



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Estudio de un enhancer transcripcional regulado por  
proteínas DELLA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Montoliu Silvestre, Eva

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Cotutor/a externo: ALABADI DIEGO, DAVID

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# Estudio de un *enhancer* transcripcional regulado por proteínas DELLA

La expresión de un gen suele estar determinada por la presencia en su región promotora de elementos cis distales llamados *enhancers*. Estos elementos son unidos por factores de transcripción (TFs) que reclutan la maquinaria basal de transcripción para promover la expresión del gen. Investigaciones recientes en plantas muestran que, al igual que ocurre en animales, los *enhancers* interactúan físicamente con el promotor proximal o con intrones para promover la expresión del gen diana, formando lo que se conoce como *loops*. En este TFG se va a investigar la regulación del gen *GID1a* de *Arabidopsis* por un posible *enhancer*. *GID1a* codifica un receptor de giberelinas y su expresión se promueve por los reguladores transcripcionales DELLA. En primer lugar, hemos hecho el análisis bioinformático de un experimento ChIP-seq de la proteína DELLA RGA. Hemos observado que esta proteína se une preferentemente alrededor del inicio de la transcripción (TSS) de los genes diana y en sus promotores, entre ellos el de *GID1a*. Varias evidencias apuntan a que la región unida por RGA en el gen *GID1a* puede actuar como un *enhancer*: (i) la región que une RGA colocaliza con la RNAPII y el complejo MEDIATOR; (ii) la región unida por RGA es accesible; y (iii) un análisis global de conformación de la cromatina indica que la región donde se une RGA interactúa físicamente con el intrón del gen, apuntando a que se podría formar un *loop*. Para probar esta hipótesis, hemos preparado dos tipos de construcciones con fusiones al gen testigo *GUS*: (i) la región que une RGA, en ambas orientaciones, más un promotor mínimo; y (ii) versiones del pGID1a en las que omitimos el intrón o la región de unión de RGA. Durante el TFG, hemos obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan las dos versiones de la región que une RGA fusionadas a *GUS*. Nuestro análisis muestra que esta región es suficiente para promover la expresión del testigo de manera dependiente de DELLAs. Este resultado lo hemos confirmado mediante expresión transitoria de una fusión de la misma región al gen *LUCIFERASA* (*LUC*) y su ensayo en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La actividad LUC aumenta al coexpresar una proteína DELLA. Nuestros resultados indican que la regulación del gen *GID1a* por DELLAs ocurre a través de la unión de estas a un elemento cis en su promotor que actúa como *enhancer* transcripcional.

## Palabras clave

DELLA, GID1, giberelinas, ChIP-seq, GUS, luciferasa, *enhancer*

**Autor:** Eva Montoliu Silvestre

**Tutor Académico:** Javier Agustí Feliu

**Cotutor:** David Alabadí Diego

**Titulación:** Grado en Biotecnología

**Localidad y fecha:** Valencia, junio de 2022

# Study of a transcriptional enhancer regulated by DELLA proteins

The expression of a gene is usually determined by the presence in its promoter region of distal cis-elements called enhancers. These elements are bound by transcription factors (TFs) that recruit the basal transcription machinery to promote gene expression. Recent research in plants shows that, as in animals, enhancers physically interact with the proximal promoter or introns to promote the expression of the target gene, forming what are known as loops. In this TFG we will investigate the regulation of the Arabidopsis *GID1a* gene by a putative enhancer. *GID1a* encodes a gibberellin receptor and its expression is promoted by DELLA transcriptional regulators. First, we have performed bioinformatic analysis of a ChIP-seq experiment of the DELLA RGA protein. We observed that this protein binds preferentially around the transcriptional start of transcription (TSS) of target genes and at their promoters, including that of *GID1a*. Several evidences point to the fact that the RGA-binding region in the *GID1a* gene may act as an enhancer: (i) the RGA-binding region colocalizes with RNAPII and the MEDIATOR complex; (ii) the RGA-binding region is accessible; and (iii) a global chromatin conformation analysis indicates that the RGA-binding region physically interacts with the intron of the gene, suggesting that a loop could be formed. To test this hypothesis, we have prepared two types of constructs with fusions to the *GUS* control gene: (i) the RGA-binding region, in both orientations, plus a minimal promoter; and (ii) versions of p*GID1a* in which we omitted the intron or the RGA-binding region. During TFG, we obtained transgenic Arabidopsis plants expressing both versions of the RGA-binding region fused to *GUS*. Our analysis shows that this region is sufficient to promote the expression of the control in a DELLAs-dependent manner. We have confirmed this result by transient expression of a fusion of the same region to the *LUCIFERASE (LUC)* gene and its assay in *Nicotiana benthamiana* leaves. *LUC* activity increases upon co-expression of a DELLA protein. Our results indicate that the regulation of the *GID1a* gene by DELLAs occurs through the binding of DELLAs to a cis-element in its promoter that acts as a transcriptional enhancer.

## Key Words

DELLA, *GID1*, gibberellins, ChIP-seq, *GUS*, luciferase, enhancer

**Autor:** Eva Montoliu Silvestre

**Academic tutor:** Javier Agustí Feliu

**Cotutor:** David Alabadí Diego

**Degree:** Biotechnology

**Location and date:** Valencia, june of 2022

# Agradecimientos

Gracias a mi familia, por creer siempre que puedo conseguir todo lo que me proponga.

Gracias a mis amigas. A Judit por ser mi confidente desde siempre, a Carla, mi compañera incondicional durante toda la carrera y a Alba, por el reencuentro inesperado en el último momento que no podría haber sido mejor.

Gracias a toda la gente de los laboratorios 2.05, 2.07 y 2.08 por hacerme sentir como en casa y por vuestros consejos dentro y fuera del IBMCP, no tengo ninguna duda de que sin vosotros este año no habría sido igual.

Por último, pero muy importante, gracias a David Alabadí, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de realizar un trabajo con el que he aprendido y disfrutado muchísimo.



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>7</b>
3.1. Análisis bioinformático . . . . .	7
3.1.1. Preprocesamiento . . . . .	7
3.1.2. Alineamiento . . . . .	7
3.1.3. Visualización . . . . .	8
3.1.4. Llamada de picos . . . . .	8
3.1.5. Análisis funcionales . . . . .	8
3.2. Material microbiológico . . . . .	8
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> . . . . .	8
3.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . . . .	9
3.3. Material vegetal . . . . .	9
3.3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	9
3.3.2. <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	10
3.4. Clonación . . . . .	11
3.4.1. Gateway . . . . .	11
3.4.2. Goldenbraid . . . . .	12
3.5. Secuenciación . . . . .	13
3.6. Ensayo GUS . . . . .	14
3.7. Ensayo Luciferasa . . . . .	14
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>17</b>
4.1. Análisis bioinformático ChIP-seq . . . . .	17
4.2. Caracterización de un <i>enhancer</i> transcripcional del gen <i>GID1a</i> . . . . .	20

**5. Conclusiones**

**25**

**Bibliografía**

**27**

# Índice de figuras

1.1. GAs activas. . . . .	2
1.2. Complejo GA-GID1-DELLA. . . . .	2
1.3. Organización de las regiones funcionales en una proteína DELLA. . . . .	3
1.4. Modelo de regulación de la expresión génica por GAF1. . . . .	4
3.1. Esquema del sistema clonación Gateway. . . . .	11
3.2. Vectores empleados para la clonación empleando el sistema Gateway. . . . .	12
3.3. Esquema del sistema de clonación Golden Braid. . . . .	13
4.1. Número de lecturas de cada réplica. . . . .	18
4.2. Distribución genómica de RGA en los genes. . . . .	19
4.3. Comparación del número de picos entre las distintas réplicas. . . . .	19
4.4. Distribución de picos por regiones génicas. . . . .	20
4.5. RGA colocaliza con la RNAPII. . . . .	22
4.6. Colocalización del pico de RGA y del sitio de unión de IDD7 en el promotor de <i>GID1a</i> . . . . .	22
4.7. Construcciones del promotor de <i>GID1a</i> frente al gen reportero GUS. . . . .	23
4.8. Resultados de la tinción GUS en plántulas de <i>Arabidopsis</i> . . . . .	23
4.9. Gráfico que muestra los datos de luminiscencia obtenidos tras el ensayo del de infiltración en <i>N. benthamiana</i> . . . . .	24
5.1. Análisis de calidad de las lecturas del control empleando fastQC. . . . .	2
5.2. Análisis de calidad de las lecturas de la réplica 1 empleando fastQC. . . . .	3
5.3. Análisis de calidad de las lecturas de la réplica 2 empleando fastQC. . . . .	4
5.4. Análisis de calidad de las lecturas de la réplica 3 empleando fastQC. . . . .	5
5.5. Script empleado para el procesamiento de las lecturas del ChIP-seq desde el control de calidad hasta la llamada de picos. . . . .	6
5.6. Script empleado para el el análisis de los picos. . . . .	6
5.7. Script empleado para procesar la intersección entre picos. . . . .	7



5.8. Script empleado para convertir ficheros GFT en ficheros BED con las coordenadas de cada gen. . . . .	7
5.9. Script empleado para seleccionar los picos presentes en al menos 2 de las 3 réplicas del ChIP-seq y escribir nuevos ficheros con las regiones y los summits de estos. . . . .	8
5.10. Script empleado para la representación de un diagrama de Venn que muestra la intersección entre los picos de las diferentes réplicas del ChIP-seq. .	9
5.11. Script empleado para la representación de un heatmap que distribución genómica de RGA en los genes diana. . . . .	9
5.12. Script empleado para anotación de los picos en las diferentes categorías genómicas y su representación. . . . .	10

# Índice de tablas

3.1. Composición del medio LB empleado para el cultivo de <i>E.coli</i> y <i>A.tumefaciens</i> . . . . .	9
3.2. Composición del medio MS empleado para el cultivo de <i>A.thaliana</i> . . . . .	10
3.3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de las diferentes construcciones del promotor del gen <i>GID1a</i> . . . . .	11
3.4. Oligonucleótidos empleados para secuenciación. . . . .	13
3.5. Plásmidos secuenciados y los oligonucleótidos empleados para cada uno de ellos. . . . .	14
3.6. Soluciones empleadas para la tinción GUS. . . . .	14
4.1. Tabla de motivos enriquecidos en las regiones de unión de RGA. . . . .	21



