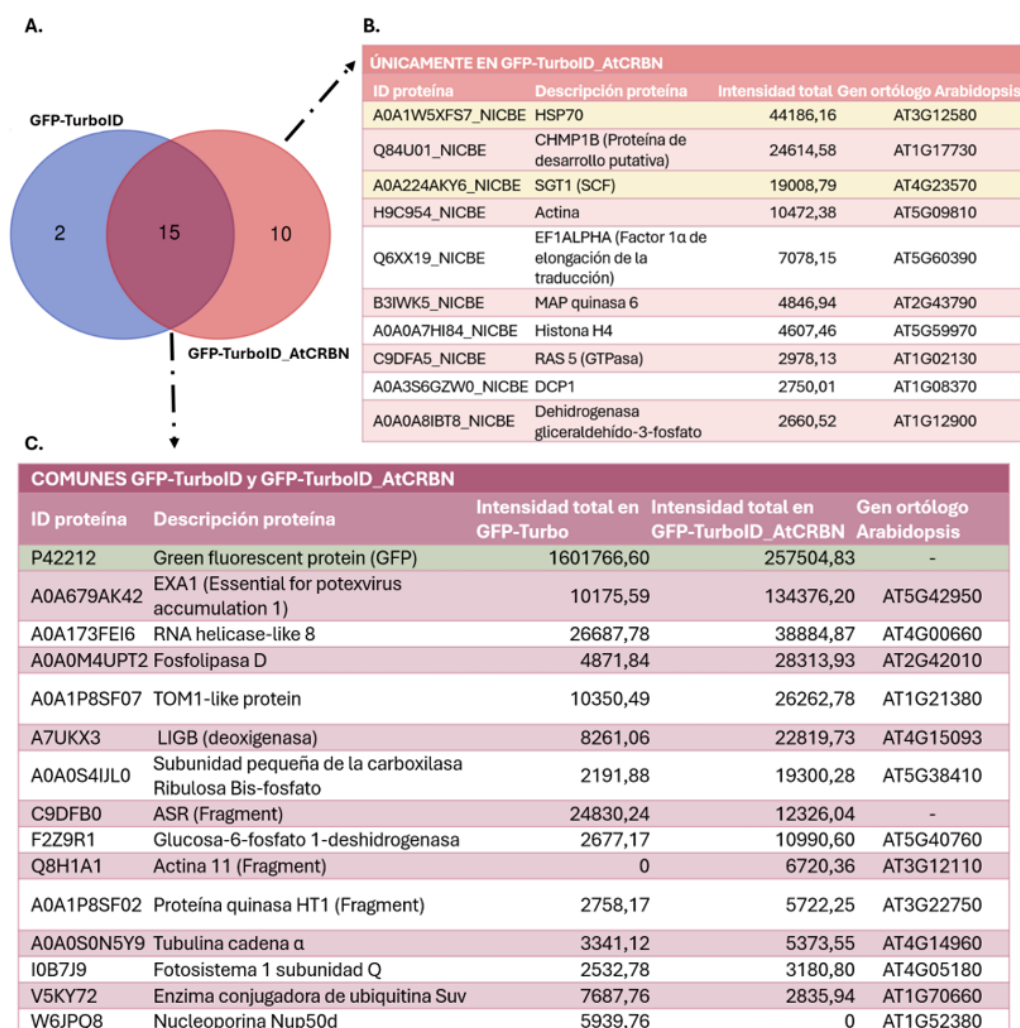


Figura 23. Identificación de candidatos interactores de AtCRBN mediante marcaje de proximidad acoplado a proteómica cuantitativa. **A.** Diagrama de Venn que muestra el solape entre las proteínas identificadas en ambas muestras GFP-TurboID (izq.) y GFP-TurboID_AtCRBN (dcha.). **B.** Listado y características de las 10 proteínas identificadas como interactoras de GFP_TurboID_AtCRBN y no de GFP_TurboID. Se muestran ordenadas de mayor a menor según la intensidad total. **C.** Listado y características de las 15 proteínas identificadas en GFP-TurboID y GFP_TurboID_AtCRBN. Se muestran ordenadas según la intensidad total en GFP-TurboID_AtCRBN.

Como esperábamos, además de las proteínas detectadas en ambas muestras, identificamos 10 proteínas que se habían detectado solo en la muestra de GFP-TurboID_AtCRBN. Son estas las principales candidatas a estar interaccionando con AtCRBN *in vivo* (**Figura 23.B.**). Entre las proteínas identificadas encontramos HSP70, CHMP1B, SGT1 y Actina como las más abundantes, así como EF1a, MAPK6, Histona H4, RAS5, DCP1 y GAPDH como proteínas más minoritarias. Una característica común entre ellas es su localización subcelular, ya que la mayoría desempeñan su función en el núcleo celular. Entre estas, destaca SGT1 (*suppressor of G2 allele of SKP1*) (marcada en amarillo en la **Figura 23.B.**), que presenta la tercera mayor intensidad total. SGT1 es un interactor del complejo ubiquitín ligasa SCF(TIR1), de acuerdo con el presunto papel de AtCRBN en este tipo de complejos. Además, en nuestros experimentos también identificamos la proteína chaperona HSP70 (marcada en amarillo en la **Figura 23.B.**) que ha sido descrita como parte del complejo formado por SGT1 en plantas. Estas dos proteínas son muy buenas candidatas a ser interactores reales de AtCRBN.

5. DISCUSIÓN

Actualmente, una de las prioridades más urgentes en la agricultura es la materialización de la denominada Revolución Azul, que persigue el diseño de soluciones innovadoras que garanticen la seguridad alimentaria en un contexto de crecimiento poblacional y cambio climático. Una de estas soluciones podría estar basada en la tecnología PROTAC, que permitiría la degradación dirigida de proteínas diana en la célula vegetal (Winter *et al.*, 2015). Los PROTACs ya han alcanzado un papel muy relevante en el ámbito de la salud humana, pero no han sido todavía desarrolladas en el sector de la agricultura (Su *et al.*, 2024). Esto puede deberse, en parte, a que la diana principal de estas moléculas PROTACs, que es la E3 ligasa CRBN, todavía no ha sido estudiada en plantas. Para la implementación de los PROTACs en la agricultura es imprescindible que CRBN conserve su función en plantas, puesto que la talidomida es un ligando específico de CRBN, y es esta interacción la que otorga funcionalidad a los PROTACs (Ito *et al.*, 2010). Tras identificar recientemente el homólogo de CRBN en *A. thaliana* y otras especies de interés agronómico, y confirmar su expresión y localización subcelular en *N. benthamiana* (Donderis-Fagoaga, 2023), consideramos que el siguiente paso era averiguar si el complejo E3 ligasa de humanos del que forma parte CRBN, CRL4^{CRBN}, se encuentra conservado en plantas. Para ello, los homólogos de sus componentes RBX1, DDB1 y CUL4 en plantas (Fonseca & Rubio, 2019) deberían interactuar con AtCRBN formando un complejo AtCRL4^{CRBN}.

Para identificar los interactores de AtCRBN y su posible participación en complejos E3 ligasa, empleamos la técnica de marcaje de proximidad basada en biotina acoplada a proteómica. Esta aproximación permite etiquetar *in vivo* con biotina a las proteínas que interactúan con la proteína de interés y, tras enriquecer la muestra en proteínas biotiniladas, identificarlas mediante LC-MS/MS (Roux *et al.*, 2012). Escogimos esta técnica por diversas razones. En primer lugar, porque nos permite identificar el conjunto de proteínas que interactúan con CRBN tanto directa como indirectamente a nivel de proteoma. Las técnicas que requieren una proteína “cebo” y otra “presa” como Y2H, BiFC o FRET quedaron descartadas de momento (Xing *et al.*, 2016), puesto que aportan información sobre interacciones 1 a 1 y no a nivel de proteoma. Otra técnica muy empleada en el estudio de PPIs es la purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas (AP-MS). Esta aprovecha uniones específicas (como las establecidas por los anticuerpos) con la proteína diana para purificar proteínas interactoras, que se analizan mediante espectrometría de masas. Por tanto, supera la limitación anterior ya que permite identificar interactores desconocidos. A pesar de que es adecuada para la identificación de interacciones estables, presenta limitaciones como la sensibilidad, la pérdida de información temporal y espacial, y los costosos procesos de preparación de la muestra (Kerbler *et al.*, 2021). Además, AP-MS también presenta limitaciones para identificar interactores indirectos pertenecientes a complejos proteicos. Frente a ello, el PL ofrece diversas ventajas como su efectividad identificando proteínas que interactúan transitoria o débilmente (aportando información espacial y temporal); la posibilidad de desnaturalizar las proteínas durante el proceso de extracción sin impactar negativamente en el experimento; o la capacidad de identificar proteínas que no se unen directamente a la proteína diana, pero sí forman parte de su mismo complejo (Chien *et al.*, 2024).

Una vez seleccionado el marcaje de proximidad, empleamos el basado en biotina (BioID) en vez de los basados en peroxidasas (HRP y APEX) o en PafA porque se adecúa más a nuestras condiciones experimentales. Una de las diferencias fundamentales entre estas técnicas son los sustratos que usa cada una. En el caso de HRP y APEX, su sustrato es el biotin-fenol, que puede presentar problemas para atravesar las membranas (Li *et al.*, 2014). Esto podría distorsionar nuestros resultados, ya que CRBN se encuentra en el citoplasma y en el núcleo (Wada *et al.*, 2016), al que el sustrato no podría acceder correctamente. Además, el H₂O₂ usado por HRP y APEX resulta tóxico para la célula (Branon *et al.*, 2018). En cuanto al péptido PUP (sustrato de PafA) es mucho más grande que la biotina y el biotin-fenol, por lo que podría interferir con la función proteica (Bosch *et al.*, 2021). Otro parámetro a considerar es la cinética de las reacciones de marcaje, en la que las peroxidasas destacan por su velocidad (1-10 minutos) con respecto a BioID (15-24h) y PafA (24h). Sin embargo, dentro del sistema BioID, la biotina ligasa TurboID, requiere tiempos mucho menores (10 minutos) que el resto de biotina ligasas (Branon *et al.*, 2018). Por último, la temperatura óptima de trabajo de los enzimas empleados

también es relevante. Mientras que la actividad de BioID se reduce considerablemente a temperaturas menores de 37 °C, APEX ha demostrado ser activa tanto a 25 °C como a 37 °C. No obstante, una vez más TurboID supone una excepción en el sistema BioID, y su actividad catalítica se mantiene intacta entre los 22 y los 30 °C (Mair *et al.*, 2019). Por tanto, se seleccionó el marcaje de proximidad basado en biotina, empleando como biotina ligasa TurboID. Esta, además de presentar la cinética más rápida de todas las biotina ligasas y ser activa en un amplio rango de temperatura (Branon *et al.*, 2018), ha demostrado funcionar mejor que BioID y BioID2 en plantas, o al menos en *N. benthamiana* (Zhang *et al.*, 2019); y es una de las más usadas en la biología de plantas. Además, debido a todas las características comentadas anteriormente, el PL basado en biotina con TurboID se postula como una de las mejores opciones para aquellos estudios iniciales en la elucidación de complejos proteicos, ya que permite generar en poco tiempo un gran número de biotilaciones específicas (Arora *et al.*, 2020).

