

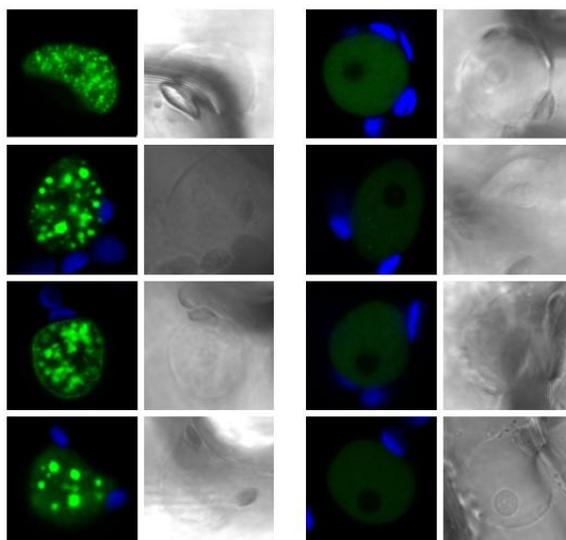
# Análisis de la red de regulación de las proteínas DELLA mediante la generación de alelos “arísticos”

---

**ALBERTO FUSTER PONS**

**Trabajo Final de Máster**

---



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

---

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Directores**

Eugenio Gómez Minguet  
Miguel A. Blázquez Rodríguez



**Valencia, Enero 2018**



# RESUMEN

---

Las proteínas DELLA son reguladores transcripcionales cuya degradación es inducida por las giberelinas (GAs), hormonas vegetales que participan en la modulación de numerosos procesos de desarrollo y defensa frente al estrés. Las proteínas DELLA no son capaces de unirse por sí mismas al ADN y actúan a través de la interacción con decenas de factores de transcripción, modulando su actividad, constituyendo nodos centrales de integración de diferentes rutas de señalización. La implicación de las proteínas DELLA en tantos procesos (i) dificulta el estudio de cada una de sus funciones sin afectar otras y (ii) reduce las posibilidades de su utilización como herramienta biotecnológica. Es por este motivo que resulta especialmente interesante la identificación de alelos arísticos, versiones de las proteínas DELLA que han perdido la capacidad de interacción con una o más proteínas mientras que la mantienen con otros interactores. En este trabajo se plantea, por primera vez, la identificación de alelos arísticos de la proteína DELLA GAI de *Arabidopsis thaliana*. Para ello se ha generado una genoteca mutagenizada del gen *GAI* mediante PCR de baja fidelidad y se han realizado dos rastreos por doble híbrido en levadura, frente a ARR1 y PIF4, para encontrar versiones de GAI con potencial de ser alelos arísticos. Finalmente se ha evaluado la capacidad de interacción de dichos candidatos con una batería de interactores conocidos de GAI haciendo uso de técnicas como el ensayo de doble híbrido en levadura, identificando 46 alelos arísticos, y como prueba de concepto, se ha verificado en planta el comportamiento de uno de ellos mediante BiFC (Bimolecular fluorescence complementation).

DELLA proteins are transcriptional regulators whose degradation is induced by gibberellins (GAs), plant hormones that participate in the modulation of numerous processes of development and defense against stress. DELLA proteins are not able to bind themselves to DNA and act through the interaction with dozens of transcription factors, modulating their activity, constituting central nodes for the integration of different signaling pathways. The implication of DELLA proteins in so many processes (i) makes it difficult to study each of their functions without affecting others and (ii) reduces the possibilities of their use as a biotechnological tool. It is for this reason that the identification of edgetics alleles, versions of DELLA proteins that have lost the ability to interact with one or more proteins while maintaining them with other interactors, is especially interesting. In this work, the identification of aristic alleles of the protein DELLA GAI of *Arabidopsis thaliana* is proposed for the first time. To this end, a mutagenized gene library of the *GAI* gene was generated by low fidelity PCR and two screenings were performed by double hybrid in yeast, against ARR1 and PIF4, to find GAI versions with potential to be edgetics alleles. Finally, the interaction capacity of these candidates has been evaluated with a battery of known GAI interactors using techniques such as the double hybrid assay in yeast, identifying 46 edgetics alleles, and as a proof of concept, the behavior has been verified in plant of one of them using BiFC (Bimolecular fluorescence complementation).