# Abreviaturas

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARR1</b>	Response Regulator 1
<b>BR</b>	Brasinoesteroide
<b>BZR1</b>	Brassinosteroid signaling positive regulator 1
<b>CKs</b>	Citoquininas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GAs</b>	Giberelinas
<b>GAI</b>	GA Insensitive
<b>GFP</b>	Green Florescent Protein
<b>GGFP</b>	Geranilgeranil difosfato
<b>GID1</b>	Gibberellin Insensitive Dwarf 1
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa
<b>IAA</b>	Auxina
<b>IDD</b>	Indeterminate Domain
<b>IGV</b>	Integrative Genome Viewer
<b>MED12</b>	Mediator12
<b>PIF4</b>	Phytochrome interacting factor 4
<b>P450</b>	P450 monooxigenasa
<b>RGA</b>	Repressor of gai
<b>RGL</b>	RGA-like
<b>SLY1</b>	SLEEPY1
<b>TF</b>	Factor de transcripción
<b>TPR</b>	Topless Related
<b>TPS</b>	Terpeno sintasas
<b>RNAPII</b>	ARN polimerasa II
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>PAC</b>	Paclobutrazol
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction
<b>2ODD</b>	Dioxigenasa 2-oxoglutarato-dependiente



# Capítulo 1

## Introducción

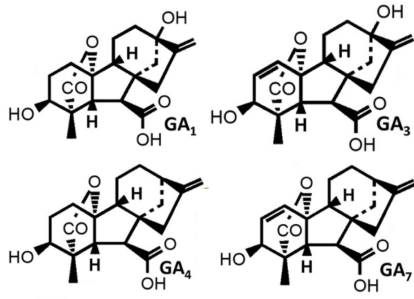
Las hormonas vegetales, también conocidas como fitohormonas, son pequeñas moléculas endógenas que regulan la mayoría de procesos fisiológicos en la planta, por ejemplo, muchos procesos de crecimiento y desarrollo o la integración de estos con señales ambientales. Las hormonas de plantas son un grupo de moléculas, bastante heterogéneas desde el punto de vista de su estructura química, que incluye a las giberelinas (GA), auxinas (IAA), citoquininas (CKs), brasinoesteroides (BR), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y estrigolactinas (SL) (Davière y Achard 2016). Cada una de ellas cumple unas funciones determinadas, por ejemplo, el JA media la respuesta de la planta al estrés mecánico o al ataque de patógenos (León y Sánchez-Serrano 1999), mientras que las auxinas actúan como morfógenos y como “disparadores” de varios procesos de desarrollo (Guillotín y Birnbaum 2020).

En el grupo de investigación en el que he realizado este TFG están interesados en entender la contribución de las GAs al crecimiento y desarrollo en plantas, y en particular, en qué medida estas hormonas conectan esos programas de crecimiento y desarrollo con el medio ambiente. Las GAs regulan una gran variedad de procesos de desarrollo en plantas superiores, como el alargamiento del tallo mediante la estimulación de la división y elongación celular, la germinación o rotura de la latencia, la floración, la expresión sexual induciendo el desarrollo del polen o el retraso de la senescencia de hojas y frutos. Además, el metabolismo de GAs es muy sensible a cambios en las condiciones ambientales (Hedden y Phillips 2000). Esto hace que representen un marco conceptual adecuado para estudiar la relación entre ambiente y crecimiento o desarrollo.

El estudio de las funciones de las GAs se ha llevado a cabo principalmente mediante la observación de plantas con la vía alterada. Por un lado, existen mutantes con defectos en las enzimas biosintéticas de GAs y, por tanto, deficientes en estas hormonas. Estos mutantes presentan tamaño muy reducido, pero pueden crecer de manera normal en respuesta a GAs exógenas (Koornneef y Van der Veen 1980). Por el contrario, los mutantes que acumulan una mayor cantidad de GAs debido a defectos en las enzimas implicadas en su degradación, presentan mayor altura (Reid, Ross y Swain 1992). Por otro lado, están aquellos que presentan defectos en alguno de los componentes de la vía de señalización. Esto está asociado a fenotipos variables que no pueden ser resueltos mediante el cultivo en presencia de GAs exógenas (Hussain y Peng 2003).

Se han identificado 136 GAs en plantas, hongos y bacterias (Hedden y Phillips 2000), pero tan solo unas pocas presentan actividad biológica. La mayoría son precursores de las formas activas o formas inactivadas de las hormonas. Las principales giberelinas activas son GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> y suelen contener un grupo hidroxilo en C3 $\beta$ , un grupo carboxilo en C6 y una lactona entre C4 y

C10 (S. Yamaguchi 2008), como se puede observar en la figura 1.1.

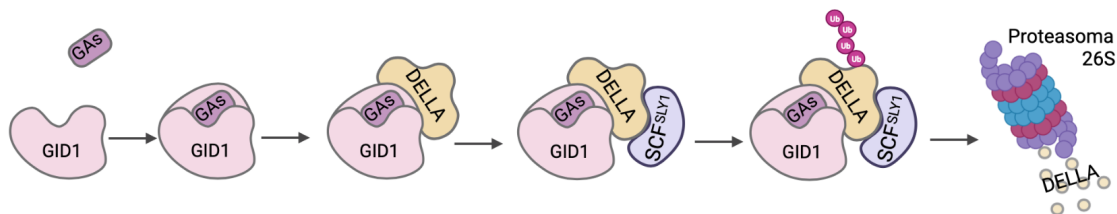


**Figura 1.1. GAs activas.** Estructura molecular de las principales gibberelinas activas: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>.

El control de la concentración de formas activas de GAs se realiza principalmente mediante la biosíntesis e inactivación. Las GAs son sintetizadas a partir de un precursor común de diterpenoides, el geranylgeranyl difosfato (GGDP) y son necesarios tres tipos de enzimas: terpeno sintasas (TPSs), citocromo P450 monooxigenasas (P450s) y dioxigenasas 2-oxoglutarato-dependientes (2ODDs). En las reacciones finales de la ruta de síntesis de las gibberelinas activas participan las 2ODDs solubles de tipo GA 20-oxidasas y GA 3-oxidasas. Otros grupos, como las GA 2-oxidasas, participan en la inactivación (S. Yamaguchi 2008).

La información contenida en la concentración de la hormona en un momento y lugar determinado tiene que traducirse en una respuesta fisiológica, que se produce gracias a la vía de señalización. La GA activa es reconocida por un receptor, inicialmente identificado en arroz, llamado GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) (Ueguchi-Tanaka y col. 2005). En *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) se han identificado 3 homólogos: *GID1a*, *GID1b* y *GID1c* (Nakajima y col. 2006). Se trata de receptores solubles presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo que se unen únicamente a las formas bioactivas de GAs (Ueguchi-Tanaka y col. 2005). La unión GA-GID1 activa el receptor permitiendo que este se una a una proteína DELLA, que es el regulador negativo maestro de la vía, formando el complejo GA-GID1-DELLA (Murase y col. 2008).

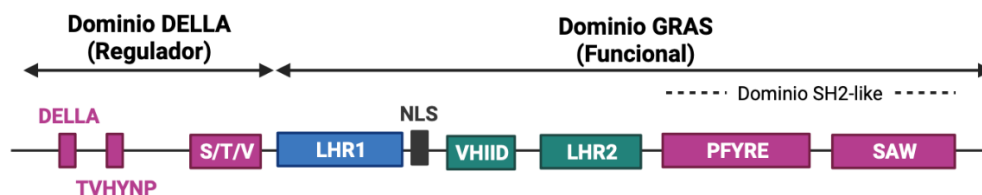
La estructura del complejo GA-GID1-DELLA puede observarse en la figura 1.2. El receptor GID1 contiene un bolsillo donde se encuentra el sitio de unión a GA. Tras la interacción GA-GID1 el extremo N-terminal del receptor se pliega actuando como tapa para este bolsillo. Este cambio conformacional permite la interacción del receptor con la proteína DELLA a través de varios motivos de secuencia localizados en la parte N-terminal de esta. La interacción provoca un cambio conformacional en el dominio C-terminal, conocido como GRAS, favoreciendo su reconocimiento por una proteína con caja F, SLEEPY1 (SLY1) en el caso de *Arabidopsis* (Murase y col. 2008), que la recluta al complejo ubiquitina ligasa SCF<sup>SLY1</sup> para su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S (Davière y Achard 2016; Dill, Thomas y col. 2004).



**Figura 1.2. Complejo GA-GID1-DELLA.** Modelo de la interacción GID1-DELLA dependiente de GA y la posterior unión de SCF<sup>SLY1</sup> (Adaptada de T.-p. Sun 2011).

Las proteínas DELLA constituyen una subfamilia dentro de la familia GRAS de reguladores transcripcionales. Las proteínas GRAS suelen tener un tamaño de 400-700 aminoácidos y se caracterizan por contener motivos conservados en el dominio GRAS, generalmente en el siguiente orden: LHR1 (leucin hepted repeat), VHIID, LHRII, PFRYE y SAW. Se agrupan en 8 subfamilias por la similitud del dominio GRAS: DELLA, HAM, LISCL, PAT1, LS, SCR, SHR y SCL3 (Tian y col.

2004). La estructura general de las proteínas DELLA puede observarse en la figura 1.3.



**Figura 1.3. Organización de las regiones funcionales en una proteína DELLA.** Organización estructural de las proteínas DELLA, ilustrando los dominios y subdominios conservados implicados en la interacción con *GID1* (morado), unión a la proteína diana (azul), localización nuclear (gris) e interacción con SLY1/GID2 (verde). (Adaptada de Hauvermale, Ariizumi y Steber 2012).

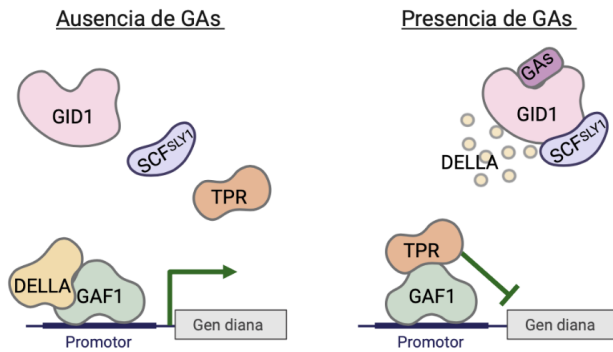
*Arabidopsis* contiene 5 proteínas DELLA: GA INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-like 1 (RGL1), RGL2 y RGL3. Una investigación en nuestro laboratorio mostró que estos genes aparecieron por duplicación génica y posterior subfuncionalización, i.e. las proteínas son funcionalmente intercambiables, mientras que la especificidad de función viene determinada en gran medida por el patrón de expresión de cada gen (Gallego-Bartolomé, Minguet, Marín y col. 2010). No obstante, algunas de ellas también tienen funciones solapantes en ciertos casos, por ejemplo, GAI y RGA controlan principalmente la expansión celular (Dill y T.-p. Sun 2001) y RGL2 es el principal regulador de germinación (Lee y col. 2002).