Para llevar a cabo el experimento de marcaje de proximidad, clonamos *TurboID*, *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™) mediante el sistema Gateway. Para ello se amplificó *TurboID* por PCR y también se llevó a cabo una PCR de solape para la generación de las construcciones *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN*. Decidimos incluir una versión con *linker* para evitar el posible impedimento estérico que podría causar la fusión de TurboID sobre la interacción de CRBN con otras proteínas, aunque no pudo ser usada en los experimentos de proteómica. Tras la amplificación de *TurboID* para la PCR de solape, los resultados de la electroforesis en gel de agarosa (**Figura 9.A.**) mostraron, además de las bandas esperadas, otras de menor intensidad con un tamaño próximo a las 150 pb. Estas bandas podrían corresponderse con horquillas generadas por los cebadores, pero en ese caso debería observarse banda también en el control, lo cual no sucede (Singh *et al.*, 2000). Esto sugiere que podrían deberse a la amplificación inespecífica de una región del gen *TurboID* menor que el gen completo. Como el DNA que se empleó para continuar con el siguiente paso de la PCR de solape fue purificado a partir de la banda correcta de 900 pb, esta amplificación inespecífica no supuso ningún problema. Una vez clonados los insertos en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™) (**Anexo II, Figura 1**), se llevó a cabo la reacción LR para el clonaje en el plásmido de destino pMDC43 (**Anexo II, Figura 5**). Este vector pertenece a la serie de vectores binarios de T-DNA pMDC, muy adecuados para la expresión en planta, y con los genes de resistencia a los antibióticos Kanamicina (para bacterias) e Higromicina (para plantas) (Curtis & Grossniklaus, 2003). Concretamente pMDC43 contiene la secuencia que codifica para GFP antes del extremo 5' del inserto, por lo que nos permite la expresión de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN, que pueden detectarse tanto mediante Western blot como mediante microscopía confocal. Decidimos que en la proteína de fusión la etiqueta GFP se expresara en N-terminal seguida de TurboID y AtCRBN en el extremo C-terminal por antecedentes en la literatura (Li *et al.*, 2023). Sin embargo, el sistema es flexible y no hay un orden predeterminado de los fragmentos, siempre y cuando la etiqueta y la biotina ligasa no interfieran estéricamente con el establecimiento de las interacciones entre proteínas (Xu *et al.*, 2023). Por último, pMDC43 permite la expresión de las proteínas de fusión bajo el promotor fuerte 35S. A pesar de que sería más recomendable emplear el promotor propio de AtCRBN, para restringir su expresión a las condiciones fisiológicas *in vivo* (Mair *et al.*, 2019), el experimento se planteó como una puesta a punto, para lo cual es más apropiado el empleo de este tipo de promotores fuertes.

Para confirmar la expresión transitoria de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN y analizar su localización subcelular mediante microscopía confocal, transformamos mediante agroinfiltración hojas de *N. benthamiana*. La localización subcelular de GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN resultó ser núcleo-citoplasmática como esperábamos, ya que la proteína homóloga a AtCRBN en *H. sapiens* contiene la secuencia de localización nuclear QKR, y se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Wada *et al.*, 2016). Además, tanto las predicciones de localización subcelular como la observación mediante microscopía confocal láser de GFP-AtCRBN expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* mostraron que AtCRBN tiene localización núcleo-citoplasmática (Donderis-Fagoaga, 2023). GFP-TurboID mostró la misma localización subcelular que las fusiones con AtCRBN, un requisito indispensable para un buen control

negativo, ya que si la localización subcelular entre muestra y control es diferente, los resultados de proteómica no pueden ser comparables (Xu *et al.*, 2023).

Además de la localización subcelular, las imágenes de microscopía confocal de la **Figura 20.** muestran una mayor señal del control GFP-TurboID que de las proteínas de fusión de GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN, indicando que GFP-TurboID se expresa en mayor cantidad. Esta menor expresión de las proteínas de fusión con AtCRBN también se constató mediante Western blot (**Figura 20.E.**) (Gong *et al.*, 2021). Realizamos una extracción de proteína de las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, y llevamos a cabo un Western blot para detectar la etiqueta GFP, con el fin de confirmar que la señal observada en el microscopio se correspondía con las proteínas de fusión completas. Los tamaños correspondientes a las bandas obtenidas confirmaron que la señal fluorescente observada se correspondía con GFP-TurboID (62kDa), GFP-TurboID_AtCRBN (124kDa) y GFP-TurboID_linker_AtCRBN (124kDa). Además, a pesar de que se evaluó cada construcción por separado, y que por tanto los resultados no son cuantitativamente comparables, el control de carga realizado mediante tinción de Ponceau-S muestra que se cargó la misma cantidad de proteína en cada muestra. Esto nos permite establecer cierta comparación cualitativa, constatando que la señal de la banda correspondiente a GFP-TurboID resultó más intensa que la de las construcciones con AtCRBN, lo que indica que GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN se expresan y se acumulan menos que GFP-TurboID. Esta diferenciación en la expresión puede deberse al menor tamaño de GFP-TurboID, que facilita su expresión y difusión. Además, la acumulación de GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN puede ser menor a la de GFP-TurboID por una mayor tasa de degradación de las primeras. Si, como es de esperar, AtCRBN conserva la función de E3 ligasa que tiene CRBN de *H. sapiens*, es probable que las proteínas de fusión que la contienen se estén degradando más, ya que las E3 ligasas son capaces de auto-ubiquitinarsse para su propia degradación mediante el UPS (De Bie & Ciechanover, 2011).

Tras la comprobación de la expresión de nuestras proteínas de fusión, optimizamos la concentración de biotina exógena requerida para el marcaje de proximidad. Para ello infiltramos con un gradiente de biotina las hojas de *N. benthamiana* previamente agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformada con pMDC43/TurboID, TurboID_AtCRBN y TurboID_linker_AtCRBN. El patrón de biotilación en las muestras TurboID_AtCRBN y TurboID_linker_AtCRBN no varió entre biotina 50 μ M y 200 μ M (no se observaron nuevas bandas a mayor concentración), lo que indica que una adición de biotina a una concentración de 50 μ M es suficiente para la biotilación de las proteínas interactoras (**Figura 21.**). En el control GFP-TurboID sí que se observaron diferencias entre concentraciones, ya que las muestras infiltradas con biotina 200 μ M mostraron mayor intensidad de señal y una menor definición en las bandas. Por tanto, debido que 50 μ M resultó suficiente en las muestras problema y que se observó saturación en el control con una concentración de biotina 200 μ M, se escogió como concentración óptima de biotina 50 μ M, lo que concuerda con estudios previos (Chien *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023). Además de la concentración de biotina, otros parámetros optimizables son el tiempo de incubación y la temperatura, así como el tiempo desde la agroinfiltración hasta la infiltración de biotina (Xu *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta que TurboID no presenta diferencias en su eficiencia en el rango de 22 °C a 30 °C (Mair *et al.*, 2019), la temperatura de incubación tras la infiltración de biotina se fijó en 23 °C por ser la óptima para *N. benthamiana*. El tiempo de incubación se fijó en 6 horas tras la infiltración de biotina en base a la bibliografía disponible (Zhang *et al.*, 2019). Por último, se seleccionó 72 horas como tiempo transcurrido desde la agroinfiltración hasta la infiltración con biotina porque, generalmente, es en este momento en el que la expresión transitoria de proteínas recombinantes alcanza su máximo nivel (Wydro *et al.*, 2006).

Una vez comprobada la expresión de GFP-TurboID y GFP-TurboID_AtCRBN, y optimizada la concentración de biotina exógena, se expresaron las proteínas de fusión transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, que se infiltraron con biotina 50 μ M biotina y de las que se extrajo proteína total tras 6 horas de incubación. A partir de estos extractos, se llevó a cabo la purificación de proteínas biotiladas para su identificación con LC-MS/MS. En el proceso, se tomaron fracciones de muestra antes de eliminar la biotina libre (extracto crudo, CE), tras purificar los extractos (extracto crudo sin biotina CEb-) y tras eluir las proteínas biotiladas de los *beads* (IP). Estas fueron analizadas mediante

Western blot (**Figura 22.**), que confirmó que durante la filtración para la eliminación de biotina no se había perdido a penas proteína, ya que en la **Figura 22.A.** la intensidad de las bandas entre las muestras CE1 y CEb-1, así como entre CE2 y CEb-2, es muy similar, y el patrón de bandas se mantiene. En cuanto a la señal en los carriles de las IPs, esta disminuye considerablemente y no se observa el mismo patrón que en los respectivos carriles CE y CEb-. Esto es así porque, tras el enriquecimiento en proteínas biotiniladas mediante *beads* magnéticos de estreptavidina, la cantidad de proteína disminuye considerablemente, ya que se purifican únicamente aquellas biotiniladas. Así lo demuestra la tinción con Ponceau-S, en la que no hay señal en los carriles correspondientes a las IPs. Esto se debe a que la sensibilidad de esta tinción es insuficiente para detectar la reducida cantidad de proteína presente en la muestra (Bannur *et al.*, 1999). A pesar de ello, se observa señal correspondiente a las proteínas biotiniladas (**Figura 22.A. y C.**), lo que indica que el enriquecimiento funcionó correctamente, puesto que, a una concentración muy baja de proteínas, sigue habiendo una señal notable en el Western blot de proteínas biotiniladas.

Para mejorar los resultados del Western blot, recortamos la membrana antes del *stripping* y la incubación con streptavidin-HRP. Al incubar solo esos cuatro carriles, todo el conjugado streptavidin-HRP está disponible para las proteínas biotiniladas recuperadas en las IPs, lo que nos permitió comprobar que la muestra estaba enriquecida en proteínas biotiniladas como se esperaba. Este mismo análisis Western blot se llevó a cabo por duplicado para la detección también de GFP. La acumulación de GFP-TurboID_AtCRBN fue mucho menor que la de GFP-TurboID. Además, en este caso, en el que la señal sí es comparable al tratarse de la misma membrana, la diferencia de expresión fue mucho más acentuada (**Figura 22.D.**) que la observada previamente (**Figura 20.E.**). Esta diferencia se debe a que las muestras analizadas en la **Figura 20.E.**, que presentan más señal, se extrajeron directamente con Laemmli 2x compuesto por 125 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% glicerol, 4% SDS, 0.004% azul de bromofenol, 10% β -mercaptoetanol, mientras que las de estos últimos Western blots (**Figura 22**) se obtuvieron con un tampón de extracción (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glicerol, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1% cóctel de inhibidores de proteasas, 1 mM PMSF, 1% NP40). La concentración y el tipo de detergente afectan notablemente a la extracción de proteínas, por lo que esta diferencia sugiere que la composición del tampón de extracción usado para el Western blot de la **Figura 22** no es del todo adecuada para la extracción de AtCRBN. Deberían analizarse otros tipos de tampón que permitan un mayor rendimiento en la extracción de la proteína GFP-TurboID_AtCRBN y además el posterior proceso de enriquecimiento en proteínas biotiniladas (Sarihan *et al.*, 2024). Por tanto, a la menor expresión de GFP-TurboID_AtCRBN con respecto a GFP-TurboID, se ha de sumar el peor rendimiento en la extracción al cambiar de tampón para el enriquecimiento en proteínas biotiniladas, lo que dio lugar a una señal nula en la detección de GFP en la IP2, correspondiente a la muestra GFP-TurboID_AtCRBN (**Figuras 22.B. y D.**). No obstante, los resultados de proteómica confirmaron la expresión de GFP tanto en la muestra GFP-TurboID como en GFP-TurboID_AtCRBN (**Figura 23.C.**), siendo además la proteína detectada con mayor intensidad en ambas muestras. Esto se debe a que TurboID es capaz de autobiotinilarse (**Figura 22.A. y C.**) (Kido *et al.*, 2020), por lo que la proteína más biotinilada y por tanto más enriquecida en las muestras es la propia proteína de fusión. Esto indica que el análisis de proteómica es más sensible que el de Western blot, y que el enriquecimiento en proteínas biotiniladas, así como el experimento de marcaje de proximidad, han sido exitosos.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante proteómica, cabe mencionar que estos no son concluyentes, puesto que no es posible realizar cálculos estadísticos a partir de una sola réplica. Generalmente se emplean 3 o 4 réplicas para que los resultados puedan ser considerados consistentes (Chien *et al.*, 2024; Kim *et al.*, 2023). En este proyecto se analizó sólo una réplica de cada muestra debido a que es una primera aproximación para comprobar cómo funciona la técnica y optimizar todos los pasos antes de realizar el análisis con un número aceptable de réplicas.