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Las Giberelinas</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Las proteínas DELLA</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Interactores de las proteínas DELLA</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Integración hormonal mediada por DELLA</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Alelos arísticos</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Método de obtención de alelos arísticos</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Características y manejo del material biológico</b>	<b>11</b>
3.1.1 Cepas bacterianas	11
3.1.2 Cepas de levadura	11
3.1.3 Material vegetal	12
<b>3.2 Métodos de transformación</b>	<b>12</b>
3.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	12
3.2.2 Transformación de levadura por choque térmico	12
<b>3.3 Técnicas de biología molecular y celular</b>	<b>13</b>
3.3.1 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>S.cerevisiae</i>	13
3.3.2 Extracción y cuantificación de proteínas	14
3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
3.3.4 Digestiones	15
3.3.5 Sistema Gateway	15
3.3.6 Separación en gel y visualización de ácidos nucleicos	15
3.3.7 Ensayo de doble híbrido	16
3.3.8 Ensayo de BiFC	16
3.3.9 Western blot	17

<b>3.4 Construcciones generadas</b>	<b>17</b>
3.4.1 Generación de la librería de mutantes	17
3.4.2 Construcciones para la selección por color	19
3.4.3 Construcciones para los ensayos de doble híbrido	19
3.4.4 Construcciones para BiFC	19
<b>4.RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Generación de una genoteca mutagenizada de GAI</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Identificación de arísticos</b>	<b>22</b>
4.2.1 Rastreo de doble híbrido	22
4.2.2 Métodos de selección de ausencia de interacción	22
4.2.3 Rastreo de versiones de M5GAI incapaces de interactuar con ARR1	23
4.2.3.1 Identificación de mutaciones seleccionadas	24
4.2.3.2 Selección de 10 alelos M5GAI candidatos a arísticos	26
4.2.3.3 Aislamiento de los 10 alelos M5GAI candidatos seleccionados	27
4.2.3.4 Ensayos de doble híbrido de los 10 candidatos	28
4.2.3.5 Ensayos de BiFC	31
4.2.4 Rastreo de versiones de M5GAI incapaces de interactuar con PIF4	34
4.2.4.1 Selección de los alelos M5GAI candidatos a arísticos	35
4.2.4.2 Ensayos de doble híbrido de los candidatos a arístico	36
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

<b>Figura 1.</b> Representación de la degradación de las proteínas DELLA	2
<b>Figura 2.</b> Dominios proteicos de DELLA y estructura tridimensional	3
<b>Figura 3.</b> Representación de algunas de las interacciones que establece DELLA	5
<b>Figura 4.</b> Representación de las ventajas del uso de alelos arísticos	6
<b>Figura 5.</b> Representación del procedimiento de obtención de la colección de alelos	7
<b>Figura 6.</b> Gama de coloraciones que adquiere AH109	23
<b>Figura 7.</b> Coloración de las colonias tras la transformación de AH109 con la genoteca	24
<b>Figura 8.</b> Localización de las mutaciones en la secuencia aminoacídica de M5GAI	25
<b>Figura 9.</b> Localización de las mutaciones en la estructura tridimensional de M5GAI	26
<b>Figura 10.</b> Localización de las mutaciones de las 10 versiones seleccionadas	27
<b>Figura 11.</b> Resultados de doble híbrido de las 10 versiones seleccionadas	30
<b>Figura 12.</b> Imágenes del ensayo de BiFC	32
<b>Figura 13.</b> Detalle de la membrana del primer western	33
<b>Figura 14.</b> Detalle de la membrana del segundo western	34
<b>Figura 15.</b> Esquema de las dos estrategias empleadas para la obtención de arísticos	35
<b>Figura 16.</b> Coloración de las colonias obtenidas para la selección frente PIF4	36
<b>Figura 17.</b> Resumen de las interacciones de los 45 alelos arísticos obtenidos	38
<b>Tabla 1.</b> Detalle de los componentes de las PCRs de baja fidelidad	18
<b>Tabla 2.</b> Nombre y secuencia de los oligos empleados en las PCRs de baja fidelidad	18
<b>Tabla 3.</b> Oligos utilizados para clonar las versiones mutadas de M5GAI en pDONR	20
<b>Tabla 4.</b> Número de mutaciones obtenidas en las 16 colonias muestrales	22
<b>Tabla 5.</b> Mutaciones de las colonias rosas seleccionadas en el rastreo frente ARR1	28
<b>Tabla 6.</b> Detalle de las construcciones para el ensayo de doble híbrido	28
<b>Tabla 7.</b> Construcciones generadas para los ensayos de BiFC	31



# AGRADECIMIENTOS

---

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido en el desarrollo de este trabajo.