Las proteínas DELLA, como el resto de los reguladores transcripcionales GRAS, se localizan en el núcleo, y no contienen ningún dominio de unión a ADN, por lo que regulan la expresión de sus genes diana, principalmente, mediante la interacción con otros TFs (T.-p. Sun 2010). Análisis de interacción proteína-proteína han mostrado que las proteínas DELLA son muy promiscuas, siendo capaces de interactuar con más de 200 TFs y otros reguladores transcripcionales (Lantzouni y col. 2020). En la actualidad se barajan dos mecanismos principales por los que las DELLA regulan la actividad de los TFs con los que interactúan. Por un lado está el mecanismo de secuestro, en el que al interactuar con el TF se evita que este se una al ADN. Tal es el caso de PIF4 (De Lucas y Daviere 2008) o BZR1 (Gallego-Bartolomé, Minguet, Grau-Enguix y col. 2012). El efecto sobre la expresión de los genes diana dependerá de si el TF actúa como un activador o como un represor. Por otro lado, las DELLA son capaces de interactuar con otros TFs mientras estos están unidos a la cromatina, actuando las DELLA en estos casos como activadores transcripcionales. Es el caso, por ejemplo, de la interacción con ARR1 (Marín-de la Rosa y col. 2015).

El estudio de estos modos de acción ha permitido averiguar las bases moleculares de la regulación “feedback” que opera para controlar el metabolismo de GAs en respuesta a la propia hormona (Hedden y Phillips 2000). Por ejemplo, se conocía desde hacía tiempo que la inducción de la expresión del gen *AtGA20ox2*, que participa en la biosíntesis de giberelinas, ocurre cuando los niveles de la hormona son bajos, mientras que la expresión se reprime cuando son altos. Ahora sabemos que esta regulación está mediada por un TF de tipo IDD (INDETERMINATE DOMAIN) GAF1 o IDD2, y dos reguladores transcripcionales con los que interactúa, las proteínas DELLA que actúan de activadores y el co-represor TOPLESS RELATED (TPR) que reprime. Cuando los niveles de GAs disminuyen, las proteínas DELLA se acumulan y hacen que el complejo GAF1-TPR se disocie, de manera que se forma GAF1-DELLA activando la transcripción del gen diana (figura 1.4). Por lo tanto, la expresión de *AtGA20ox2* está regulada por el balance TPR:DELLA, que viene determinado por los niveles de GAs.

La regulación correcta de la expresión génica, tanto temporal como espacialmente, es esencial





**Figura 1.4.** Modelo de regulación de la expresión de un gen por GAF1 por el balance entre proteínas DELLA, que inducen la expresión en ausencia de GAs, y el represor transcripcional TPR, que la inhibe en presencia de GAs (Adaptada de Fukazawa, Ito y col. 2015).

para el desarrollo, el crecimiento y las repuesta a señales ambientales. Para ello, los genes están controlados por elementos cis que pueden actuar como potenciadores (*enhancers*) o como inhibidores de la expresión. Estos elementos cis interactúan con TFs y pueden encontrarse a megabases (Mb) de distancia del gen que regulan. La interacción con los TFs se da gracias a determinados motivos en la secuencia de ADN reconocidos por cada uno de ellos y que está influenciada por cambios en la cromatina, como modificaciones post-traduccionales en las histonas. Además, cada gen se encuentra bajo el control de varios de estos elementos. Los elementos cis conocidos como *enhancers* suelen encontrarse en regiones accesibles de la cromatina. Investigaciones en animales han mostrado que estos *enhancers*, además, suelen estar asociados a marcas de activación transcripcional en las histonas y que son capaces, por sí mismos, de inducir la expresión del gen diana (Weber y col. 2016). Si bien esta última característica está conservada en plantas, no se ha conseguido asociar ninguna marca de histonas a *enhancers* en plantas (Yan y col. 2019). Una característica que está conservada en eucariotas, es que los *enhancers* forman loops cromosómicos con la región promotora proximal del gen diana, de manera que se conectan físicamente el TF que inicia la activación del gen con la maquinaria basal de transcripción (Weber y col. 2016).

Dada la capacidad de las DELLA de actuar como activadores transcripcionales, sería esperable que fueran reclutadas a zonas de la cromatina que actúan como *enhancers* de los genes diana y/o a su región promotora proximal. Del mismo modo, sería esperable identificar interacciones entre esas regiones reguladoras en los genes diana. En este TFG hemos investigado si las regiones diana de las DELLA en la cromatina actúan como *enhancers*. Para ello hemos hecho el análisis bioinformático de un ChIP-seq de la proteína DELLA RGA, disponible en el laboratorio, que nos ha permitido averiguar su distribución genómica. Muchos de los picos se encuentran en regiones intergénicas accesibles donde también se recluta la RNA polimerasa II y el complejo MEDIATOR, apuntando a que pueden actuar como *enhancers*. Además, hemos validado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y por expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* un *enhancer* presente en el gen *GID1a*.

## Capítulo 2

# Objetivos

1. Identificación de las regiones genómicas con las que interacciona la proteína DELLA RGA y su distribución mediante el análisis bioinformático de un experimento de ChIP-seq.
2. Caracterización de un posible *enhancer* transcripcional regulado por DELLAs en el promotor del gen *GID1a*.



## Capítulo 3

# Materiales y Métodos

### 3.1. Análisis bioinformático

En este trabajo se ha realizado un análisis bioinformático de un experimento ChIP-seq realizado previamente en el laboratorio. Brevemente, el objetivo de un experimento ChIP-seq es identificar las regiones del genoma con las que interacciona una determinada proteína. Para ello, se realiza un entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas, de manera que se encontraran anclados en los posteriores pasos. A continuación, el genoma se fragmenta empleando ultrasonidos y se inmunoprecipita la proteína de interés, en este caso la proteína GFP-(rga- $\Delta$ 17), empleando anticuerpos que se unen a GFP. De esta manera, se obtienen tanto las proteínas como los fragmentos de ADN anclados a estas. Finalmente, estos fragmentos de ADN se purifican y se secuencian, para posteriormente hacer el análisis bioinformático que permitirá la identificación de estas regiones.

El análisis se dividió en diferentes partes explicadas a continuación.

#### 3.1.1. Preprocesamiento

En primer lugar, se hizo el preprocesamiento de las secuencias, que consistió en un análisis de la calidad de las lecturas. Para ello se empleó el comando FastQC (Andrews y col. 2010) que analiza la calidad por base y por secuencia, el contenido en GC por secuencia, el nivel de duplicaciones y la cantidad de adaptador presente en las secuencias.

#### 3.1.2. Alineamiento

Para el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia, la versión TAIR10 de *Arabidopsis*, fue necesario indexar el genoma empleando el comando bowtie2-build y posteriormente se alinearon con bowtie (Langmead y Salzberg 2012), aplicando los parámetros por defecto. Se obtuvo primero un archivo en formato SAM que luego se comprimió a formato BAM empleando SAMtools view (Li y col. 2009). Posteriormente se ordenaron los alineamientos por coordenada de mapeo con SAMtools sort. Se marcaron los duplicados con PICARD MarkDuplicates (BroadInstitute s.f.) y se filtraron los alineamientos con SAMtools view para eliminar las lecturas no mapeadas, los duplicados marcados previamente y las lecturas que alinean en más de un sitio del genoma y por tanto no se sabe a cuál de ellos pertenece realmente. El archivo BAM se indexó con samtools index.

### 3.1.3. Visualización

Para la visualización de los datos se emplearon diferentes herramientas de deepTools. Se crearon ficheros bigWig normalizados por profundidad de secuenciación a partir de los alineamientos empleando el comando bamCoverage. A partir de estos ficheros se visualizaron los picos de cada una de las réplicas en IGV (Integrative Genome Viewer) (Thorvaldsdóttir, Robinson y Mesirov 2013).

También se representó en un heatmap el enriquecimiento sobre los genes, es decir, se observó en qué zonas de los genes se encuentra la proteína RGA. Para ello fue necesario descargar la anotación del genoma en formato GFF y a partir de este archivo se obtuvo, mediante programación en python3, otro archivo en formato BED que contenía solo la información de los genes. Con este y empleando los comandos computeMatrix scale-regions y plotHeatmap se obtuvo el heatmap (Ramirez y col. 2016).

### 3.1.4. Llamada de picos

Hasta este punto se trabajó con las lecturas, pero en este paso se procedió a la identificación de las regiones donde se acumulan. Para ello se empleó la herramienta MACS2 (J. Feng y col. 2012). Esta herramienta identifica las zonas del genoma con elevada acumulación de lecturas y las compara con la misma zona misma zona en el ChIP control (en nuestro caso una línea no transgénica) y, mediante un análisis estadístico, identifica cuales son los picos reales, es decir, las zonas del genoma que realmente interaccionan con la proteína RGA.

A continuación, se analizó la intersección entre los picos de las diferentes réplicas del experimento empleando bedtools merge (Quinlan y Hall 2010) y python3.

### 3.1.5. Análisis funcionales

Finalmente se realizaron dos análisis funcionales de los datos empleando la herramienta HOMER (Heinz y col. 2010). El primero fue el estudio de la distribución de los picos sobre las diferentes categorías genómicas con AnnotatePeaks.pl: intergénico, promotor distal, promotor proximal, exón, intrón, terminador. El segundo análisis fue la búsqueda de motivos de secuencia enriquecidos en los picos con findMotifsGenome.pl. El análisis se realizó sobre secuencias de 200pb centradas en el punto más alto de los picos.

## 3.2. Material microbiológico

### 3.2.1. *Escherichia coli*

La cepa de *E.coli* empleada en este trabajo fue la cepa TOP10. Se utilizó como medio de producción y almacenamiento de plásmidos.

El método de transformación empleado fue la electroporación. Para ello se añadió 1µl del vector de interés a una alícuota de las células electrocompetentes a 4°C y se introdujo en una cubeta de electroporación estéril, a la que se aplicó una corriente eléctrica de 1500V durante 5ms. Posteriormente se añadieron 400µl de LB líquido sobre las células electroporadas y se recuperó este mismo volumen en un tubo eppendorf de 1,5 ml. La composición del medio LB se indica en la tabla 3.1. Finalmente, se dejaron en agitación a 37°C durante 1 hora.

Pasado este tiempo se vertieron las células sobre una placa de LB sólido con el antibiótico correspondiente. Con la ayuda de un asa de siembra se repartió uniformemente el contenido sobre la superficie de la placa y se dejó crecer durante 24 horas a 37°C.

**Tabla 3.1.** Composición del medio LB empleado para el cultivo de *E.coli* y *A.tumefaciens*.

Ingrediente	gramos/Litro
Triptona	10g
Yeast extract	5g
NaCl	10g
(Agar)	7,5g

### 3.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa empleada fue C58. Se empleó para la transformación de *A. thaliana* y la agroinfiltración de *N. benthamiana*.

El método de transformación empleado fue la electroporación. El procedimiento fue similar al empleado con *E. Coli* pero en este caso la corriente aplicada fue de 1440V, la temperatura de cultivo 28°C y el tiempo de crecimiento en placa o cultivo líquido de 2 días.

Las placas de medio LB (tabla 3.1) debían contener rifampicina y gentamicina para la selección específica de cepa, además de la resistencia para la selección de las células transformadas que dependía del plásmido empleado para la transformación.