Respecto a la identificación de proteínas biotiniladas, los interactores específicos de AtCRBN aparecerán identificados en las muestras GFP-TurboID_AtCRBN y no en el control GFP-TurboID. En primer lugar, porque su ausencia no puede deberse a unas condiciones de extracción y enriquecimiento poco apropiadas, ni a una dificultad en su identificación mediante LC-MS/MS, puesto que sí están siendo identificadas en la muestra problema. Además, con el tipo de análisis proteómico seleccionado *Data Dependent Analysis* (DDA), tras la ionización, los péptidos intactos son escaneados y cuantificados durante MS1 y sólo los más abundantes (aquellos 100 que muestran mayor intensidad) se seleccionan para su fragmentación durante MS2 (Liu *et al.*, 2004). Por tanto, el método se centra en la identificación de las proteínas más abundantes de la muestra. De este modo, aquellas proteínas identificadas únicamente en la muestra GFP-TurboID_AtCRBN (**Figura 23.B.**) tienen elevadas posibilidades de interactuar con AtCRBN.

Entre las 10 proteínas identificadas únicamente en la muestra problema GFP-TurboID_AtCRBN (**Figura 23.B.**), resulta imprescindible destacar Hsp70 y SGT1A. SGT1 (*suppressor of G2 allele of Skp1*) se describió por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) donde es necesaria en las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular, para la formación del complejo del cinetocoro CBF3 en dicha especie. Además, SGT1 interactúa con los complejos E3 ligasa de tipo SCF (Skp1-Cul1-F-box) mediante su interacción con Skp1 (Kitagawa *et al.*, 1999). SGT1 se encuentra altamente conservada en diferentes especies como *H. sapiens*, *Oryza sativa* y *A. thaliana* entre otras. Concretamente, en *A. thaliana* hay dos proteínas homólogas, AtSGT1a y AtSGT1b, fruto de una duplicación genética reciente. Ambas son capaces de complementar a los mutantes de *S. cerevisiae* *sgt1*, lo que indica que son funcionalmente redundantes (Azevedo *et al.*, 2002). Además, AtSGT1b está relacionada con la resistencia mediada por genes R, y con la degradación por el UPS de las proteínas *Auxin/Indole-3-Acetic Acid* (Aux/IAA), que son reguladores negativos de la transcripción de genes inducidos por auxinas. AtSGT1b interactúa mediante Skp1 con la E3 ligasa SCF^{TIR1}, que es el receptor de auxinas y, cuando une esta hormona, ubiquitina las proteínas Aux/IAA para que sean degradadas (Gray *et al.*, 2003). AtSGT1a se ha relacionado con la regulación de la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta al estrés por calor. Ambos AtSGT1a y AtSGT1b presentan un dominio altamente conservado en eucariotas en C-terminal denominado SGS (*Sgt1-specific*), que es imprescindible para el establecimiento de interacciones con las chaperonas Hsp90 y Hsp70 (Spiechowicz *et al.*, 2007). Curiosamente, Hsp70 fue la proteína detectada con mayor intensidad en los resultados GFP-TurboID_AtCRBN (**Figura 23.B.**), y SGT1 la tercera. La interacción entre SGT1 y Hsp70 o Hsp90 vincula una vez más a STG1 con la vía de degradación proteica del UPS, ya que esta asociación probablemente constituye un mecanismo de control para permitir la rápida degradación de proteínas con un plegamiento incorrecto. Por tanto, SGT1 y Hsp70 se relacionan con las E3 ligasas de tipo SCF, estando implicadas así en el control del UPS (Shirasu, 2009). Todo ello convierte a Hsp70 y SGT1A en excelentes candidatos a formar parte del interactoma de AtCRBN. La interacción de AtCRBN con SGT1A y Hsp70, ambos relacionados con el complejo SCF^{TIR1}, apoya la función AtCRBN como E3 ligasa. Además, indica también que AtCRBN pueda estar formando parte de complejos SCF y no en complejos CRL4 basados en Cullina4 como hipotetizábamos antes de comenzar este trabajo. En caso de confirmar que AtCRBN efectivamente forma parte de un complejo E3 ligasa, las demás proteínas identificadas en la lista podrían ser proteínas que son ubiquitinadas por la E3 ligasa AtCRBN. Algunas de estas proteínas identificadas son la actina, GAPDH, RAS5 o la histona H4, de las que se ha demostrado previamente su relación con los mecanismos de ubiquitinación mediante E3 ligasas (Jura *et al.*, 2006; Sirover, 2011; Taylor *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2006), lo que concordaría con este planteamiento. Por último, a pesar de que las proteínas de la **Figura 23.C.** son, en principio, aquellas que se etiquetan con biotina de manera inespecífica y que por tanto pueden ser descartadas, destaca la presencia de la E2 ligasa Suv. Teniendo en cuenta que esperamos que AtCRBN conserve su función de E3 ligasa, y que los resultados preliminares de este estudio que identifican a SGT1A y Hsp70 como interactores así lo demostrarían, resulta lógico pensar que efectivamente una enzima conjugadora de ubiquitina E2 pudiera también interactuar con AtCRBN. Su presencia en ambas listas de proteínas biotiniladas podría explicarse como un falso negativo, a consecuencia del mayor nivel de expresión del control GFP-TurboID con respecto a GFP-TurboID_AtCRBN (Yang *et al.*, 2021).

5.1. Líneas futuras

Tras los resultados obtenidos en este trabajo, se seguirán dos vías. En primer lugar, los resultados obtenidos mediante marcaje de proximidad deben ser siempre validados con otras técnicas *in vivo* como Y2H, BiFC o FRET. Por tanto, a partir de los resultados que postulan a las proteínas SGT1A y Hsp70 como candidatos a interactuar con AtCRBN, se plantearán experimentos que permitan confirmar su interacción con nuestra proteína de interés. Por otra parte, optimizaremos los experimentos de TurboID. En cuanto a las construcciones, tenemos que analizar el impacto del *linker* entre TurboID y AtCRBN en la identificación de interactores. Podrían analizarse otras combinaciones reorganizando la disposición de los elementos de fusión (GFP, TurboID y AtCRBN), para comprobar si existen variaciones en la expresión de las proteínas de fusión y si alguna combinación supone el impedimento estérico para la unión con los interactores de AtCRBN. También sería recomendable tratar de igualar los niveles de expresión y acumulación del control y la muestra problema, para lo cual podría emplearse otro plásmido de expresión, cambiando el promotor fuerte 35S por el propio promotor de la proteína de interés o reduciendo el inóculo de *A. tumefaciens* en la agroinfiltración. Por último, con nuestros resultados hemos constatado la necesidad de optimizar el tampón de extracción usado para los experimentos de enriquecimiento. La optimización de un tampón de extracción que permita extraer AtCRBN adecuadamente y continuar con el proceso de enriquecimiento en proteínas biotiniladas será un paso imprescindible para continuar con el proyecto.

Además de la transformación mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, también llevamos a cabo la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* con pMDC43/TurboID, TurboID_AtCRBN y TurboID_linker_AtCRBN como con estas construcciones en pAlligator2. Estas se encuentran en la T2. Una vez obtenidas plantas homocigotas a partir de esta transformación, usaremos estas líneas para la identificación de los interactores de AtCRBN mediante marcaje de proximidad. Además, previamente se habían generado líneas transgénicas que sobreexpresan GFP-AtCRBN, a partir de las cuales se podrán realizar experimentos de purificación por afinidad acoplados a espectrometría de masas (AP-MS). El marcaje de proximidad es una alternativa a AP-MS. Sin embargo, la combinación de ambas técnicas puede resultar mucho más provechosa, ya que AP-MS es una técnica muy adecuada para la identificación de interacciones estables, mientras que el marcaje de proximidad aporta información sobre aquellas proteínas que se encuentran cerca de la proteína de interés, interactuando débil o transitoriamente y formando parte de complejos (Kerbler *et al.*, 2021). En definitiva, las conclusiones obtenidas en este proyecto servirán de punto de partida para seguir adecuando el sistema de marcaje de proximidad a nuestras condiciones experimentales y descubrir más información acerca de los complejos que forma CRBN en las plantas, descifrando su función en cultivos de interés agronómico y por tanto la aplicabilidad de la tecnología PROTAC en la agricultura.