Agradecerles a mis directores de proyecto el Dr. Eugenio Gómez Minguet y el Dr. Miguel A. Blázquez Rodríguez los valiosos conocimientos que me han sabido transmitir durante este año y medio que he compartido con ellos.

También agradecer a todos los miembros del laboratorio 2.07 y 2.08 la ayuda que me han prestado durante el desarrollo de la parte experimental, el buen ambiente que se respira en el laboratorio y en las charlas durante la comida. Hacer una mención especial a Julián y Amparo, compañeros de clase y de experimentos. Sin vosotros esta aventura y las que vendrán no serían lo mismo.

Para terminar quiero agradecerles a mis familiares el apoyo que me han brindado durante estos meses y los ánimos que siempre he recibido.



## **1. Introducción**

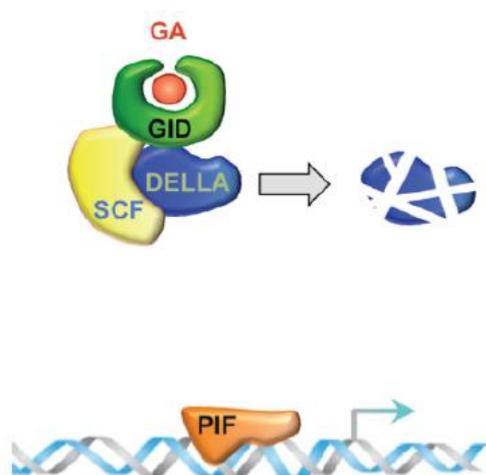
Las hormonas participan en la regulación de la gran mayoría de procesos que ocurren durante la vida de las plantas. Durante las últimas décadas la fisiología, la genética y la biología molecular han permitido alcanzar un amplio conocimiento sobre cómo funcionan el metabolismo y la señalización hormonal. Además se han descrito las principales proteínas involucradas en las rutas de señalización de la mayoría de las hormonas. No obstante, todo este conocimiento ha revelado una elevada interconexión de las cascadas de señalización de las distintas hormonas y dificulta la interpretación del papel e interacción de cada hormona en los procesos fisiológicos. Es precisamente esa compleja red de interacciones que se establecen entre las diferentes rutas de señalización la que da lugar a la elevada plasticidad y robustez que demuestran las plantas durante su desarrollo (Casal et al., 2004), y por ello muchas líneas actuales de investigación se centran en descifrar cuál es su lógica y estructura, cómo llegan a producirse los efectos fisiológicos y cómo se produce la integración con otras señales.

Un buen candidato para el estudio de la integración de señales es la ruta de señalización de las giberelinas (GA). Las dos características que apuntan a un papel de las GAs en la adquisición de la plasticidad son: (1) una misma señal (o molécula) modula procesos muy diversos, lo que implica que hay ramificaciones en la señalización; y (2) cada proceso regulado por GAs también lo regula al menos otra ruta de señalización más, lo que implica que hay posibilidades de establecer interacciones regulatorias. Ambas propiedades contribuyen a la necesaria complejidad de la red que sostiene la plasticidad (Casal et al., 2004).

## 1.1 Las Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales con funciones en todos los estadios de la vida de las plantas, desde la germinación hasta la floración y el desarrollo embrionario (Taiz and Zeiger, 2006). Químicamente son ácidos diterpenoides sintetizados en los plastidios y que sufren modificaciones en el citoplasma y el retículo citoplasmático (Helliwell et al., 2001). Aunque se han descrito más de 120 GAs en plantas y otros organismos como hongos o bacterias, las más importantes en los vegetales son la GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> (Hedden, 2001). Estas hormonas promueven la germinación de las semillas (Seo et al., 2006), estimulan la expansión foliar y la elongación del tallo. Además son esenciales para el buen desarrollo tanto del polen como del fruto y para la transición floral (Yu et al., 2004; Arnaud et al., 2010; Yu et al., 2012).