## 3.3. Material vegetal

### 3.3.1. *Arabidopsis thaliana*

Se empleó como modelo experimental la accesión Columbia-0 (Col-0). Las plantas se cultivaron en condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad).

La transformación de las plantas se llevó a cabo mediante el método "floral-dip". Para ello, previamente se obtuvo un cultivo de 200 ml de *Agrobacterium* transformada con el plásmido de interés. Las células se recuperaron por centrifugación a 4000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 200 mL de sacarosa al 5% (p/V), al que se añadieron 50µl del agente mojante Silwet-L77 para facilitar la infección por la bacteria. Para la transformación, las plantas fueron sumergidas en la solución bacteriana durante 1 minuto y posteriormente se mantuvieron durante 24 horas en oscuridad. Pasado este tiempo, se dejaron crecer en condiciones normales.

Tras recoger las semillas, estas se dejaron secar durante 2 días a 37°C. Las semillas fueron esterilizadas realizando un primer lavado en una solución de etanol al 70% y 0,05% Triton durante 6 minutos. Esta solución fue retirada y se procedió a un segundo lavado con etanol al 96% durante otros 6 minutos. Las semillas esterilizadas se dejaron secar sobre un filtro en el interior de una cabina de flujo durante 15 minutos y posteriormente fueron repartidas uniformemente sobre placas de medio MS + 1% sacarosa con los agentes de selección higromicina (selecciona las plantas transgénicas) y carbenicilina (elimina los posibles contaminantes de *Agrobacterium* que se arrastran

con las semillas). La composición del medio se indica en la tabla 3.2. Estas placas se estratificaron durante 4 días a 4°C para romper la dormición y sincronizar la germinación. Pasados los 4 días se pasaron a condiciones de cultivo de día largo.

**Tabla 3.2. Composición del medio MS empleado para el cultivo de *A.thaliana*.**

Ingrediente	Cantidad/Litro
MS	2,45g
Sacarosa	10g
(Agar)	8g
pH = 5.7	

Tras la germinación, fueron seleccionadas las plantas transformadas, es decir, aquellas con mejor crecimiento tanto de la parte aérea como de las raíces. Las plantas seleccionadas fueron transferidas a placas con medio MS sin agentes de selección pero con diferentes tratamientos como se indica a continuación.

Los tratamientos en el medio fueron de paclobutrazol (PAC), que bloquea la síntesis de GAs y por el otro lado, el cultivo en presencia de GAs en el medio, además del tratamiento control, que no contenía ninguno de los compuestos. Para la preparación de estas placas se partió de los siguientes stocks: GA<sub>3</sub> 100mM diluido en etanol (EtOH) 70x y PAC 10mM diluido en dimetilsulfóxido (DM-SO). Se prepararon placas con 50 ml de medio MS de manera que en la placa para el control se añadieron 25µl de DMSO y 50µl de EtOH 70x, en la placa para el tratamiento con PAC se añadió 25µl de 10mM PAC y 50µl EtOH 70x y en la placa para el tratamiento con GAs se añadió 25µl de DMSO y 50µl de 100 mM GAs. Las plántulas seleccionadas se dejaron crecer en estas condiciones durante 4 días y posteriormente se realizaron los ensayos GUS como se explica posteriormente en el apartado 3.6 para observar la actividad del promotor en las diferentes condiciones.

### 3.3.2. *Nicotiana benthamiana*

Fueron cultivadas a 22°C bajo condiciones de día largo (16h luz / 8h oscuridad).

Se empleó en ensayos de agroinfiltración para la medida de la expresión de luciferasa bajo el control del *enhancer* estudiado en este trabajo. Para ello, se prepararon cuatro cultivos de *Agrobacterium* que expresaban GAF1, un factor de transcripción que participa en el proceso de señalización de las proteínas DELLA; GAI, que es una proteína DELLA; p19, que es un inhibidor de la represión necesario para la expresión transitoria en *N.benthamiana* o el plásmido Ω2 obtenido mediante GoldenBraid (apartado 3.4.2).

Para el ensayo, se analizaron 4 combinaciones de los elementos anteriores: tres controles que consistieron en (i) solamente con la construcción del *enhancer*, (ii) el *enhancer* y GAF1, (iii) el *enhancer* y GAI y (iv) finalmente la combinación de GAI-GAF1-*enhancer*. En todos los casos, la solución de infiltración contenía MgCl<sub>2</sub> 10mM, MES 0,1µM, acetosiringona 40µg/ml y p19 0,01 OD. GAF1 y GAI se emplearon a 0,1 OD y el *enhancer* a 0,05 OD. Se realizaron tres réplicas de cada combinación de elementos.

La recogida de las muestras se realizó 3 días después de la infiltración.

## 3.4. Clonación

### 3.4.1. Gateway

Para la preparación de las diferentes construcciones con el gen testigo GUS se empleó el sistema Gateway. Este sistema consta de una serie de plásmidos con sitios de recombinación determinados que permiten la inserción orientada de un fragmento de ADN en el plásmido de interés. El proceso está resumido en la figura 3.1. En primer lugar, se debe obtener el fragmento de interés flanqueado por las secuencias attB1 y attB2. En este trabajo se obtuvieron mediante PCR los fragmentos pGID1a, pGID1a-intron y pGID1a- $\Delta$  *enhancer*, empleando los cebadores que aparecen en la tabla 3.3. Estos cebadores alinean con la secuencia de interés y además contienen los sitios de recombinación necesarios. Además, la empresa IDT (Behlke y Devor 2005) nos sintetizó dos fragmentos de ADN que contienen la secuencia del *enhancer* que estamos estudiando en las dos orientaciones posibles, junto al promotor mínimo 35S y un potenciador de la traducción, flanqueados en ambos casos por las secuencias de recombinación.

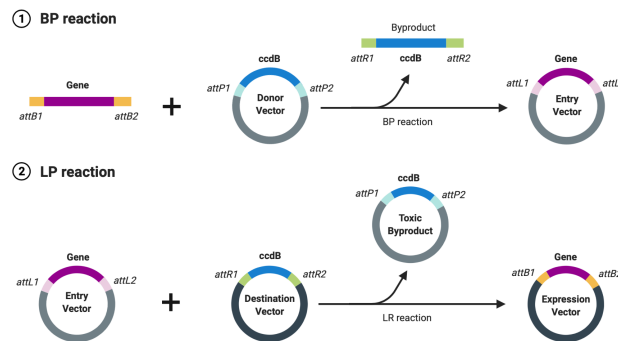


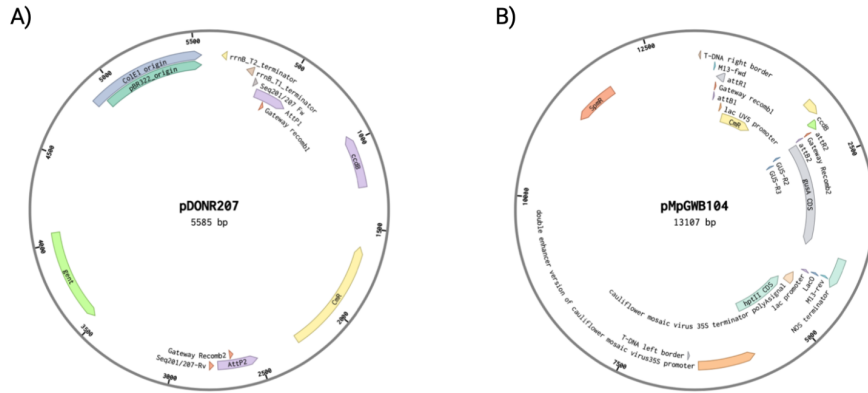
Figura 3.1. Esquema del sistema clonación Gateway.

Tabla 3.3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de las diferentes construcciones del promotor del gen *GID1a*.

Nombre	Secuencia
pGID1a_F_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCAGACTCTCT AATGACTTTGTAGC
pGID1a_R_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCAGCCATTT TGATAAATCC
pGID1a_R_intron_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAGGAACCACTGT CTGCATCAAACC
delta_RGA_peak_F	CTATATATCTAACTCGGAACTCTTCAAATATTTA
delta_RGA_peak_R	AACAAAATCAAACCTACAATCACATCCTAGCG

Tras la obtención de los fragmentos con los sitios de recombinación, se lleva a cabo la reacción BP con un vector donante o pDONR y la enzima BP clonasa. En este trabajo se empleó el pDONOR207 siguiendo el protocolo recomendado (Invitrogen User Manual 2003). Este vector contiene los sitios attP1 y attP2 que recombinan con los sitios attB1 y attB2 respectivamente, dando lugar a un pENTR que contiene el fragmento de interés flanqueado por los sitios attL1 y attL2. A continuación, se lleva a cabo la reacción LR con la enzima LR clonasa, en la que estos sitios attL1 y attL2 recombinan con los sitios attR1 y attR2 presentes en un vector destino, que en este trabajo fue el





**Figura 3.2. Vectores empleados para la clonación empleando el sistema Gateway. (A) Vector donante o pDONR207. (B) Vector destino o pDEST pMpGWB104.**

vector pMpGWB104, que contiene el gen reportero GUS. Finalmente, el vector obtenido contiene el fragmento genómico de interés frente a GUS.

Todos los vectores se produjeron en *E. coli*, como se explica en el apartado 3.2.1. Como puede observarse en la figura 3.2 el pDONR207 contiene el gen de resistencia a gentamicina y el vector pMpGWB104 el gen de resistencia a espectinomicina, por tanto, estos fueron los agentes de selección empleados. Tras la selección de las células transformadas y la extracción de ADN plasmídico, todas las construcciones fueron comprobadas mediante análisis de restricción. Además, algunos de ellos fueron secuenciados, como se explica en el apartado 3.5.

Los vectores finales se emplearon para transformar primero *Agrobacterium* (apartado 3.2.2) y finalmente obtener plantas de *A.thaliana* transformadas (apartado 3.3.1).

### 3.4.2. Goldenbraid

Para la construcción del *enhancer* con luciferasa se empleó el sistema GoldenBraid (Sarrion-Perdigones y col. 2013). Este se resume en la figura 3.3. Como el sistema anterior, también consta de una serie de plásmidos que permiten la inserción de los diferentes fragmentos de interés en un orden y orientación determinados. El proceso consta de diversos pasos de restricción-ligación, por lo que cada reacción contiene la enzima correspondiente (BsaI o BsmBI) y T4 ligasa. Las diferentes reacciones contenían, en todos los casos, 20 fmol del vector vacío y 40 fmol de cada uno de los insertos. En cada uno de los pasos, los fragmentos quedan flanqueados por unas secuencias de cuatro bases que constituyen la gramática necesaria para determinar el orden en el que se van a ensamblar en el siguiente plásmido.

En primer lugar, se obtuvo el fragmento genómico de interés domesticado. La domesticación consiste en ampliaciones por PCR con cebadores diseñados para la adición de los extremos necesarios para la inserción en el plásmido y la eliminación de los sitios de corte de las enzimas de restricción que se van a emplear durante el proceso de clonación.