6. CONCLUSIONES

1. Se han clonado los genes *TurboID*, *AtCRBN* y sus fusiones *TurboID_AtCRBN* y *TurboID_linker_AtCRBN* en los vectores de destino pMDC43 y pAlligator2.
2. Las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN se expresan en hojas de *N. benthamiana* de manera transitoria, y los niveles de expresión de GFP-TurboID son mayores que los de las fusiones con AtCRBN.
3. La localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-TurboID, GFP-TurboID_AtCRBN y GFP-TurboID_linker_AtCRBN *in vivo* es núcleo-citoplasmática, al igual que la de la proteína AtCRBN y la de su ortólogo HsCRBN, indicando que la presencia de la biotina ligasa TurboID no altera su localización subcelular.
4. Para el marcaje de proximidad mediante la expresión transitoria de GFP-TurboID_AtCRBN en *N. benthamiana*, la concentración óptima de biotina exógena es de 50 μ M.
5. Se han identificado mediante marcaje de proximidad basado en biotina acoplado a proteómica cuantitativa las proteínas SGT1 y Hsp70 como buenas candidatas a ser interactores reales de AtCRBN *in vivo*, sugiriendo que AtCRBN forma parte de complejos SCF y no de complejos CRL4 en *N. benthamiana*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDRATOS, N., & BRUINSMA, J. (2012). World Agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision. FAO. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.288998>
- ARORA, D., ABEL, N. B., LIU, C., VAN DAMME, P., YPERMAN, K., EECKHOUT, D., VU, L. D., WANG, J., TORNKVIST, A., IMPENS, F., KORBEI, B., VAN LEENE, J., GOOSSENS, A., DE JAEGER, G., OTT, T., MOSCHOU, P. N., & VAN DAMME, D. (2020). Establishment of Proximity-Dependent Biotinylation Approaches in Different Plant Model Systems. *The Plant Cell*, *32*(11), 3388-3407. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00235>
- AZEVEDO, C., SADANANDOM, A., KITAGAWA, K., FREIALDENHOVEN, A., SHIRASU, K., & SCHULZE-LEFERT, P. (2002). The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of *R* Gene-Triggered Disease Resistance. *Science*, *295*(5562), 2073-2076. <https://doi.org/10.1126/science.1067554>
- BANNUR, S. V., KULGOD, S. V., METKAR, S. S., MAHAJAN, S. K., & SAINIS, J. K. (1999). Protein Determination by Ponceau S Using Digital Color Image Analysis of Protein Spots on Nitrocellulose Membranes. *Analytical Biochemistry*, *267*(2), 382-389. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3020>
- BASSI, Z. I., FILLMORE, M. C., MIAH, A. H., CHAPMAN, T. D., MALLER, C., ROBERTS, E. J., DAVIS, L. C., LEWIS, D. E., GALWEY, N. W., WADDINGTON, K. E., PARRAVICINI, V., MACMILLAN-JONES, A. L., GONGORA, C., HUMPHREYS, P. G., CHURCHER, I., PRINJHA, R. K., & TOUGH, D. F. (2018). Modulating PCAF/GCN5 Immune Cell Function through a PROTAC Approach. *ACS Chemical Biology*, *13*(10), 2862-2867. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00705>
- BÉKÉS, M., LANGLEY, D. R., & CREWS, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: The past is prologue. *Nature Reviews Drug Discovery*, *21*(3), 181-200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
- BERGGÅRD, T., LINSE, S., & JAMES, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *PROTEOMICS*, *7*(16), 2833-2842. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700131>

- BOSCH, J. A., CHEN, C., & PERRIMON, N. (2021). Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: An update. *WIREs Developmental Biology*, 10(1), e392. <https://doi.org/10.1002/wdev.392>
- BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRANON, T. C., BOSCH, J. A., SANCHEZ, A. D., UDESHI, N. D., SVINKINA, T., CARR, S. A., FELDMAN, J. L., PERRIMON, N., & TING, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9), 880-887. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>
- BRICELJ, A., STEINEBACH, C., KUČHTA, R., GÜTSCHOW, M., & SOSIČ, I. (2021). E3 Ligase Ligands in Successful PROTACs: An Overview of Syntheses and Linker Attachment Points. *Frontiers in Chemistry*, 9, 707317. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.707317>
- CHAMBERLAIN, P. P., LOPEZ-GIRONA, A., MILLER, K., CARMEL, G., PAGARIGAN, B., CHIE-LEON, B., RYCHAK, E., CORRAL, L. G., REN, Y. J., WANG, M., RILEY, M., DELKER, S. L., ITO, T., ANDO, H., MORI, T., HIRANO, Y., HANDA, H., HAKOSHIMA, T., DANIEL, T. O., & CATHERS, B. E. (2014). Structure of the human Cereblon–DDB1–lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(9), 803-809. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2874>
- CHAPMAN-SMITH, A., & CRONAN, J. E. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: A post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(9), 359-363. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01438-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01438-3)
- CHIEN, Y., REYES, A., PARK, H. L., XU, S., & YOON, G. M. (2024). Uncovering the proximal proteome of CTR1 through TurboID-mediated proximity labeling. *PROTEOMICS*, 24(6), 2300212. <https://doi.org/10.1002/pmic.202300212>
- CHO, K. F., BRANON, T. C., RAJEEV, S., SVINKINA, T., UDESHI, N. D., THOUDAM, T., KWAK, C., RHEE, H.-W., LEE, I.-K., CARR, S. A., & TING, A. Y. (2020). Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12143-12154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919528117>
- CHOI-RHEE, E., SCHULMAN, H., & CRONAN, J. E. (2004). Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Science*, 13(11), 3043-3050. <https://doi.org/10.1110/ps.04911804>
- CLOUGH, S. J., & BENT, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- CRONAN, J. E. (2005). Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 416-418. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.017>
- CRUZ-LOPEZ, D., RAMOS, D., CASTILLOVEITIA, G., & SCHIKORSKI, T. (2018). Quintuple labeling in the electron microscope with genetically encoded enhanced horseradish peroxidase. *PLOS ONE*, 13(7), e0200693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200693>
- CURTIS, M. D., & GROSSNIKLAUS, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in *Planta*. *Plant Physiology*, 133(2), 462-469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>
- DE BIE, P., & CIECHANOVER, A. (2011). Ubiquitination of E3 ligases: Self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death & Differentiation*, 18(9), 1393-1402. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.16>
- DONDERIS-FAGOAGA, C. (2023). *Identificación y caracterización funcional de la proteína CEREBLON de Arabidopsis thaliana* [Trabajo Fin de Grado, Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/8485>
- DUMAN, R. E., & LÖWE, J. (2010). Crystal Structures of *Bacillus subtilis* Lon Protease. *Journal of Molecular Biology*, 401(4), 653-670. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.030>
- ELHABASHY, H., MERINO, F., ALVA, V., KOHLBACHER, O., & LUPAS, A. N. (2022). Exploring protein-protein interactions at the proteome level. *Structure*, 30(4), 462-475. <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.02.004>

- FEDOROFF, N. V., BATTISTI, D. S., BEACHY, R. N., COOPER, P. J. M., FISCHHOFF, D. A., HODGES, C. N., KNAUF, V. C., LOBELL, D., MAZUR, B. J., MOLDEN, D., REYNOLDS, M. P., RONALD, P. C., ROSEGRANT, M. W., SANCHEZ, P. A., VONSHAK, A., & ZHU, J.-K. (2010). Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century. *Science*, 327(5967), 833-834. <https://doi.org/10.1126/science.1186834>
- FISCHER, E. S., BÖHM, K., LYDEARD, J. R., YANG, H., STADLER, M. B., CAVADINI, S., NAGEL, J., SERLUCA, F., ACKER, V., LINGARAJU, G. M., TICHKULE, R. B., SCHEBESTA, M., FORRESTER, W. C., SCHIRLE, M., HASSIEPEN, U., OTTL, J., HILD, M., BECKWITH, R. E. J., HARPER, J. W., ... THOMÄ, N. H. (2014). Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature*, 512(7512), 49-53. <https://doi.org/10.1038/nature13527>
- FONSECA, S., & RUBIO, V. (2019). Arabidopsis CRL4 Complexes: Surveying Chromatin States and Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1095. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01095>
- GONG, J., TIAN, Z., QU, X., MENG, Q., GUAN, Y., LIU, P., CHEN, C., DENG, X., GUO, W., CHENG, Y., & WANG, P. (2021). Illuminating the cells: Transient transformation of citrus to study gene functions and organelle activities related to fruit quality. *Horticulture Research*, 8(1), 175. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00611-1>
- GRAY, W. M., MUSKETT, P. R., CHUANG, H., & PARKER, J. E. (2003). Arabidopsis SGT1b Is Required for SCF^{TIR1}-Mediated Auxin Response. *The Plant Cell*, 15(6), 1310-1319. <https://doi.org/10.1105/tpc.010884>
- HAN, Y., BRANON, T. C., MARTELL, J. D., BOASSA, D., SHECHNER, D., ELLISMAN, M. H., & TING, A. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chemical Biology*, 14(4), 619-635. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00919>
- HANSEN, J. D., CORREA, M., NAGY, M. A., ALEXANDER, M., PLANTEVIN, V., GRANT, V., WHITEFIELD, B., HUANG, D., KERCHER, T., HARRIS, R., NARLA, R. K., LEISTEN, J., TANG, Y., MOGHADDAM, M., EBINGER, K., PICCOTTI, J., HAVENS, C. G., CATHERS, B., CARMICHAEL, J., ... LOPEZ-GIRONA, A. (2020). Discovery of CRBN E3 Ligase Modulator CC-92480 for the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(13), 6648-6676. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01928>
- HARRISON, S. J., MOTT, E. K., PARSLEY, K., ASPINALL, S., GRAY, J. C., & COTTAGE, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>
- HIGA, L., & ZHANG, H. (2007). Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Division*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-5>
- HIGGINS, J. J., PUCIŁOWSKA, J., LOMBARDI, R. Q., & ROONEY, J. P. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology*, 63(10), 1927-1931. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000146196.01316.A2>
- HOPKINS, C., GIBSON, A., STINCHCOMBE, J., & FUTTER, C. (2000). Chimeric molecules employing horseradish peroxidase as reporter enzyme for protein localization in the electron microscope. *En Methods in Enzymology* (Vol. 327, pp. 35-45). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)27265-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)27265-0)
- HU, J., HU, B., WANG, M., XU, F., MIAO, B., YANG, C.-Y., WANG, M., LIU, Z., HAYES, D. F., CHINNASWAMY, K., DELPROPOSTO, J., STUCKEY, J., & WANG, S. (2019). Discovery of ERD-308 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradator of Estrogen Receptor (ER). *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(3), 1420-1442. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01572>
- HUA, Z., & VIERSTRA, R. D. (2011). The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 299-334. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112256>
- HUANG, A., TANG, Y., SHI, X., JIA, M., ZHU, J., YAN, X., CHEN, H., & GU, Y. (2020). Proximity labeling proteomics reveals critical regulators for inner nuclear membrane protein degradation in plants. *Nature Communications*, 11(1), 3284. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16744-1>
- INOUE, H., NOJIMA, H., & OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- IRIGOYEN, M. L., INIESTO, E., RODRIGUEZ, L., PUGA, M. I., YANAGAWA, Y., PICK, E., STRICKLAND, E., PAZ-ARES, J., WEI, N., DE JAEGER, G., RODRIGUEZ, P. L., DENG, X. W., & RUBIO, V. (2014). Targeted