La expresión de los enzimas responsables de la biosíntesis de las GAs en *Arabidopsis thaliana*, GA 3-oxidasa (GA3ox) y GA 20-oxidasa (GA20ox), así como la expresión de la enzima catabólica GA 2-oxidasa (GA2ox), encargada de inactivar las GAs (Hedden and Phillips, 2000), determinan los niveles de GAs activas en este organismo. Estos genes tienen regulada su expresión por factores ambientales o señales del desarrollo.



**Figura 1:** Representación de la degradación de las proteínas DELLA y activación de la expresión de los genes de respuesta a GAs como consecuencia de la liberación de sus respectivos factores de transcripción (PIF).

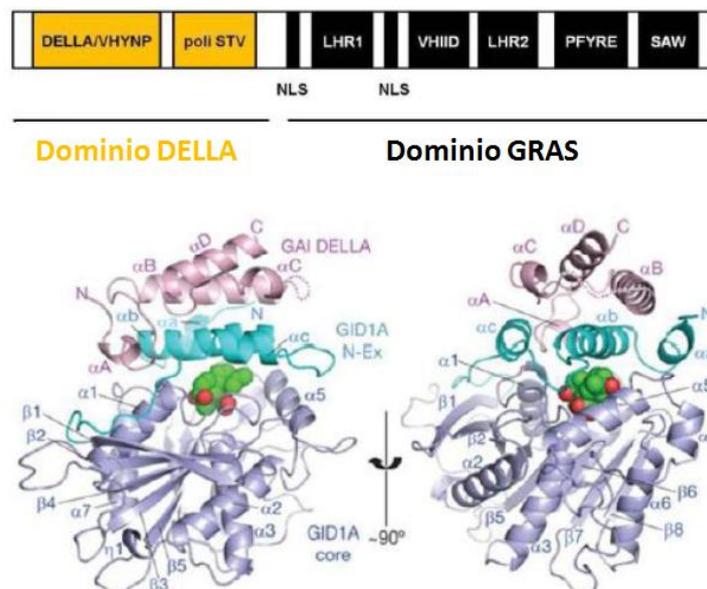
La respuesta a GAs comienza con la percepción de esta hormona por parte del receptor nuclear soluble GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Esta unión desencadena un cambio en la estructura del receptor que hace posible la interacción del receptor GID1 con el dominio N-terminal de las proteínas DELLA. La formación del complejo GA-GID1-DELLA es reconocida por la proteína F-box SLEEPY1 (SLY) (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003). Esta proteína SLY está integrada en un complejo SCF (SKP, CULLIN y F-BOX) E3 ubiquitina ligasa encargado de la poliubiquitinación de la proteína DELLA a la que se une marcándola para ser degradada por el proteasoma 26S (Itoh et al., 2003) como se representa en la Figura 1. La caída en los niveles de DELLA desencadena la activación de la respuesta a GAs (Minguet et al., 2014).

## 1.2 Las Proteínas DELLA

En *Arabidopsis* existen cinco genes que codifican proteínas DELLA: GA-INSENSITIVE (*GAI*), REPRESOR OF GAI-3 (*RGA*), RGA-LIKE 1 (*RGL1*), RGA-LIKE2 (*RGL2*) y RGA-LIKE3 (*RGL3*) (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Lee et al., 2002; Fleet and Sun, 2005). Las 5 proteínas DELLA están implicadas en diferentes procesos internos en *Arabidopsis* (Davière and Achard, 2013) y esa especialización funcional es debida a que presentan distintos patrones de expresión consecuencia de diferencias en las regiones reguladoras de estos genes (Gallego-Bartolomé et al., 2010).

Las proteínas DELLA, de localización nuclear, están implicadas en la regulación transcripcional y son los responsables de la represión de las respuestas a GAs. Se encuentran únicamente en plantas y pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales de tipo GRAS, caracterizada por presentar el dominio GRAS, que da nombre al grupo, en el extremo carboxi-terminal (Ct) (Peng et al., 1997; Dill and Sun, 2001; Feng et al., 2008). Las proteínas DELLA se caracterizan por presentar dos dominios específicos en el extremo amino-terminal (Nt): el dominio DELLA, que les da nombre y es necesario para que se produzca la interacción con los receptores de las GAs que las marca para ser degradadas por el proteosoma (Dill et al., 2001), y el dominio TVHYNP (Bolle, 2004) (Figura 2).