El primer paso del ensamblaje consistió en introducir la secuencia del *enhancer* en un vector pUPD2 (GB0307). A continuación, se unieron los insertos de tres vectores pUPD2 en un vector alpha2 (GB0017), cortando con la enzima BsaI. Los vectores pUPD2 contenían el *enhancer* A1-B2, el gen de la luciferasa B3-B5 (GB0096) y el terminator tnos B6-C1 (GB0037). Este vector alpha2

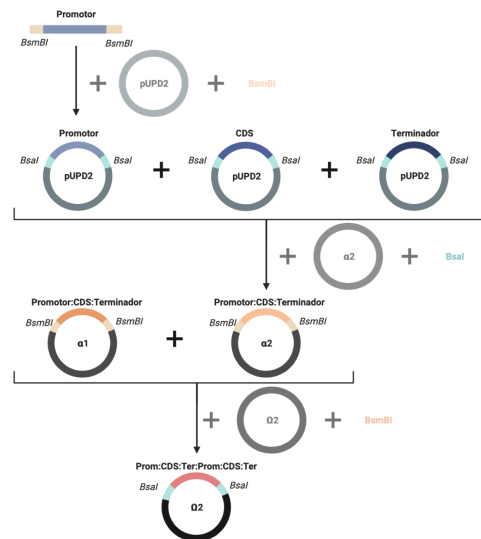


Figura 3.3. Esquema del sistema de clonación Golden Braid.

se combinó con un vector alpha1 (GB0109) que contiene el promotor 35S, el gen de renilla y el terminador tnos en un vector omega2 (GB0021) en una reacción con la enzima BsmBI.

### 3.5. Secuenciación

Para comprobar que la secuencia insertada en los plásmidos no contenía errores introducidos durante la amplificación por PCR, se secuenciaron empleando los cebadores recogidos en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Oligonucleótidos empleados para secuenciación.

Nombre	Secuencia
pGID1a_F_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCAGACTCTCTA ATGACTTTGTAGC
pGID1a_F_1	GTACGCTAGGATGTGATTGTAGG
pGID1a_F_2	GATAGGGACTGGTGAGGTGATCAA
pGID1a_F_3	CCGTCAGTCGTACACATACTG
pGID1a_F_4	GCAGAGTGATTCTACCGTTCTACG
pGID1a_F_5	CAACTCGAATAAGCATAGTATTGATC
pGID1a_F_6	CACTCAACCATTAACCCATT
pGID1a_F_7	GATTGGGTTACAAATTGAAAGCTTTAGG
GUS_rv	ATTTACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACGT
pCambia_F	GGTGGCAGGATATATTGTGG
pCambia_R	CGCCCTTTTAAATATCCGAAT

En la tabla 3.5 se encuentran los plásmidos y los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de cada uno de ellos. .

Tabla 3.5. Plásmidos secuenciados y los oligonucleótidos empleados para cada uno de ellos.

Plásmido	Cebadores
pEXPR gBlock	GUS_rv
pEXPR gBlock_rev	GUS_rv
pENTR pGID1a	pGID1a_F_attB1, pGID1a_F_1, pGID1a_F_2, pGID1a_F_3, pGID1a_F_4, pGID1a_F_5, pGID1a_F_6
pENTR pGID1a_intron	pGID1a_F_attB1, pGID1a_F_1, pGID1a_F_2, pGID1a_F_3, pGID1a_F_4, pGID1a_F_5, pGID1a_F_6, pGID1a_F_7
pENTR pGID1a_Δ	pGID1a_F_attB1, pGID1a_F_1, pGID1a_F_3, pGID1a_F_4, pGID1a_F_5, pGID1a_F_6, pGID1a_F_7
Ω2 ren:luc	pCambia_F, pCambia_R, pGID1a_F_2

### 3.6. Ensayo GUS

Para comprobar la actividad del promotor en las condiciones descritas en el apartado 3.3.1 se realizó la tinción GUS. Para ello, en primer lugar, se incubaron las plántulas con acetona fría durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró la acetona y se incubó con las soluciones descritas en la tabla 3.6 Primero con la solución 1 durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y después con la solución 2, que contiene el sustrato de GUS X-Gluc y se aplicó vacío durante 5 minutos. Tras ello, las plantas se incubaron a 37°C en oscuridad, comprobando si aparecía coloración azul cada 15 minutos.

Tabla 3.6. Soluciones empleadas para la tinción GUS.

\* X-Gluc preparado a partir de 100mg diluidos en 2ml de DMSO.

\*\* Buffer Phosphate 100mM preparado con  $NaH_2PO_4$  0.2M y  $Na_2HPO_4$  0.2M en agua.

Compuesto	Solución1	Solución2
Triton 100X	250µl	250µl
Potassium Ferrocyanide 100 mM	250µl	250µl
Potassium Ferricianide 100 mM	250µl	250µl
** Buffer Phosphate 100mM pH 7.2	12,5ml	12,5ml
$dH_2O$	11,75ml	11,5ml
* X-Gluc	-	250µl
VOLUMEN TOTAL	25ml	25ml

Tras la aparición de la coloración azul en las plántulas, se realizaron dos lavados consecutivos de 30 minutos con etanol. Primero con EtOH 30% y a continuación con EtOH 50%. Finalmente se almacenaron en EtOH 70% a 4°C.

### 3.7. Ensayo Luciferasa

Para medir la actividad de luciferasa tras la agroinfiltración de *N.benthamiana* se obtuvieron 3 réplicas por condición y se siguió el protocolo Dual-Glo (Promega). Primero se recogieron las muestras y se congelaron en  $N_2$  (l). Se llevó a cabo una extracción en la que se machacaron las muestras, se añadieron 150µl de tampón de lisis pasiva 1x a cada una y se mezcló empleando un vórtex. Esta solución se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a máxima potencia. A continuación,

se introdujeron 3 $\mu$ l de esta solución en pocillos de la placa de lectura junto a 40 $\mu$ l de la solución de luciferina, que es el sustrato de la luciferasa. La placa se mantuvo 10 minutos en oscuridad y se midió la actividad en un luminómetro. Tras la medida, se añadió a cada muestra 40 $\mu$ l de una solución con coelenteracina, que es el sustrato de la renilla, 1x diluido en la solución Stop&Glo que detiene la actividad luciferasa. Se dejó incubar de nuevo 10 minutos en oscuridad y se midió la actividad en el luminómetro.

Las condiciones del luminómetro fueron tiempo de integración 10 segundos, 3 lecturas y periodo de 2 minutos.



# Capítulo 4

## Resultados y Discusión

### 4.1. Análisis bioinformático ChIP-seq

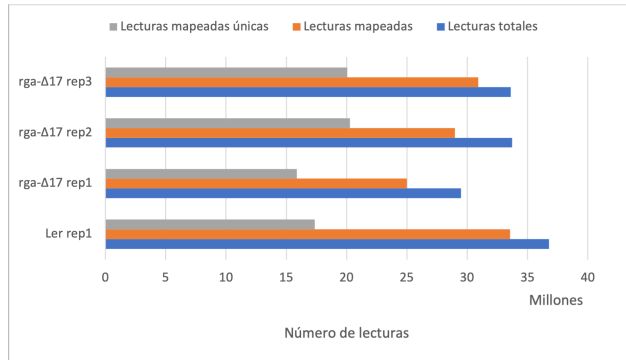
En el laboratorio se había realizado un experimento ChIP-seq para determinar la distribución genómica de la proteína DELLA RGA. Para ello se empleó una línea transgénica de *Arabidopsis* que expresaba una versión de RGA, GFP-(rga- $\Delta$ 17), que es resistente a la degradación inducida por GAs y, por tanto, más estable. La causa de esta ganancia en estabilidad es que esta versión mutante de RGA tiene una delección en pauta de 17 aminoácidos que incluye el motivo DELLA, necesario para la interacción con el receptor cargado con GAs (Dill, Jung y T.-p. Sun 2001). La proteína de fusión está controlada bajo el promotor endógeno de RGA. En caso de haber empleado una línea WT RGA debería haberse realizado el experimento con plantas cultivadas con PAC, que bloquea la síntesis de GAs y por tanto promueve la acumulación de la proteína DELLA.

Para encontrar las dianas genómicas de RGA, hemos realizado el análisis bioinformático del experimento de ChIP-seq, como se explica en el apartado 3.1, y cuyos resultados se muestran a continuación.

En primer lugar, se analizó la calidad de las lecturas que nos enviaron de la Unidad de Genómica del Centre de Regulació Genòmica (Barcelona), donde se hizo la secuenciación. Se pudo comprobar que su calidad media era superior al valor umbral 30 (Phred Score) y que el porcentaje de lecturas con adaptador era prácticamente de 0. Por tanto, no fue necesario recortar las bases de baja calidad o los adaptadores (Anexo 1-4).

En segundo lugar, se alinearon las lecturas contra el genoma de referencia, la versión TAIR10 de *Arabidopsis*. La tasa de alineamiento de las lecturas fue muy buena, de media el 88,47% de las lecturas mapearon en alguna posición del genoma. Se descartaron las lecturas duplicadas y las que mapean en múltiples posiciones para minimizar el enriquecimiento debido a cuestiones técnicas. Después de filtrar los alineamientos, en total quedaron aproximadamente 18 millones de lecturas en cada réplica, que es una cantidad adecuada para la detección de picos (Figura 4.1).

A continuación, pasamos a determinar en qué zonas del genoma se acumula RGA. Para ello observamos dónde había enriquecimiento de las lecturas de la cromatina inmunoprecipitada de la línea transgénica respecto al control no transgénico. Los resultados los representamos en un “heatmap” (figura 4.2), donde se observó que las lecturas se acumulan preferentemente en los inicios de la transcripción de los genes (TSS, Transcription Start Site). Empleando la herramienta MACS2 se identificaron los picos presentes en cada una de las réplicas. Los resultados fueron: 8.884



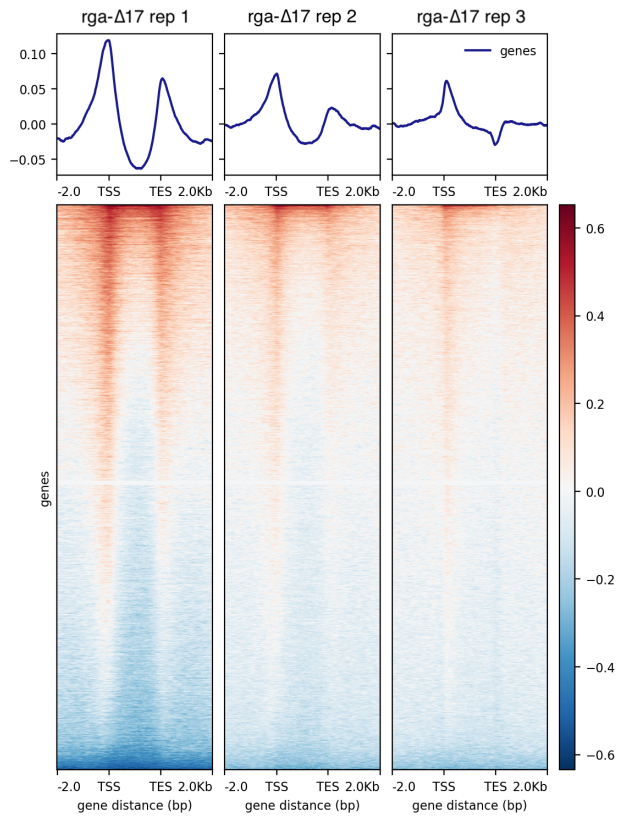
**Figura 4.1. Número de lecturas de cada réplica.** Numero de lecturas de cada una de las réplicas del experimento ChIP-seq. Se muestra el número de lecturas totales (azul), mapeadas (naranja) y mapeadas únicas (gris) en millones.

picos en la réplica 1, 3.615 en la réplica 2 y 2.018 en la réplica 3. Debido a las diferencias entre ellas, se seleccionaron aquellos picos presentes en al menos 2 de las 3. La intersección entre las diferentes réplicas se puede observar en la figura 4.3.