- Degradation of Abscisic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(2), 712-728. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122234>
- ITO, T., ANDO, H., SUZUKI, T., OGURA, T., HOTTA, K., IMAMURA, Y., YAMAGUCHI, Y., & HANDA, H. (2010). Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science*, 327(5971), 1345-1350. <https://doi.org/10.1126/science.1177319>
- ITO, T., YAMAGUCHI, Y., & HANDA, H. (2021). Exploiting ubiquitin ligase cereblon as a target for small-molecule compounds in medicine and chemical biology. *Cell Chemical Biology*, 28(7), 987-999. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.012>
- IYER, L. M., BURROUGHS, A., & ARAVIND, L. (2008). Unraveling the biochemistry and provenance of pupylation: A prokaryotic analog of ubiquitination. *Biology Direct*, 3(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-45>
- JOHNSON, B. S., CHAFIN, L., FARKAS, D., ADAIR, J., ELHANCE, A., FARKAS, L., BEDNASH, J. S., & LONDINO, J. D. (2022). MicroID2: A Novel Biotin Ligase Enables Rapid Proximity-Dependent Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 21(7), 100256. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100256>
- JURA, N., SCOTTO-LAVINO, E., SOBCZYK, A., & BAR-SAGI, D. (2006). Differential Modification of Ras Proteins by Ubiquitination. *Molecular Cell*, 21(5), 679-687. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.011>
- KERBLER, S. M., NATALE, R., FERNIE, A. R., & ZHANG, Y. (2021). From Affinity to Proximity Techniques to Investigate Protein Complexes in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7101. <https://doi.org/10.3390/ijms22137101>
- KIDO, K., YAMANAKA, S., NAKANO, S., MOTANI, K., SHINOHARA, S., NOZAWA, A., KOSAKO, H., ITO, S., & SAWASAKI, T. (2020). AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. *eLife*, 9, e54983. <https://doi.org/10.7554/eLife.54983>
- KIM, D. I., JENSEN, S. C., NOBLE, K. A., KC, B., ROUX, K. H., MOTAMEDCHABOKI, K., & ROUX, K. J. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), 1188-1196. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>
- KIM, D. I., KC, B., ZHU, W., MOTAMEDCHABOKI, K., DOYE, V., & ROUX, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111>
- KIM, T.-W., PARK, C. H., HSU, C.-C., KIM, Y.-W., KO, Y.-W., ZHANG, Z., ZHU, J.-Y., HSIAO, Y.-C., BRANON, T., KAASIK, K., SALDIVAR, E., LI, K., PASHA, A., PROVART, N. J., BURLINGAME, A. L., XU, S.-L., TING, A. Y., & WANG, Z.-Y. (2023). Mapping the signaling network of BIN2 kinase using TurboID-mediated biotin labeling and phosphoproteomics. *The Plant Cell*, 35(3), 975-993. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad013>
- KITAGAWA, K., SKOWYRA, D., ELLEDGE, S. J., HARPER, J. W., & HIETER, P. (1999). SGT1 Encodes an Essential Component of the Yeast Kinetochores Assembly Pathway and a Novel Subunit of the SCF Ubiquitin Ligase Complex. *Molecular Cell*, 4(1), 21-33. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80184-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80184-7)
- KRÖNKE, J., UDESHI, N. D., NARLA, A., GRAUMAN, P., HURST, S. N., MCCONKEY, M., SVINKINA, T., HECKL, D., COMER, E., LI, X., CIARLO, C., HARTMAN, E., MUNSHI, N., SCHENONE, M., SCHREIBER, S. L., CARR, S. A., & EBERT, B. L. (2014). Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science*, 343(6168), 301-305. <https://doi.org/10.1126/science.1244851>
- KUBITZ, L., BITSCH, S., ZHAO, X., SCHMITT, K., DEWEID, L., ROHRIG, A., BARAZZONE, E. C., VALERIUS, O., KOLMAR, H., & BÉTHUNE, J. (2022). Engineering of ultraID, a compact and hyperactive enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells. *Communications Biology*, 5(1), 657. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03604-5>
- KWON, K., & BECKETT, D. (2000). Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Science*, 9(8), 1530-1539. <https://doi.org/10.1110/ps.9.8.1530>
- LEE, J.-H., TERZAGHI, W., & DENG, X. W. (2011). DWA3, an Arabidopsis DWD protein, acts as a negative regulator in ABA signal transduction. *Plant Science*, 180(2), 352-357. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.008>

- LEE, M. (2023). Recent Advances in Deep Learning for Protein-Protein Interaction Analysis: A Comprehensive Review. *Molecules*, 28(13), 5169. <https://doi.org/10.3390/molecules28135169>
- LEON, R. G., & BASSHAM, D. C. (2024). PROTAC for agriculture: Learning from human medicine to generate new biotechnological weed control solutions. *Pest Management Science*, 80(2), 262-266. <https://doi.org/10.1002/ps.7741>
- LI, X., REES, J. S., XUE, P., ZHANG, H., HAMAIA, S. W., SANDERSON, B., FUNK, P. E., FARNDAL, R. W., LILLEY, K. S., PERRETT, S., & JACKSON, A. P. (2014). New Insights into the DT40 B Cell Receptor Cluster Using a Proteomic Proximity Labeling Assay. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14434-14447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529578>
- LI, X., WEI, Y., FEI, Q., FU, G., GAN, Y., & SHI, C. (2023). TurboID-mediated proximity labeling for screening interacting proteins of FIP37 in *Arabidopsis*. *Plant Direct*, 7(12), e555. <https://doi.org/10.1002/pld3.555>
- LIU, H., SADYGOV, R. G., & YATES, J. R. (2004). A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry*, 76(14), 4193-4201. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>
- LIU, Q., ZHENG, J., SUN, W., HUO, Y., ZHANG, L., HAO, P., WANG, H., & ZHUANG, M. (2018). A proximity-tagging system to identify membrane protein–protein interactions. *Nature Methods*, 15(9), 715-722. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0100-5>
- MAIR, A., XU, S.-L., BRANON, T. C., TING, A. Y., & BERGMANN, D. C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in *Arabidopsis* enabled by TurboID. *eLife*, 8, e47864. <https://doi.org/10.7554/eLife.47864>
- MATYSKIELA, M. E., ZHANG, W., MAN, H.-W., MULLER, G., KHAMBATTA, G., BACULI, F., HICKMAN, M., LEBRUN, L., PAGARIGAN, B., CARMEL, G., LU, C.-C., LU, G., RILEY, M., SATOH, Y., SCHAFFER, P., DANIEL, T. O., CARMICHAEL, J., CATHERS, B. E., & CHAMBERLAIN, P. P. (2018). A Cereblon Modulator (CC-220) with Improved Degradation of Ikaros and Aiolos. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(2), 535-542. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01921>
- MULLARD, A. (2021). Targeted protein degraders crowd into the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(4), 247-250. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00052-4>
- MÜLLER, T., KALXDORF, M., LONGUESPÉE, R., KAZDAL, D. N., STENZINGER, A., & KRIJGSVELD, J. (2020). Automated sample preparation with SP 3 for low-input clinical proteomics. *Molecular Systems Biology*, 16(1), e9111. <https://doi.org/10.15252/msb.20199111>
- NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A., & CHANDU, D. (2006). The Ubiquitin-Proteasome System. *J. Biosci.* 31(1), 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- PAN, B., & LENTZSCH, S. (2012). The application and biology of immunomodulatory drugs (IMiDs) in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(1), 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.004>
- PENNISI, E. (2008). *The Blue Revolution, Drop by Drop, Gene by Gene*. 320.
- RAMANATHAN, M., MAJZOUB, K., RAO, D. S., NEELA, P. H., ZARNEGAR, B. J., MONDAL, S., ROTH, J. G., GAI, H., KOVALSKI, J. R., SIPRASHVILI, Z., PALMER, T. D., CARETTE, J. E., & KHAVARI, P. A. (2018). RNA–protein interaction detection in living cells. *Nature Methods*, 15(3), 207-212. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4601>
- RAO, V. S., SRINIVAS, K., SUJINI, G. N., & KUMAR, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>
- RHEE, H.-W., ZOU, P., UDESHI, N. D., MARTELL, J. D., MOOTHA, V. K., CARR, S. A., & TING, A. Y. (2013). Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging. *Science*, 339(6125), 1328-1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- ROUX, K. J., KIM, D. I., RAIDA, M., & BURKE, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 801-810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- SAKAMOTO, K. M., KIM, K. B., KUMAGAI, A., MERCURIO, F., CREWS, C. M., & DESHAIES, R. J. (2001). Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for

- ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8554-8559. <https://doi.org/10.1073/pnas.141230798>
- SARIHAN, M., KASAP, M., & AKPINAR, G. (2024). Streamlined Biotinylation, Enrichment and Analysis for Enhanced Plasma Membrane Protein Identification Using TurboID and TurboID-Start Biotin Ligases. *The Journal of Membrane Biology*, 257(1-2), 91-105. <https://doi.org/10.1007/s00232-023-00303-y>
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J.-Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P., & CARDONA, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- SHIRASU, K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 139-164. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092906>
- SILVA, M. C., FERGUSON, F. M., CAI, Q., DONOVAN, K. A., NANDI, G., PATNAIK, D., ZHANG, T., HUANG, H.-T., LUCENTE, D. E., DICKERSON, B. C., MITCHISON, T. J., FISCHER, E. S., GRAY, N. S., & HAGGARTY, S. J. (2019). Targeted degradation of aberrant tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models. *eLife*, 8, e45457. <https://doi.org/10.7554/eLife.45457>
- SINGH, V. K., GOVINDARAJAN, R., NAIK, S., & KUMAR, A. (2000). The Effect of Hairpin Structure on PCR Amplification Efficiency. *Molecular Biology Today*, 1(3), 67-69.
- SIROVER, M. A. (2011). On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810(8), 741-751. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.010>
- SPIECHOWICZ, M., ZYLICZ, A., BIEGANOWSKI, P., KUZNICKI, J., & FILIPEK, A. (2007). Hsp70 is a new target of Sgt1—An interaction modulated by S100A6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(4), 1148-1153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.073>
- SU, Y., NGEA, G. L. N., WANG, K., LU, Y., GODANA, E. A., ACKAH, M., YANG, Q., & ZHANG, H. (2024). Deciphering the mechanism of E3 ubiquitin ligases in plant responses to abiotic and biotic stresses and perspectives on PROTACs for crop resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 22(10), 2811-2843. <https://doi.org/10.1111/pbi.14407>
- SUN, X., GAO, H., YANG, Y., HE, M., WU, Y., SONG, Y., TONG, Y., & RAO, Y. (2019). PROTACs: Great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 64. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0101-6>
- SURKA, C., JIN, L., MBONG, N., LU, C.-C., JANG, I. S., RYCHAK, E., MENDY, D., CLAYTON, T., TINDALL, E., HSU, C., FONTANILLO, C., TRAN, E., CONTRERAS, A., NG, S. W. K., MATYSKIELA, M., WANG, K., CHAMBERLAIN, P., CATHERS, B., CARMICHAEL, J., ... LU, G. (2021). CC-90009, a novel cereblon E3 ligase modulator, targets acute myeloid leukemia blasts and leukemia stem cells. *Blood*, 137(5), 661-677. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008676>
- TAYLOR, R. G., TASSY, C., BRIAND, M., ROBERT, N., BRIAND, Y., & OUALI, A. (1995). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Reports*, 21(1), 71-73. <https://doi.org/10.1007/BF00990974>
- TOMA-FUKAI, S., HIBI, R., NAGANUMA, T., SAKAI, M., SAIJO, S., SHIMIZU, N., MATSUMOTO, M., & SHIMIZU, T. (2020). Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure. *Journal of Biological Chemistry*, 295(43), 14630-14639. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013431>
- UNTERGASSER, A. (2006). Cloning—TOPO-Reaction. *Untergasser's Lab*. http://www.untergasser.de/lab/protocols/topo_reaction_v1_0.htm
- UNTERGASSER, A. (2008). Preparation of Chemical Competent Cells. *Untergasser's Lab*. http://www.untergasser.de/lab/protocols/competent_cells_chemical_v1_0.htm
- UPDYKE, T. V., & NICOLSON, G. L. (1984). Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and immobilized streptavidin matrices. *Journal of Immunological Methods*, 73(1), 83-95. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90034-6)
- VARGESSON, N. (2009). Thalidomide-induced limb defects: Resolving a 50-year-old puzzle. *BioEssays*, 31(12), 1327-1336. <https://doi.org/10.1002/bies.200900103>