Alelos de las proteínas DELLA que carecen del dominio DELLA son insensibles a la degradación mediada por las GAs y presentan una represión constitutiva de la ruta de señalización de estas hormonas. Plantas con este tipo de alelos tienen múltiples procesos del desarrollo afectados, destacando un color verde más oscuro y un reducido tamaño debido principalmente a una inhibición de la elongación celular.

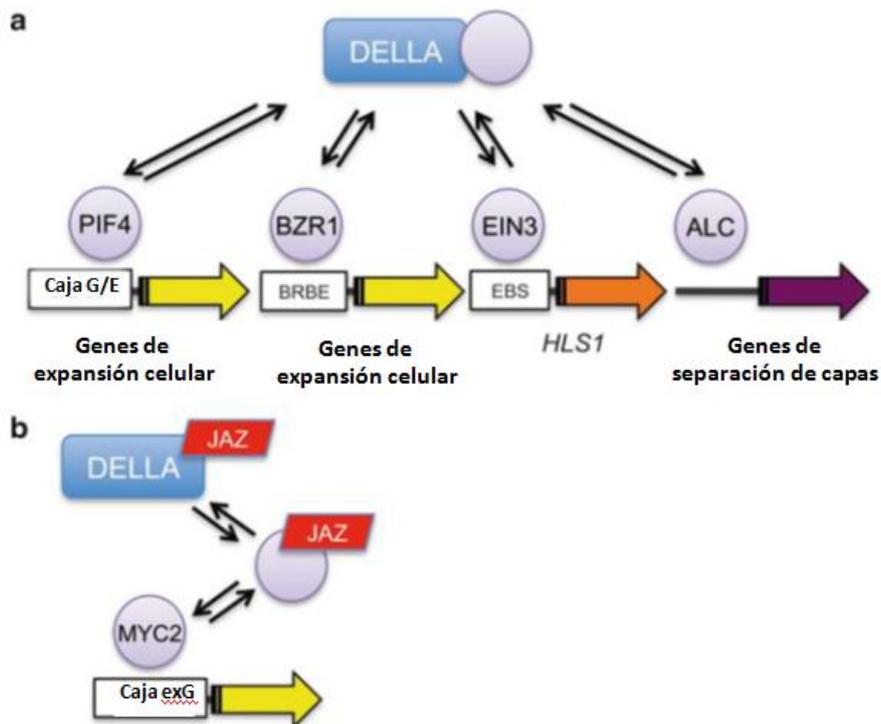


**Figura 2:** Dominios proteicos de DELLA y su estructura tridimensional.

### 1.3 Interactores de las proteínas DELLA

En el laboratorio se han realizado diferentes rastreos para encontrar nuevos interactores de DELLA como el que se realiza en (Marín-de la Rosa et al., 2015) y trabajos no publicados que han revelado la existencia de más de 150 interactores entre los que se encuentran el factor de transcripción BBX24 (SALT TOLERANCE) (Crocco et al., 2015), ARR1 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1) implicado en la ruta de señalización de citoquininas (Marín-de la Rosa et al., 2015) y PDF5 (REFOLDIN5) implicada en la regulación de la organización del citoesqueleto (Locascio et al., 2013a). DELLA también interacciona físicamente con la proteína reguladora JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ), una proteína que inhibe la expresión de los genes de respuesta al ácido jasmónico (Figura 3b) (Hou et al., 2010). Interaccionan con los factores de transcripción PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS), de la familia de factores de transcripción bHLH (Feng et al., 2008; Lucas et al., 2008), esta interacción evita que se unan a los promotores de sus genes diana implicados en la elongación del hipocotilo. Un aumento en los niveles de GAs es capaz de promover el crecimiento de este al favorecer la degradación de las proteínas DELLA que reprimen la respuesta (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Lee et al., 2002; Wen and Chang, 2002). También entran en contacto con BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) (Gallego-Bartolome et al., 2012), implicado en la activación de genes de respuesta a brasinosteroides (Feng et al., 2008; Bai et al., 2012), impidiendo que se unan a los promotores de sus genes diana. Controlan la inducción floral secuestrando las proteínas SPLs (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE) y el desarrollo del fruto al interaccionar con ALC (ALCATRAZ) (Arnaud et al., 2010; Yu et al., 2012). Además establecen interacción física con las proteínas SAW1/BLH2 y SAW2/BLH4 (BEL1-LIKE HOMEODOMAIN proteins), alterando la regulación de la expresión que estas ejercen sobre los genes KNOX implicados en la regulación de la arquitectura e identidad del meristemo (Kumar et al., 2007) (Figura 3a).