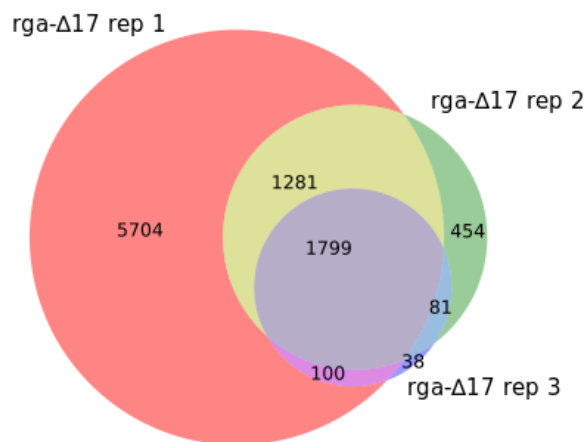
La identificación de los picos permitió analizar con mayor precisión su distribución sobre las diferentes categorías genómicas. Esta distribución se puede observar en la figura 4.4. Esto confirma que la mayoría de los picos se encuentran en una zona promotora, cercana al TSS, definida como la región entre -1 kb y 100 pb del TSS (49.13%). Las siguientes categorías en cuanto a abundancia de picos son: intergénicos (18.68%), terminador, definido entre -100 pb y 1 kb desde el lugar de terminación de la transcripción o TTS (18.64%), exón (9.84%) e intrón (3.71%). Esta distribución es similar a la descrita previamente por nosotros para la versión silvestre RGA (Marín-de la Rosa y col. 2015) y también para otro ChIP en que emplearon la misma línea que expresa rga-Δ17 (Serrano-Mislata y col. 2017). No obstante, el número de picos es mayor en nuestro caso. Una razón para el mayor número de picos es que en nuestro caso realizamos doble entrecruzamiento con formaldehído y EGS para unir las proteínas a la cromatina de manera covalente, frente a un entrecruzamiento estándar solo con formaldehído en los otros dos. En el caso del ChIP con RGA, también puede haber contribuido una menor acumulación de la proteína, a pesar de que las plántulas estaban tratadas con PAC. Además, Serrano-Mislata y colaboradores emplearon inflorescencias como material de partida, frente a plántulas en nuestro caso, lo que también puede haber contribuido a que el número de picos, pero no la distribución, sea diferente.

Como he indicado en la Introducción, las proteínas DELLA son reguladores transcripcionales que no tienen ningún dominio reconocible de unión a ADN, y de hecho, el consenso en el campo es que no son capaces de unirlo directamente. No obstante, sí pueden ser reclutadas a la cromatina mediante la interacción con TFs. Para identificar los posibles TFs que median la unión a las zonas identificadas en nuestro ChIP-seq, se realizó un análisis de enriquecimiento en elementos cis sobre los picos seleccionados empleando la herramienta HOMER (Heinz y col. 2010). Se encontraron múltiples motivos de ADN significativamente enriquecidos. Entre ellos, los cinco cuya secuencia tiene mayor similitud a la de elementos cis previamente caracterizados se muestran en la tabla 4.1. Los dos primeros son característicos de los factores de transcripción IDD y TCP. Esto apoya la calidad del experimento de ChIP-seq, dado que varios miembros de ambas familias se han descrito como interactores de RGA (Fukazawa, Teramura y col. 2014; Davière, Wild y col. 2014; Resentini y col. 2015). Al menos en el caso del IDD, la interacción con la DELLA ocurre en el contexto de la cromatina (Fukazawa, Teramura y col. 2014). En el caso de los TCPs, a pesar de que en los casos descritos la interacción de la DELLA evita la unión al ADN del TF, es posible que no ocurra lo mismo con otros miembros de la familia y que la interacción ocurra en la cromatina.

Los scripts empleados durante el análisis se muestran en el anexo.

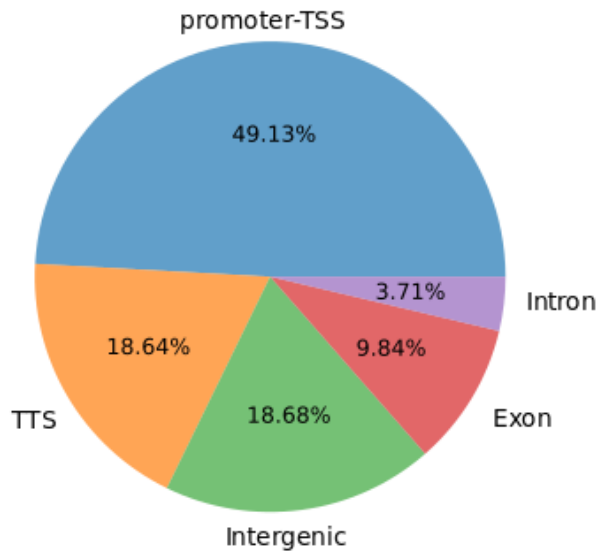


**Figura 4.2. Distribución genómica de RGA en los genes.** Heatmap que muestra el enriquecimiento de cada una de las réplicas del ChIP-seq, medido como el ratio entre lecturas de ChIP de las líneas transgénicas y del control no transgénico en escala logarítmica. El rojo indica acumulación de lecturas del ChIP, el blanco igualdad respecto al control y el azul disminución.



**Figura 4.3. Comparación del número de picos entre las distintas réplicas.** Número de picos detectados en cada una de las réplicas del ChIP y la intersección entre ellas. El área que ocupa cada círculo es proporcional al número de picos.





**Figura 4.4. Distribución de picos por regiones génicas.** Porcentaje de picos que se encuentran en las regiones promotora, las regiones terminadoras, los exones e intrones de los genes y las regiones intergénicas. Los porcentajes corresponden a los picos presentes en al menos 2 de las 3 réplicas.






## 4.2. Caracterización de un *enhancer* transcripcional del gen *GID1a*

La distribución de picos indicaba un número importante en regiones promotoras e intergénicas. Esas regiones, lejos del TSS, son candidatas a actuar de *enhancers* transcripcionales, puesto que las DELLA actúan como activadores de la transcripción (Hernández-García y col. 2019). En el laboratorio se había determinado por ChIP-seq la distribución genómica de la RNAPII y cómo se ve afectada por un tratamiento con GAs que degrada a las proteínas DELLA. Al comparar en el visualizador IGV los picos de ambos ChIPs con el de rga- $\Delta$ 17, observamos que la práctica totalidad de los picos de la DELLA coincidían con un pico de la polimerasa, y que en muchos casos este pico se veía reducido en las plántulas tratadas con GAs (ver el ejemplo de *GID1a*, Figura 4.5). Esta observación es compatible con la idea de que las DELLA se unen a regiones que actúan de *enhancers*, reclutando la maquinaria de transcripción. De hecho, esos mismos picos coinciden con regiones de la cromatina abiertas, determinadas por otros mediante ATAC-seq (Potok y col. 2019) y con la acumulación del complejo MEDIATOR, que participa en el reclutamiento de la polimerasa (Q. Liu y col. 2020).

Para probar nuestra hipótesis, prestamos atención a los genes relacionados con la vía de GAs. En particular en aquellos genes que están sujetos a regulación "feedback" que hace que su expresión se promueva directamente por las proteínas DELLA, como son los genes de biosíntesis GA20ox, GA3ox y los genes *GID1*. Entre ellos, se detectó un pico de RGA en la región promotora del gen *GID1a*. Como se puede observar en la 4.5 A, este pico coincide con un pico de la RNAPII, con un pico de MED12 y un pico de ATAC-seq, que indica que esa región de la cromatina está accesible. El pico de RNAPII es más pequeño en la condición de tratamiento con GAs (hace que haya menos proteínas DELLA), lo que indica que la RNAPII se recluta menos al promotor y por tanto se esperan niveles menores de transcripción. De hecho, se observa que la ocupación de la polimerasa en el cuerpo del gen es menor tras el tratamiento con GAs.

En la figura 4.5 B se representa un zoom-in en la región de *GID1a* de los resultados no publicados de un experimento Hi-C llevado a cabo por nuestro colaborador el Dr Moussa Benhamed (IPS2, París, Francia). Esta técnica desarrollada recientemente permite identificar interacciones entre diferentes zonas de la cromatina. La estructura del gen *GID1a* consiste en dos exones separados por

**Tabla 4.1. Tabla de motivos enriquecidos en las regiones de unión de RGA.** Cinco motivos de ADN significativamente enriquecidos en los picos de RGA detectados por ChIP-seq. Para cada uno se indica la significatividad (P-valor), el porcentaje de picos que lo contienen, el logo de la secuencia, el nombre del factor de transcripción cuyo motivo es más similar y el valor de similitud a este. En los logos de los motivos, cada base presenta una altura proporcional a su frecuencia.