- VIERSTRA, R. D. (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 385-397. <https://doi.org/10.1038/nrm2688>
- VOINNET, O., RIVAS, S., MESTRE, P., & BAULCOMBE, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus: An enhanced transient expression system in *N. benthamiana*. *The Plant Journal*, 33(5), 949-956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>
- WADA, T., ASAH, T., & SAWAMURA, N. (2016). Nuclear cereblon modulates transcriptional activity of Ikaros and regulates its downstream target, enkephalin, in human neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(3), 388-394. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.091>
- WANG, H., ZHAI, L., XU, J., JOO, H.-Y., JACKSON, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., XIONG, Y., & ZHANG, Y. (2006). Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 Ubiquitin Ligase Facilitates Cellular Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, 22(3), 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.035>
- WINTER, G. E., BUCKLEY, D. L., PAULK, J., ROBERTS, J. M., SOUZA, A., DHE-PAGANON, S., & BRADNER, J. E. (2015). Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science*, 348(6241), 1376-1381. <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>
- WYDRO, M., KOZUBEK, E., & LEHMANN, P. (2006). Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica*, 53(2), 289-298. https://doi.org/10.18388/abp.2006_3341
- XIE, J., JIN, Y., & WANG, G. (2019). The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0547-y>
- XING, S., WALLMERO, N., BERENDZEN, K. W., & GREFFEN, C. (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiology*, pp.00470.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00470>
- XU, S.-L., SHRESTHA, R., KARUNADASA, S. S., & XIE, P.-Q. (2023). Proximity Labeling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 74(1), 285-312. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070522-052132>
- YAMAMOTO, J., ITO, T., YAMAGUCHI, Y., & HANDA, H. (2022). Discovery of CRBN as a target of thalidomide: A breakthrough for progress in the development of protein degraders. *Chemical Society Reviews*, 51(15), 6234-6250. <https://doi.org/10.1039/D2CS00116K>
- YAMANAKA, S., HORIUCHI, Y., MATSUOKA, S., KIDO, K., NISHINO, K., MAENO, M., SHIBATA, N., KOSAKO, H., & SAWASAKI, T. (2022). A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues. *Nature Communications*, 13(1), 183. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27818-z>
- YANG, Q., ZHAO, J., CHEN, D., & WANG, Y. (2021). E3 ubiquitin ligases: Styles, structures and functions. *Molecular Biomedicine*, 2(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00043-2>
- YANG, X., WEN, Z., ZHANG, D., LI, Z., LI, D., NAGALAKSHMI, U., DINESH-KUMAR, S. P., & ZHANG, Y. (2021). Proximity labeling: An emerging tool for probing in planta molecular interactions. *Plant Communications*, 2(2), 100137. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100137>
- ZHANG, Y., LI, Y., YANG, X., WEN, Z., NAGALAKSHMI, U., & DINESH-KUMAR, S. P. (2021). TurboID-Based Proximity Labeling for In Planta Identification of Protein-Protein Interaction Networks.
- ZHANG, Y., SONG, G., LAL, N. K., NAGALAKSHMI, U., LI, Y., ZHENG, W., HUANG, P., BRANON, T. C., TING, A. Y., WALLEY, J. W., & DINESH-KUMAR, S. P. (2019). TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity. *Nature Communications*, 10(1), 3252. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11202-z>

ANEXO I. RELACIÓN DE CEBADORES EMPLEADOS.

Tabla 1. Cebadores empleados para el desarrollo del proyecto.

Nombre cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Función
FW_TurboID_ol	ATGAAAGACAATACTGTGCCTCTGAAG	61,5	Amplificación y secuenciación de <i>TurboID</i> , <i>TurboID_AtCRBN</i> y de <i>TurboID_link_AtCRBN</i>
RV_TurboID_pCR8	CTTTTCGGCAGACCGCAGACTG	66	Amplificación TurboID y secuenciación pCR8/TurboID
RV_AtCRBN_ol	TTATCTCATATCATCAGCAACTTGAGAAC	60	Amplificación y secuenciación de <i>TurboID_AtCRBN</i> y de <i>TurboID_link_AtCRBN</i>
FW_AtCRBNol TurboID_link	GAAATCAGTCTGCGGTCTGCCGAAAAGG GCGGAGGCGGAGGCGGATCCATGGACG ATGAACGGATTAGGGAAAG	92	Amplificación de <i>AtCRBN</i> para su solape con <i>TurboID</i> y la adición de la secuencia del linker
RV_TurboIDol AtCRBN_link	CTTTCCTAATCCGTTTCATCGTCCATGGATC CGCCTCCGCTCCGCCCTTTTCGGCAGAC CGCAGACTGATTC	64	Amplificación de <i>TurboID</i> para su solape con <i>AtCRBN</i> y la adición de la secuencia del linker
FW_AtCRBNol TurboID	CAGTCTGCGGTCTGCCGAAAAGATGGAC GATGAACGGATTAGGGAAAG	63	Amplificación de <i>AtCRBN</i> para su solape con <i>TurboID</i>
RV_TurboIDol AtCRBN	CTTTCCTAATCCGTTTCATCGTCCATCTTTT CGGACAGACCGCAGACTG	83	Amplificación de <i>TurboID</i> para su solape con <i>AtCRBN</i>
M13F	GTAAACGACGGCCAG	54	Secuenciación pCR8/ TurboID_AtCRBN y pCR8/ TurboID_link_AtCRBN
M13R	GGAAACAGCTATGACCATG	53	Secuenciación pCR8/ TurboID_AtCRBN y pCR8/ TurboID_link_AtCRBN
GFP_pMDC43_ SeqF	GTCCACACAATCTGCCCTTTTCG	58	Secuenciación pMDC43/ TurboID_AtCRBN y pMDC43/ TurboID_link_AtCRBN
pMDC43_SeqR	CGATCGGGGAAATTCGAGCTCC	59	Secuenciación pMDC43/ TurboID_AtCRBN y pMDC43/ TurboID_link_AtCRBN
FW_Seq_ TurboID457	GGAATTGTCATGGCAGAAGCGC	64	Secuenciación pMDC43/ TurboID_AtCRBN; pMDC43/ TurboID_link_AtCRBN; pAllig2/ TurboID_AtCRBN y pAllig2/ TurboID_link_AtCRBN
FW_Seq_ TurboID931	GGAGAAATCAGTCTGCGGTCTG		
RV_Seq_ TurboCRBN2103	GGAACACCAACAATCTGTTCCAC		
FW_Seq_ TurboCRBN1393	CGCGTATATCGTGAAGGTGCTC		
35S_seq	CCTTCGCAAGACCTTCTCTA	62	Secuenciación pAllig2/ TurboID_AtCRBN y pAllig2/ TurboID_link_AtCRBN
NosT_seq	GCAAGACCGCAACAGGATTCAATC	64	

ANEXO II. CONSTRUCCIONES DEL CLONAJE DE TurboID Y LAS FUSIONES DE TurboID_AtCRBN.

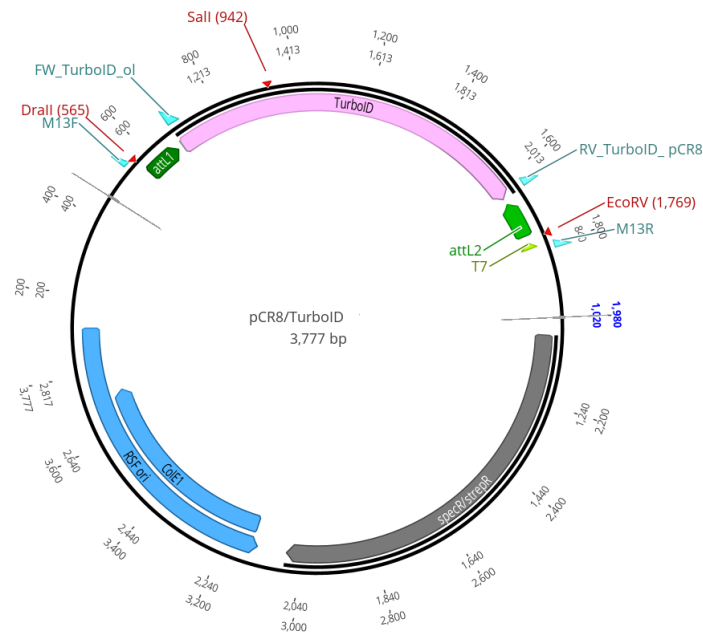


Figura 1. Plásmido pCR8/TOPO/GW[®] con el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*). En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico. *DraII* es el isoesquizómero de *EcoO109*.

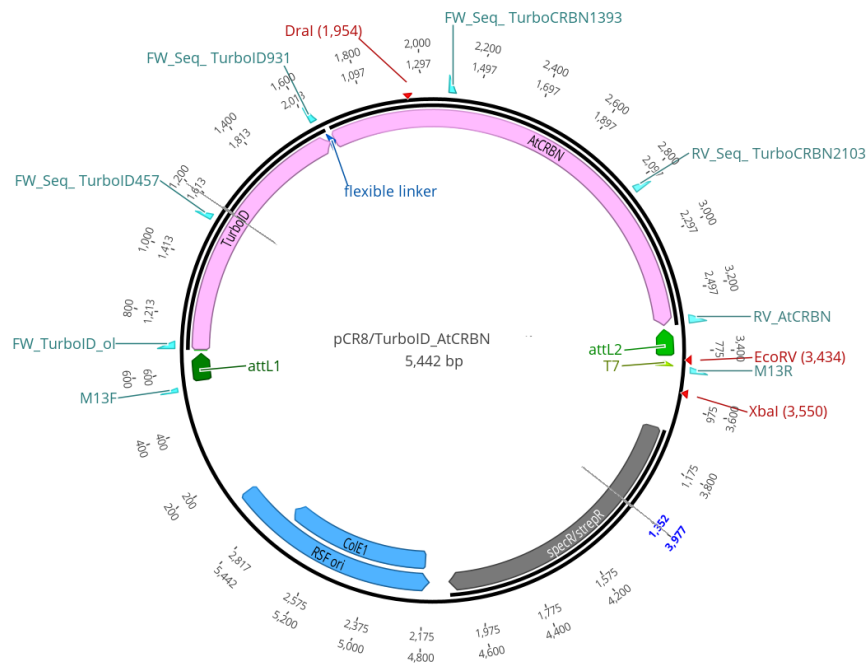


Figura 2. Plásmido pCR8/TOPO/GW[®] con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico.