Esta situación, en la que DELLA entra en contacto con numerosas proteínas implicadas en el control de la expresión génica explica las múltiples funciones e importancia de esta proteína. Sin embargo, es complicado atribuir a cada interacción DELLA-TF concreta su importancia relativa dentro de la red de procesos regulados.



**Figura 3:** Representación de algunas de las interacciones que establece DELLA y sus efectos.

## 1.4 Integración hormonal mediada por DELLA

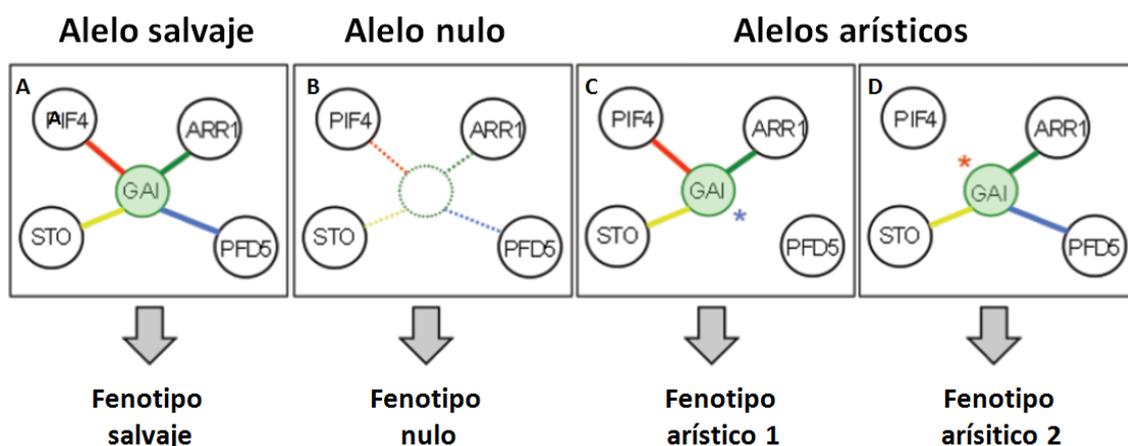
Las proteínas DELLA no presentan un dominio de unión al ADN que les permita regular por sí mismas la expresión de los genes que controlan. En su lugar, estas proteínas serían capaces de interactuar, estableciendo interacciones proteína-proteína, con un amplio repertorio de factores de transcripción. Secuestran reguladores negativos como PIF o BZR activando la expresión génica o impiden la interacción de activadores transcripcionales con sus secuencias diana reprimiendo la expresión (Lucas et al., 2008; Gallego-Bartolome et al., 2012). También se ha demostrado la capacidad de DELLA de actuar como coactivadoras de la transcripción al unirse a algunas proteínas como los ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) (Marín-de la Rosa et al., 2015). Esta capacidad de interacción con otras proteínas hace que las proteínas DELLAs se hayan propuesto como nodos centrales de redes de regulación transcripcional, lo que explica la implicación de las GAs en tantos y tan diversos procesos del desarrollo de la plantas (Locascio et al., 2013b; la Rosa et al., 2014).

Las GAs/DELLA interactúan con otras rutas hormonales. Pueden modular el transporte de las auxinas, implicadas en el crecimiento vegetal, ya que son capaces de reprimir la expresión de las proteínas PIN-FORMED (PIN), encargadas de movilizar esta hormona a lo largo de toda la planta (Willige et al., 2011). Las GAs también son capaces de contrarrestar la acción que las citocininas desempeñan en el mantenimiento del meristemo apical del tallo (Jasinski et al., 2005) y de potenciar su

acción de promoción de la fotomorfogénesis y bloqueo del crecimiento de la raíz (Marín-de la Rosa et al., 2015). Las GAs y los brasinoesteroides reprimen conjuntamente la fotomorfogénesis en oscuridad (Alabadi, 2004) y con el etileno estas hormonas son capaces de promover la formación y mantenimiento del gancho apical (Achard et al., 2003; Vriezen et al., 2004; la Rosa et al., 2014).