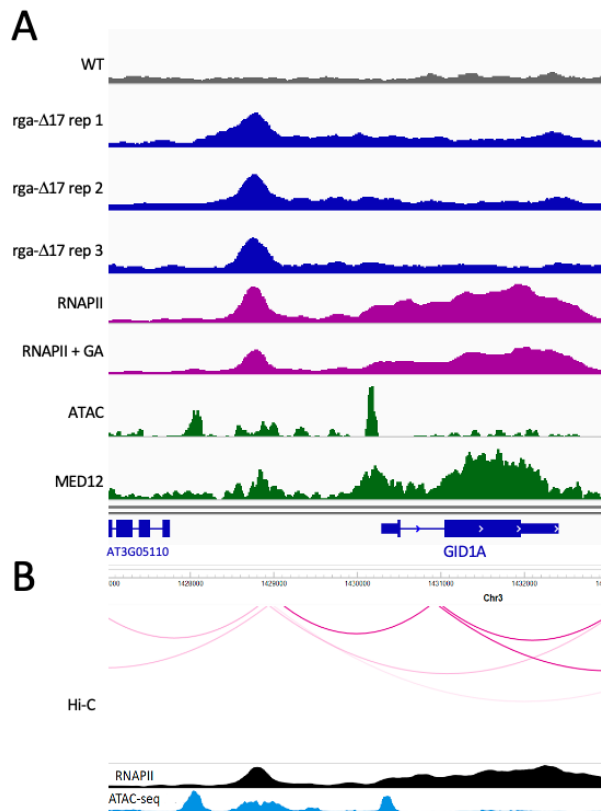
Motivo	P-valor	Dianas (%)	Logo	Motivo similar	Similitud
1	1e-288	46,88		IDD7	0,99
2	1e-258	29,82		TCP16	0,83
3	1e-129	27,76		BIM2	0,95
4	1e-47	27,42		GAGA-repeat	0,81
5	1e-24	27,45		ATHB53	0,94

un intrón. Este análisis muestra que existe interacción entre la región promotora y el intrón del gen *GID1a*. Este resultado podría indicar que el intrón también participa en la regulación de la expresión. En la figura también se muestra el alineamiento con un pico de RNAPII y un región accesible identificada por ATAC-seq.

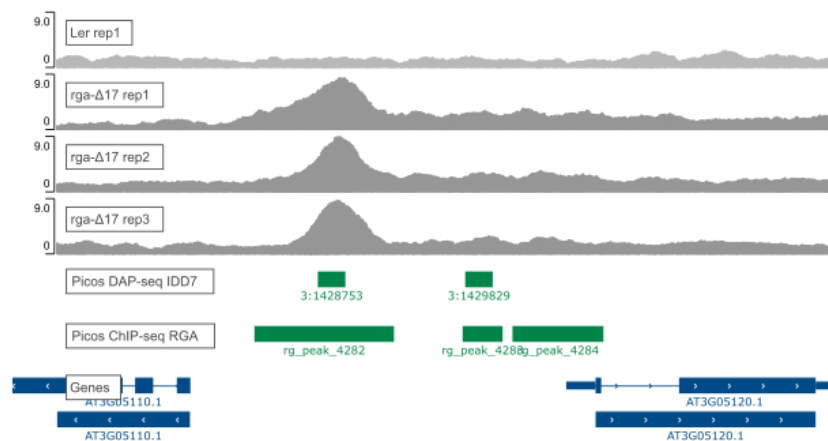
También descargamos datos de un experimento de DAP-seq (O'Malley y col. 2016) que es una técnica que permite encontrar los lugares de unión de factores de transcripción recombinantes a escala genómica. La comparación de los datos de DAP-seq con los picos de RGA permitió observar co-localización de zonas de unión de factores de transcripción IDD con los picos de RGA. El punto más alto del pico de RGA situado en el promotor de *GID1a* coincide con la presencia del motivo de los IDDs (Figura 4.6), por lo que es probable que alguno de ellos medie el reclutamiento de RGA y participe en la regulación de *GID1a*.

Estos resultados apuntan a que la región unida por RGA puede actuar de *enhancer* transcripcional, formando un lazo con el intrón, que está justo después del TSS. Para probar esta hipótesis, diseñamos varias construcciones que tenían diferentes versiones del promotor de *GID1a* 4.7. Todas ellas las fusionaríamos al gen testigo GUS para su análisis en plantas transgénicas de *Arabidopsis* tipos de experimentos en plantas, mientras que algunas también las fusionaríamos al testigo LUCIFERASA para su análisis por expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

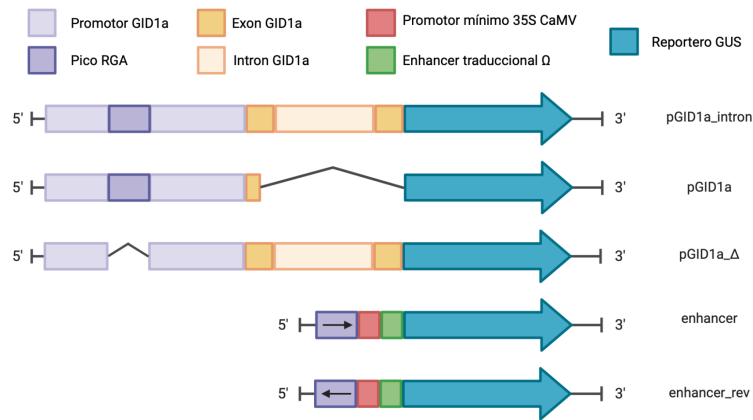
Las construcciones con GUS se muestran en la figura 4.7. La primera de ellas incluye desde 2,6 kb aguas arriba del TSS de *GID1a* hasta el inicio del segundo exón del gen. La segunda construcción se diseñó con el objetivo de estudiar la importancia del intrón en la regulación del gen, de manera que incluye tan solo la región seleccionada del promotor y no el intrón. Para estudiar la relevancia de la región unida por RGA, la tercera construcción incluye el intrón, pero no la región del promotor correspondiente al pico de RGA. Finalmente, se clonó tan solo la zona de aproximadamente 550 pb que corresponde a este pico, para ver si es suficiente para conferir regulación por DELLAs. Este fragmento también se clonó en la orientación reversa, pues se ha visto en animales que los *enhancers* actúan independientemente de su orientación. Estas construcciones incluyen además el promotor mínimo 35S y el potenciador traduccional omega. Hemos transformado *Arabidopsis* con todas las construcciones, aunque solo hemos tenido tiempo de seleccionar aquellas transformadas con el *enhancer* en ambas orientaciones. La tinción GUS se hizo con plántulas transformantes primarias



**Figura 4.5. RGA colocaliza con la RNAPII.** (A) Captura de pantalla de IGV mostrando la colocalización del pico de RGA (las tres réplicas en azul y el control no transgénico en gris) cercano al promotor de *GID1a* con picos de RNAPII en presencia y ausencia de GAs (morado), cromatina accesible (ATAC-seq) y MED12 (verde). (B) Representación de los datos de un experimento Hi-C que permite identificar interacciones entre diferentes regiones de la cromatina. La intensidad del color de las líneas es directamente proporcional a la fuerza de las interacciones.



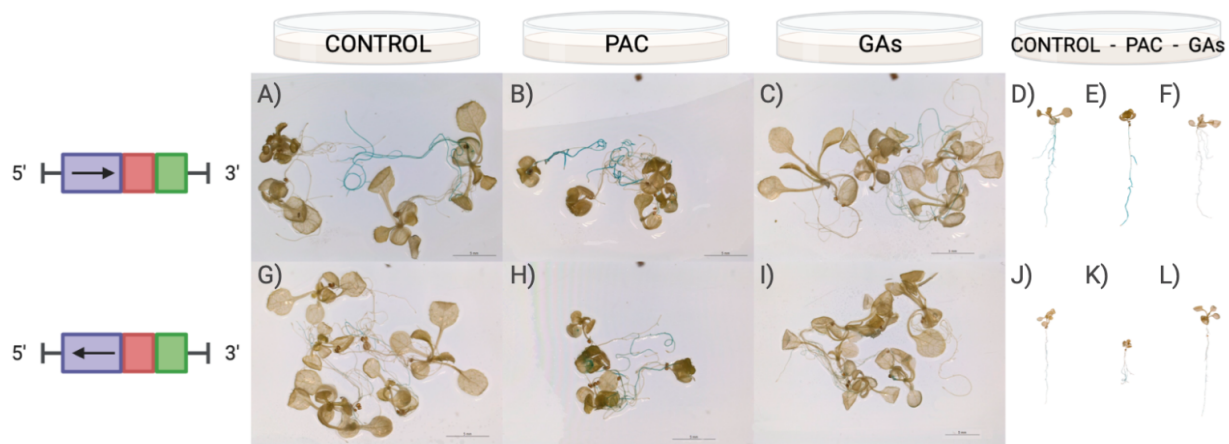
**Figura 4.6. Colocalización del pico de RGA y del sitio de unión de IDD7 en el promotor de *GID1a*.** Captura de pantalla de IGV mostrando la coincidencia del motivo de IDD y el pico de RGA en el promotor de *GID1a*. Se muestran las tres réplicas del ChIP-seq de *rga-Δ17* (gris oscuro) y el de la línea control no transgénico (gris claro) junto a las regiones identificadas como picos de RGA y picos de DAP-seq de IDD7 (verde).



**Figura 4.7. Construcciones del promotor de *GID1a* frente al gen reportero GUS.** Las construcciones incluyen (pGID1a-intron) desde 2,6kb aguas arriba del TSS de *GID1a* hasta el inicio del segundo exón, (pGID1a) desde 2,6kb aguas arriba del TSS hasta el inicio del primer exón, (pGID1a-Δ) mismo fragmento que en pGID1a-intron pero sin la región correspondiente al pico de la proteína RGA en el ChIP, (enhancer) la región de aproximadamente 550pb correspondiente al pico de RGA en el ChIP en orientación forward seguida de el promotor mínimo 35S y el *enhancer* traduccional omega y (enhancer\_rev) la misma construcción que en (enhancer) pero con el fragmento genómico del promotor de *GID1a* en orientación reverse.

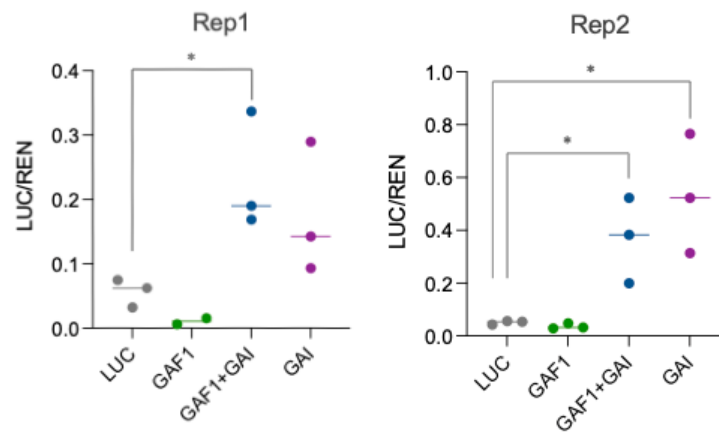
cultivadas en medio de selección durante una semana y a continuación transferidas por cuatro cinco días a medio con diferentes tratamientos: control, PAC y GAs.

Los resultados de la tinción (figura 4.8) muestran que el fragmento de 550 pb correspondiente al pico de RGA es suficiente para actuar como *enhancer* en respuesta a DELLAs. Se observa como en las condiciones control se expresa GUS, provocando coloración azul, especialmente en las raíces. Pero lo que es más importante, esta coloración es más intensa en las plántulas que proceden del tratamiento con PAC (causa la acumulación de proteínas DELLA), mientras que en las plántulas procedentes del tratamiento con GAs (provoca la degradación de las proteínas DELLA) no se observa coloración. Además, la respuesta es más intensa en las plántulas transformadas con el *enhancer* en sentido directo, que es la orientación en la que se encuentra en el genoma.