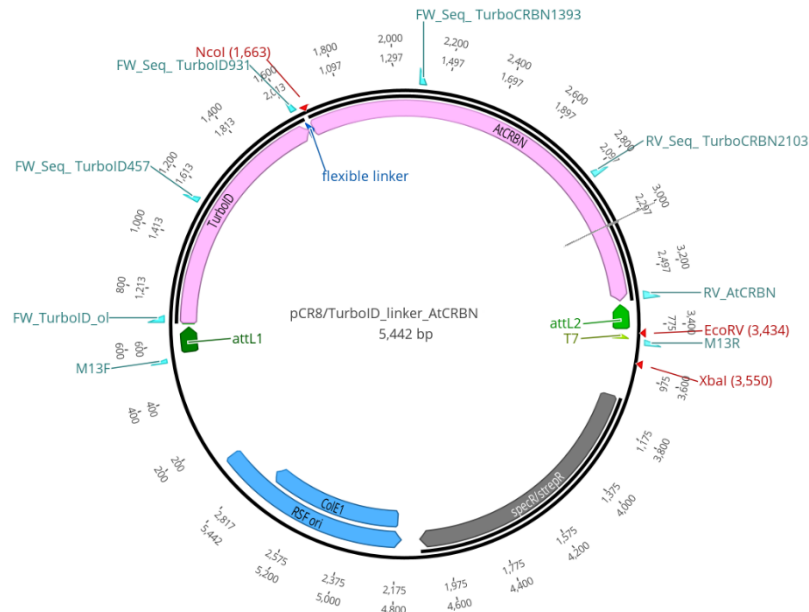


Figura 3. Plásmido pCR8/TOPO/GW[®] con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos, unidos por un *linker* flexible. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico.

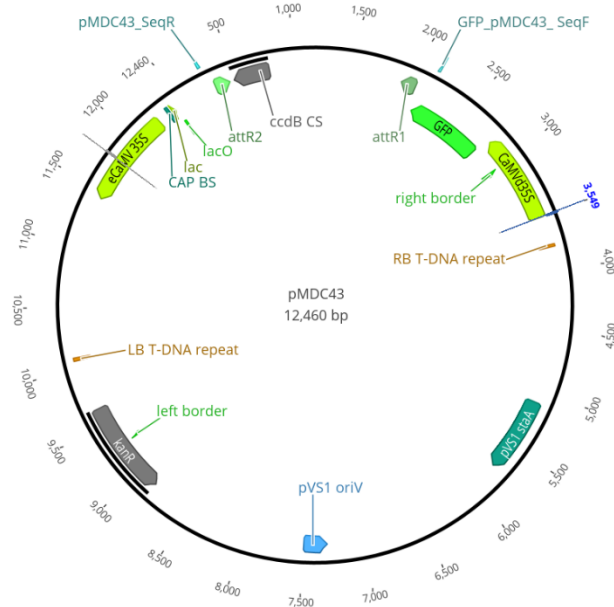


Figura 4. Plásmido de expresión pMDC43. En verde oscuro se indican los sitios de recombinación; en verde la región que codifica para la proteína de fluorescencia Green Fluorescent Protein (GFP); en amarillo el promotor y el terminador; en azul los distintos cebadores empleados para secuenciación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico y el gen “asesino” *ccdB*.

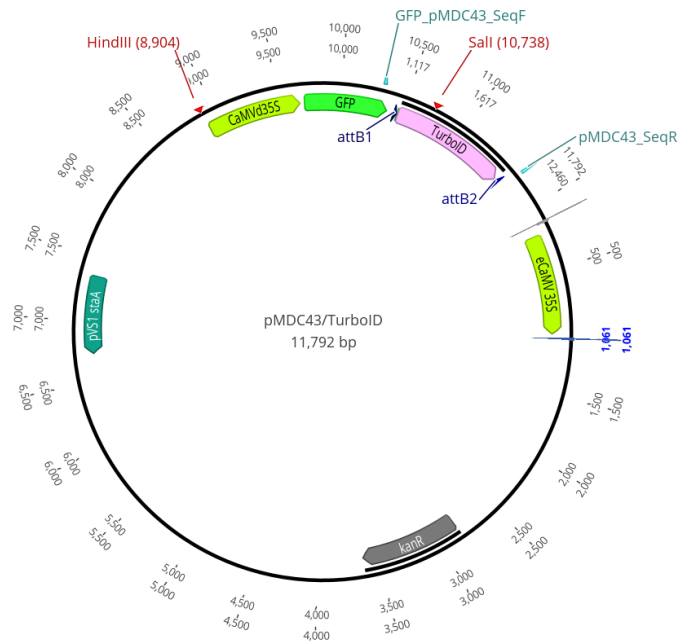


Figura 5. Plásmido pMDC43 con el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*). En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde la proteína de fluorescencia Green Fluorescent Protein (GFP); en morado los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico.

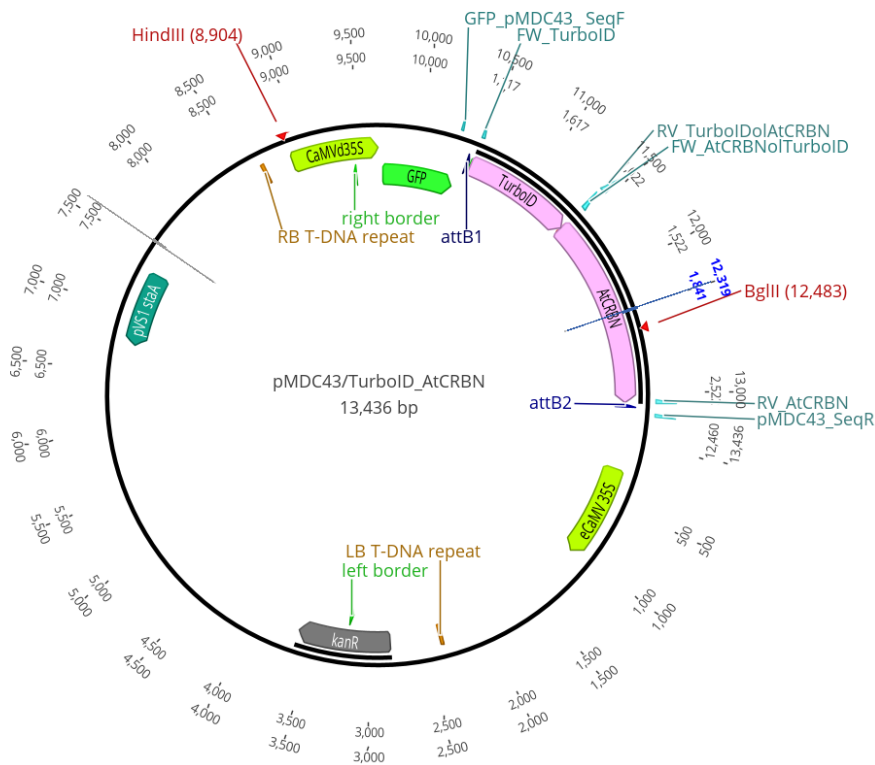


Figura 6. Plásmido pMDC43 con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde la proteína de fluorescencia Green Fluorescent Protein (GFP); en morado los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico.

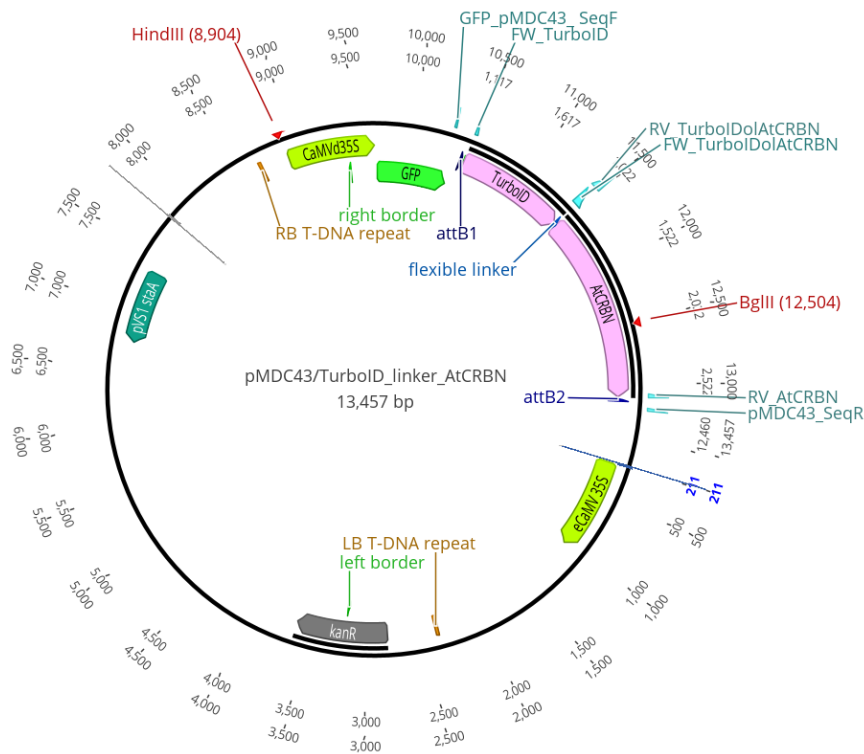


Figura 7. Plásmido pMDC43 con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos, unidos por un *linker* flexible. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en verde la proteína de fluorescencia Green Fluorescent Protein (GFP); en morado los sitios de recombinación; y en gris el gen de resistencia al antibiótico.

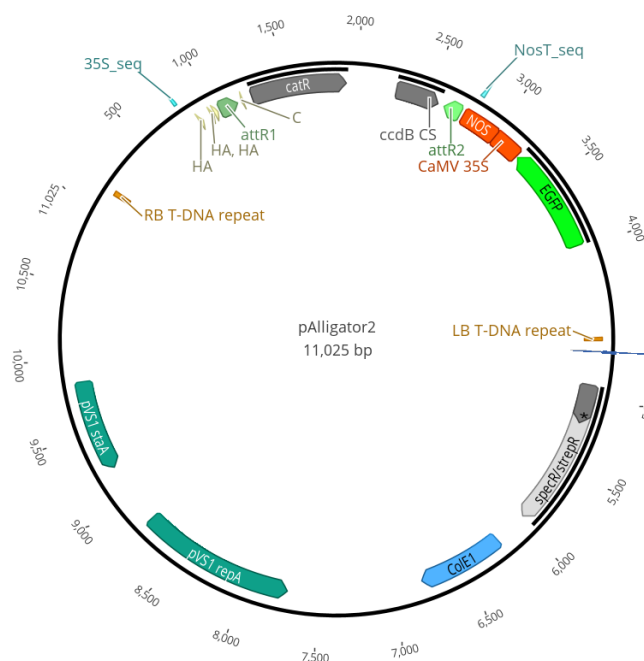


Figura 8. Plásmido de expresión pAlligator2. En verde se indican los sitios de recombinación; en amarillo las etiquetas de histidina; en azul los distintos cebadores empleados para secuenciación; en gris claro el gen de resistencia al antibiótico; y en gris oscuro el gen “asesino” *ccdB*.