## 1.5 Alelos arísticos

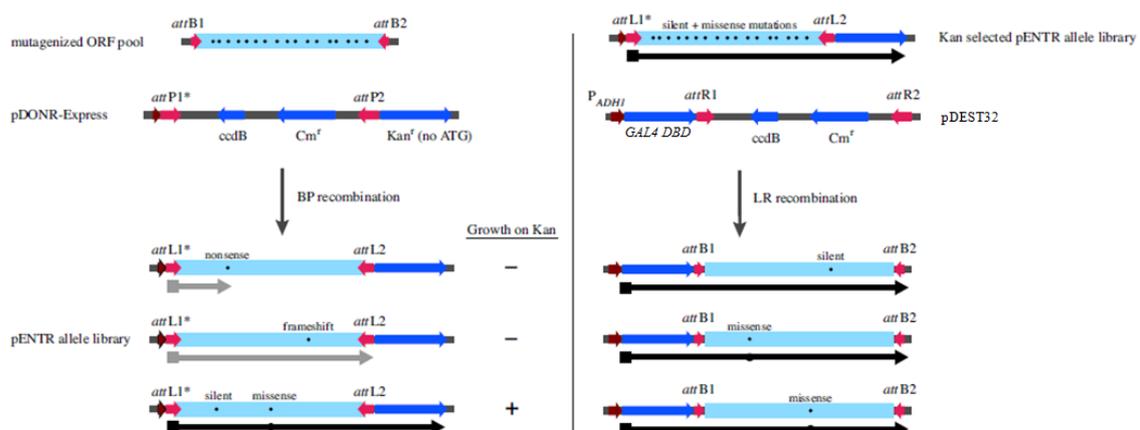
Para el estudio de la relevancia fisiológica de interacciones proteína-proteína se ha recurrido tradicionalmente a la utilización de alelos nulos o utilizando sobreexpresión. Si representamos las vías de transducción de señales como redes en las que los diferentes elementos involucrados conforman nodos, obtenemos algo parecido a lo que podemos observar en la figura 4A. Cuando se utiliza un alelo de pérdida de función eliminamos por completo el nodo y todas sus interacciones, lo que dificulta la evaluación individual de cada una de estas (Figura 4B). Para solventar este problema se ha desarrollado una estrategia que consiste en identificar y analizar el efecto de los llamados alelos arísticos (en inglés “edgetic alleles”), que se caracterizan por la pérdida de una o más interacciones, manteniendo el resto (Figura 4C y 4D) (Dreze et al., 2009). Con esta estrategia es posible también evaluar la robustez de la red cuando se reduce su complejidad.



**Figura 4:** Representación de las ventajas del uso del alelos arísticos en el estudio de una red de señalización.

## 1.6 Método de obtención de alelos arísticos

Para la obtención de alelos arísticos es necesario generar una buena colección de alelos mutados en el gen de interés. Se han desarrollado distintas estrategias para conseguirlo y entre ellas está el uso de una PCR de baja fidelidad (Gray et al., 2006). Mediante una PCR con proporciones no equimolares de nucleótidos se reduce la fidelidad de copia de la polimerasa generando una PCR degenerada en la que cada copia presentará mutaciones diferentes. Esta PCR se realiza con oligos con extremos adecuados para transferirla al vector pDONR-Express, mediante una reacción BP (Sistema Gateway, Invitrogen), de forma que el gen de interés queda en pauta con una proteína que confiere resistencia a kanamicina (que se utiliza como medio selectivo) para garantizar que mutaciones que generen codones de parada prematuros o cambios en la pauta de lectura no sean seleccionados (Figura 5). Mediante la secuenciación de un número reducido de colonias independientes se evalúa la eficiencia de mutagénesis y a continuación se transfiere la colección a los vectores destino que se utilizarán en el rastreo.



**Figura 5:** Representación del procedimiento de obtención de la colección de alelos de M5GAI descrito en (Gray et al., 2006). Las copias de la proteína de interés con diferentes mutaciones, obtenidas con una PCR de baja fidelidad en la que se han empleado oligos que les añaden los extremos adecuados, son transferidas al vector pDONR-Express. En ese vector el gen queda en pauta con una proteína que confiere resistencia a kanamicina. Esto permite que cuando las mutaciones generen codones de parada prematuros o cambios en la pauta de lectura no sean seleccionadas. A continuación se transfiere la colección a los vectores destino que se utilizarán en el rastreo.