**Figura 4.8. Resultados de la tinción GUS en plántulas de *Arabidopsis*.** (A-F) Plántulas transformadas con el *enhancer* en orientación forward. (G-L) Plántulas transformadas con el *enhancer* en orientación reverse. (A,D,G,J) Tratamiento control. (B,E,H,K) Tratamiento con PAC. (C,F,I,L) Tratamiento con GAs.

La capacidad de este fragmento para actuar como *enhancer* la probamos de manera alternativa en un ensayo de transactivación en hojas de *N. benthamiana*. Para ello clonamos el fragmento frente al gen LUC y medimos la actividad del promotor tras expresión transitoria de la proteína DELLA YFP-GAI. Empleamos esta proteína en lugar de RGA puesto que es más estable en los ensayos en *N. benthamiana*. El mecanismo de acción de GAI y RGA es probablemente el mismo, puesto que GAI también promueve la expresión de *GID1a* (Griffiths y col. 2006) y comparte la gran mayoría de interactores con RGA (Lantzouni y col. 2020). Además, también probamos la hipótesis de que el TF GAF1 media la acción de las DELLA en el promotor de *GID1a*. Esto se basa en que (i) pertenece a la familia de los IDD, que son interactores de DELLAS; (ii) se ha identificado su sitio de unión de IDD enriquecido en los picos de RGA, y (iii) se ha detectado unión de IDD7 en el promotor de *GID1a* en el mismo sitio que RGA en un ensayo DAP-seq (Niwa 2018). Para ello también expresamos HA-GAF1 junto al testigo, con o sin co-expresión de YFP-GAI. Se realizaron dos réplicas técnicas del experimento.



**Figura 4.9.** Gráfico que muestra los datos de luminiscencia obtenidos tras el ensayo del de infiltración en *N. benthamiana*. Se representa los valores normalizados calculados como ACTIVIDAD LUCIFERASA/ACTIVIDAD RENILLA. Se representan 2 réplicas del experimento y 4 combinaciones de elementos en cada una: control negativo LUC (gris), GAF1, GAF1+GAI y GAI, donde GAF1 es un factor de transcripción de la familia IDD y GAI es una proteína DELLA. \* $p < 0,05$ , Student's t-test.

En ambas réplicas se observó valores de LUC cercanos a cero cuando se expresó el vector testigo solo (gris) o con el TF GAF1 (verde). Estos resultados son esperables, pues GAF1 por sí solo no tiene capacidad de activar la transcripción (Fukazawa, Teramura y col. 2014). En cambio, la expresión de YFP-GAI, con o sin HA-GAF1 (azul y morado, respectivamente) sí causó un aumento de los valores de luminiscencia significativo en ambas réplicas. Estos resultados no permiten concluir que GAF1 media la acción de las DELLA sobre el promotor de *GID1a*, pero sí, y esto es importante, que este fragmento por sí solo es capaz de conferir regulación por DELLA, ya que YFP-GAI fue capaz de activar la transcripción, a pesar de que no tiene capacidad de unir ADN directamente. Estos resultados pueden deberse a que TFs de *N. benthamiana* sean capaces de interactuar tanto con la proteína GAI como con el *enhancer* de *GID1a*.

## Capítulo 5

# Conclusiones

1. El regulador transcripcional RGA interacciona principalmente con las regiones promotoras de los genes.
2. Las regiones de unión de RGA están enriquecidas en elementos cis de TF de las familias IDD y TCP, por lo que estos probablemente median la unión de las DELLA a esos sitios.
3. La región de unión de RGA al promotor de *GID1a* es suficiente para conferir regulación por DELLAs, por lo que probablemente actúa como un *enhancer* transcripcional de este gen.



# Bibliografía

- Andrews, Simon y col. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*.
- Behlke, Mark A y Eric J Devor (2005). «Chemical synthesis of oligonucleotides». En: *Integrated DNA Technologies*.
- BroadInstitute (s.f.). *PICARD*. URL: <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
- Davière, Jean-Michel y Patrick Achard (2016). «A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals». En: *Molecular plant* 9.1, págs. 10-20.
- Davière, Jean-Michel, Michael Wild y col. (2014). «Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height». En: *Current Biology* 24.16, págs. 1923-1928.
- De Lucas, M y JM Daviere (2008). «Rodríguez-Falcó n». En: *M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, JM, Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, MA, Titarenko, E., and Prat, S*, págs. 480-484.
- Dill, Alyssa, Hou-Sung Jung y Tai-ping Sun (2001). «The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.24, págs. 14162-14167.
- Dill, Alyssa y Tai-ping Sun (2001). «Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana». En: *Genetics* 159.2, págs. 777-785.
- Dill, Alyssa, Stephen G Thomas y col. (2004). «The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation». En: *The Plant Cell* 16.6, págs. 1392-1405.
- Feng, Jianxing y col. (2012). «Identifying ChIP-seq enrichment using MACS». En: *Nature protocols* 7.9, págs. 1728-1740.
- Fukazawa, Jutarou, Takeshi Ito y col. (2015). «Binding of GID1 to DELLAs promotes dissociation of GAF1 from DELLA in GA dependent manner». En: *Plant signaling & behavior* 10.10, e1052923.
- Fukazawa, Jutarou, Hiroshi Teramura y col. (2014). «DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in Arabidopsis». En: *The Plant Cell* 26.7, págs. 2920-2938.



- Gallego-Bartolomé, Javier, Eugenio G Minguet, Federico Grau-Enguix y col. (2012). «Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.33, págs. 13446-13451.
- Gallego-Bartolomé, Javier, Eugenio G Minguet, Jaime A Marm y col. (2010). «Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis». En: *Molecular biology and evolution* 27.6, págs. 1247-1256.
- Griffiths, J y col. (2006). «p, Thomas SG. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis». En: *The Plant Cell* 18.12, págs. 3399-414.
- Guillotín, Bruno y Kenneth D Birnbaum (2020). «Just passing through: The auxin gradient of the root meristem». En: *Current Topics in Developmental Biology* 137, págs. 433-454.
- Hauvermale, Amber L, Tohru Ariizumi y Camille M Steber (2012). «Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression». En: *Plant physiology* 160.1, págs. 83-92.
- Hedden, Peter y Andrew L Phillips (2000). «Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes». En: *Trends in plant science* 5.12, págs. 523-530.
- Heinz, Sven y col. (2010). «Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities». En: *Molecular cell* 38.4, págs. 576-589.
- Hernández-García, Jorge y col. (2019). «Origin of gibberellin-dependent transcriptional regulation by molecular exploitation of a transactivation domain in DELLA proteins». En: *Molecular Biology and Evolution* 36.5, págs. 908-918.
- Hussain, Alamgir y Jinrong Peng (2003). «DELLA proteins and GA signalling in Arabidopsis». En: *Journal of Plant Growth Regulation* 22.2, págs. 134-140.
- Invitrogen User Manual, C (2003). *Gateway® Technology. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems.*
- Koornneef, M y JH Van der Veen (1980). «Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) heynh.» En: *Theoretical and Applied genetics* 58.6, págs. 257-263.
- Langmead, Ben y Steven L Salzberg (2012). «Fast gapped-read alignment with Bowtie 2». En: *Nature methods* 9.4, págs. 357-359.
- Lantzouni, Ourania y col. (2020). «GROWTH-REGULATING FACTORS interact with DELLAs and regulate growth in cold stress». En: *The Plant Cell* 32.4, págs. 1018-1034.
- Lee, Sorcheng y col. (2002). «Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition». En: *Genes & development* 16.5, págs. 646-658.

- León, José y José J Sánchez-Serrano (1999). «Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants». En: *Plant physiology and Biochemistry* 37.5, págs. 373-380.
- Li, Heng y col. (2009). «The sequence alignment/map format and SAMtools». En: *Bioinformatics* 25.16, págs. 2078-2079.
- Liu, Qikun y col. (2020). «The characterization of Mediator 12 and 13 as conditional positive gene regulators in Arabidopsis». En: *Nature communications* 11.1, págs. 1-13.
- Marín-de la Rosa, Nora y col. (2015). «Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins». En: *PLoS genetics* 11.7, e1005337.
- Murase, Kohji y col. (2008). «Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*». En: *Nature* 456.7221, págs. 459-463.
- Nakajima, Masatoshi y col. (2006). «Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors». En: *The Plant Journal* 46.5, págs. 880-889.
- Niwa, Hitoshi (2018). «The principles that govern transcription factor network functions in stem cells». En: *Development* 145.6, dev157420.
- O'Malley, Ronan C y col. (2016). «Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape». En: *Cell* 165.5, págs. 1280-1292.
- Potok, Magdalena E y col. (2019). «Arabidopsis SWR1-associated protein methyl-CpG-binding domain 9 is required for histone H2A. Z deposition». En: *Nature communications* 10.1, págs. 1-14.
- Quinlan, Aaron R e Ira M Hall (2010). «BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features». En: *Bioinformatics* 26.6, págs. 841-842.
- Ramírez, Fidel y col. (2016). «deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis». En: *Nucleic acids research* 44.W1, W160-W165.
- Reid, James B, John J Ross y Stephen M Swain (1992). «Internode length in *Pisum*: a new slender mutant with elevated levels of C 19 gibberellins». En: *Planta*, págs. 462-467.
- Resentini, Francesca y col. (2015). «TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in Arabidopsis thaliana». En: *Molecular plant* 8.3, págs. 482-485.
- Sarrion-Perdigones, Alejandro y col. (2013). «GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology». En: *Plant physiology* 162.3, págs. 1618-1631.
- Serrano-Mislata, Antonio y col. (2017). «DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height». En: *Nature plants* 3.9, págs. 749-754.

- Sun, Tai-ping (2010). «Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development». En: *Plant physiology* 154.2, págs. 567-570.
- (2011). «The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants». En: *Current Biology* 21.9, R338-R345.
- Thorvaldsdóttir, Helga, James T Robinson y Jill P Mesirov (2013). «Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration». En: *Briefings in bioinformatics* 14.2, págs. 178-192.
- Tian, Chaoguang y col. (2004). «Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis». En: *Plant molecular biology* 54.4, págs. 519-532.
- Ueguchi-Tanaka, Miyako y col. (2005). «GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin». En: *Nature* 437.7059, págs. 693-698.
- Weber, Blaise y col. (2016). «Plant enhancers: a call for discovery». En: *Trends in plant science* 21.11, págs. 974-987.
- Yamaguchi, Shinjiro (2008). «Gibberellin metabolism and its regulation». En: *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, págs. 225-251.
- Yan, Wenhao y col. (2019). «Dynamic control of enhancer activity drives stage-specific gene expression during flower morphogenesis». En: *Nature communications* 10.1, págs. 1-16.