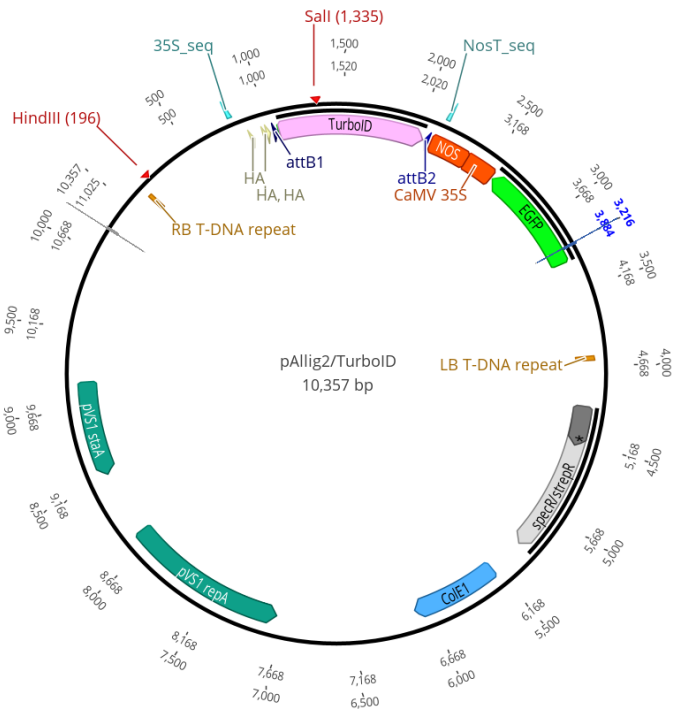


Figura 9. Plásmido pAlligator2 con el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*). En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en amarillo las etiquetas de histidina; en morado los sitios de recombinación; y en gris claro el gen de resistencia al antibiótico.

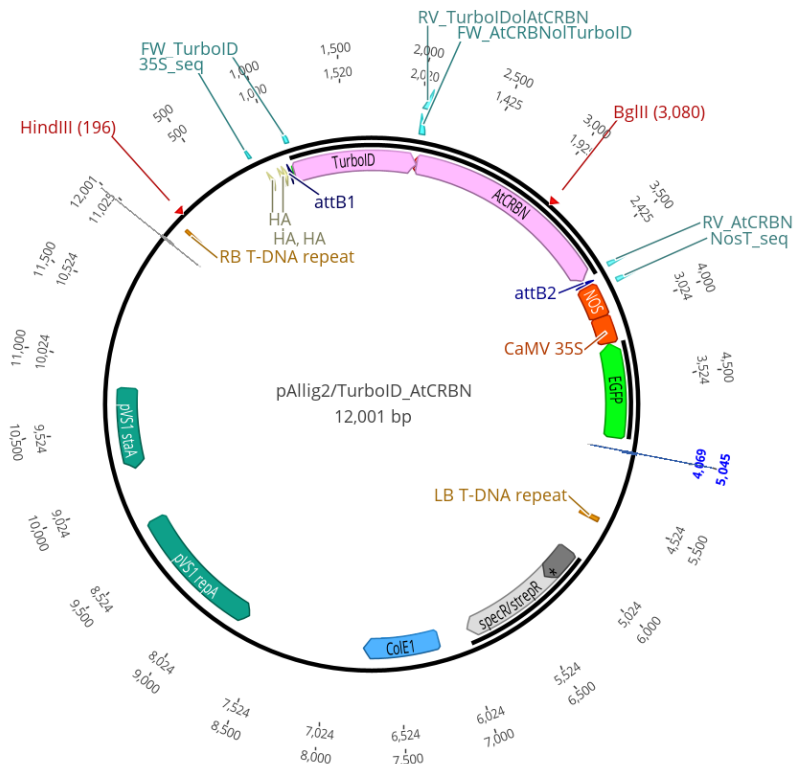


Figura 10. Plásmido pAlligator2 con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en amarillo las etiquetas de histidina; en morado los sitios de recombinación; y en gris claro el gen de resistencia al antibiótico.

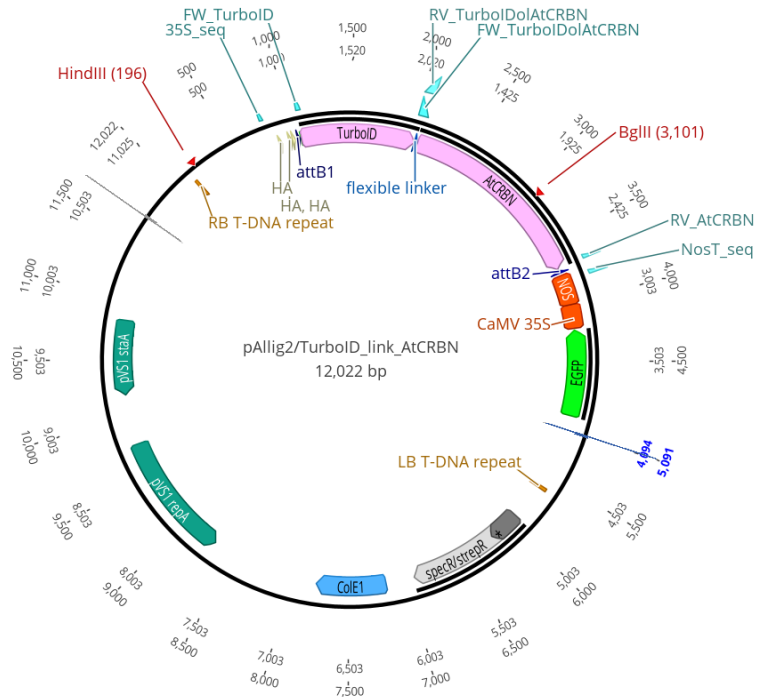


Figura 11. Plásmido pAlligator2 con el fragmento de fusión formado por el gen que codifica para la biotina ligasa TurboID (*TurboID*) y el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos, unidos por un *linker* flexible. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en amarillo las etiquetas de histidina; en morado los sitios de recombinación; y en gris claro el gen de resistencia al antibiótico.

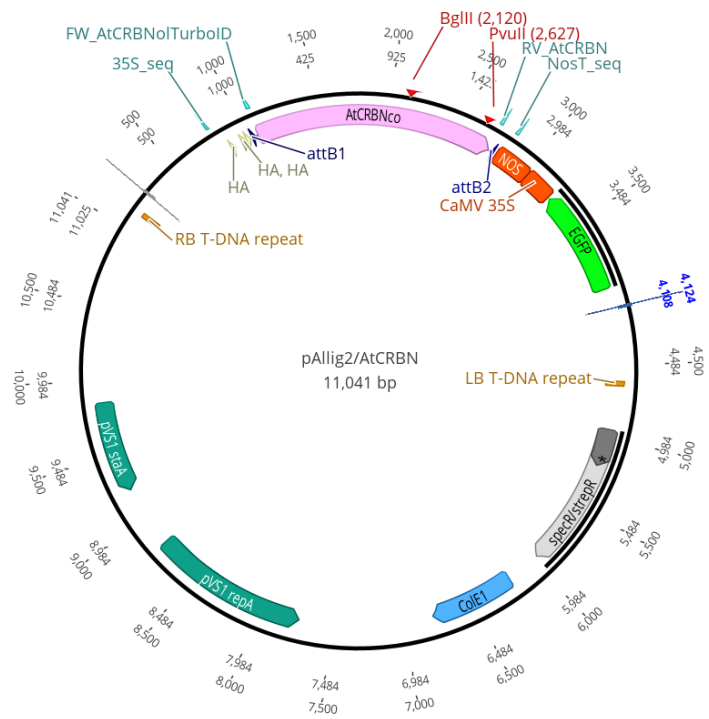


Figura 12. Plásmido pAlligator2 con el gen de *Arabidopsis thaliana* (*AtCRBN*) homólogo al gen que codifica para la proteína *Cerebon* de humanos. En rojo se indican los sitios de restricción relevantes; en rosa el inserto; en azul los distintos cebadores empleados; en amarillo las etiquetas de histidina; en morado los sitios de recombinación; y en gris claro el gen de resistencia al antibiótico.

ANEXO III. RESULTADOS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA.

Tabla 1. Listado de proteínas detectadas mediante LC-MS/MS en la muestra GFP-TurboID tras el enriquecimiento en proteínas biotiniladas.

ID proteína	Descripción de la proteína	Organismo	Probabilidad del péptido	Intensidad total
A0A0M4UPT2	Fosofolipasa D	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	4871,84
A0A0S0N5Y9	Tubulina cadena α	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	3341,12
A0A173FEI6	RNA helicase-like 8	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	26687,78
A0A1P8SF07	TOM1-like protein	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	10350,50
A0A679AK42	EXA1 (Essential for potexvirus accumulation)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	10175,53
A7UKX3	LIGB (deoxigenasa)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	8261,06
C9DFB0	ASR (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	24830,24
F2Z9R1	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	2677,17
Q8H1A1	Actina (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	0
V5KY72	Enzima conjugadora de ubiquitina	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	7687,76
W6JPQ8	Nucleoporina Nup50d	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	5939,76
A0A1P8SF02	Proteína quinasa HT1 (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	2758,17
A0A0S4IJL0	Subunidad pequeña de la carboxilasa Ribulosa Bis-fosfato	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9988	2191,88
I0B7J9	Fotosistema1 subunidad Q	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9963	2532,78
A1YUL9	Importina cadena α	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9985	4347,80
A0A0H5AWE5	Transportador de tipo ACB	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9963	0
P42212	(GFP) Green fluorescent protein	<i>Aequorea victoria</i>	0,999	1601767,00

Tabla 2. Listado de proteínas detectadas mediante LC-MS/MS en la muestra GFP-TurboID_AtCRBN tras el enriquecimiento en proteínas biotiniladas.

ID proteína	Descripción de la proteína	Organismo	Probabilidad del péptido	Intensidad total
A0A0M4UPT2	Fosfolipasa D	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	28313,93
A0A0S0N5Y9	Tubulina cadena α	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	5373,55
A0A173FEI6	RNA helicase-like 8	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	38884,87
A0A1P8SF07	TOM1-like protein	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	26262,78
A0A1W5XFS7	HSP70	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	44186,16
A0A679AK42	EXA1 (Essential for potexvirus accumulation 1)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	134376,20
A7UKX3	LIGB (deoxigenasa)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	22819,73
C9DFB0	ASR (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	12326,04
F2Z9R1	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	10990,59
H9C954	Actina (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	10472,38
Q84U01	CHMP1B (Proteína de desarrollo putativa)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	24614,58
Q8H1A1	Actin (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	6720,36
V5KY72	Enzima conjugadora de ubiquitina	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	2835,94
W6JPQ8	Nucleoporina Nup50d	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	0
A0A1P8SF02	Proteína quinasa HT1 (Fragment)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	5722,25
A0A224AKY6	SGT1A (SCF)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	19008,79
A0A0S4IJL0	Subunidad pequeña de la carboxilasa Ribulosa Bis-fosfato	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9988	19300,28
I0B7J9	Fotosistema 1 subunidad Q	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9963	3180,81
B3IWK5	MAP quinasa 6	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9963	4846,94
C9DFA5	RAS 5 (GTPasa)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	2978,13
A0A0A8IBT8	Dehidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	2660,59
A0A0A7HI84	Histona H4	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,999	4607,46
A0A3S6GZW0	DCP1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9989	2750,01

Q6XX19	EF1ALPHA (Factor 1 α de elongación de la traducción)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	0,9988	7078,15
P42212	(GFP) Green fluorescent protein	<i>Aequorea victoria</i>	0,999	257504,80