Los vectores pDEST22 y pDEST32 permiten realizar análisis de interacción en levadura gracias a que permiten fusionar el extremo N-terminal de la proteína al dominio de activación (GAL4-AD) o al dominio de unión (GAL4-DBD), respectivamente. Cuando estos dos vectores, presentes en una misma célula de levadura, expresan proteínas capaces de interactuar se recompone GAL4 y se une a las secuencias UAS activándose la expresión de genes reporteros como pueden ser *ADE2* o *HIS3*. La ausencia de la actividad de *ADE2*, implicado en la ruta de síntesis de la adenina, da lugar a la acumulación de un intermediario de la ruta de síntesis de adenina de color rojo, mientras que la activación del gen *ADE2* da lugar a colonias de levadura de color

## INTRODUCCIÓN

blanco (Ugolini and Bruschi, 1997). El gen *HIS3* codifica la proteína imidazolglicerol fosfato deshidratasa y es necesario para la síntesis de histidina. En la selección de interacciones es habitual también el uso del 3 amino 1,2,4 triazol, un inhibidor competitivo del producto del gen *HIS3* para ajustar el umbral de activación este gen reportero.

## **2. Objetivos**

1.- Identificación de alelos arísticos de la proteína DELLA GAI, mediante rastreo de doble híbrido en levadura, que hayan perdido la capacidad de interactuar con ARR1 o PIF4.



## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1 Características y manejo del material biológico.**

#### **3.1.1 Cepas bacterianas**

Se crecieron en medio LB (extracto de levadura 0,5%, triptona 1% y NaCl 1%) suplementado con los correspondientes antibióticos dos tipos de cepas bacterianas:

- Cepa TOP10 de *Escherichia coli* para la producción y mantenimiento de plásmidos.
- Cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* para la infiltración en *Nicotiana benthamiana*.

En el caso de *E. coli*, se cultivaron en medio líquido durante 1 día a 37°C y en el caso de *A. tumefaciens* 2 días a 28°C, siempre en agitación. Cuando el cultivo era en medio sólido, se empleaba agarosa al 1,5%.

Las construcciones creadas se almacenaron posteriormente a -80°C glicerizadas. Para ello se utilizaron 700 µl de un cultivo líquido saturado mezclado con 300 µl de glicerol al 50%.

#### **3.1.2 Cepas de levadura**

Los experimentos en levadura se llevaron a cabo utilizando 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente:

- a) Cepa AH109 (MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2:: GAL1UAS–Gal1TATA–His3, GAL2UAS–Gal2TATA–Ade2, URA3::MEL1UAS–Mel1TATA-lacZ, MEL1).
- b) Cepa Y2HGold (MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2:: GAL1UAS–Gal1TATA–His3, GAL2UAS–Gal2TATA–Ade2 URA3::MEL1UAS–Mel1TATA AUR1-C MEL).
- c) Cepa Y187 (MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , met-, URA3::GAL1UAS-Gal1TATA-LacZ MEL1).

El cultivo de las levaduras se realizó durante 2-3 días a 28°C en agitación en medio líquido SD (0.7% base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 0,14% solución de suplemento de aminoácidos) suplementado con un 2% en glucosa y los requerimientos aminoacídicos y nucleotídicos (1X) de cada cepa con su respectivo plásmido ya que el método de selección de las levaduras transformadas con plásmido de interés está basado en la auxotrofia. Para el cultivo en medio sólido en placa se añadió agar al 2%.

### 3.1.3 Material vegetal

Para realizar los ensayos de expresión transitoria en planta utilizamos la especie *Nicotiana benthamiana*. Las semillas fueron germinadas y repicadas en macetas individuales con turba, perlita y vermiculita. Crecieron en estos recipientes durante 3 semanas en condiciones de día largo (ciclos fotoperiódicos de 16h de luz y 8h de oscuridad) a una temperatura constante de 22°C.

## 3.2 Métodos de transformación

### 3.2.1 Transformación de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *E.coli* se empleó el método de la electroporación. Previa diálisis de las muestras se mezcló el DNA a introducir con una alícuota de células electrocompetentes mantenidas en hielo a 4°C. En cubetas de electroporación estériles se sometieron las células a un pulso eléctrico de 1500V durante 5 ms. Posteriormente se añadió 200 µl de medio LB donde se resuspendieron las células electroporadas. En un tubo de microcentrifuga permanecieron durante 1 hora a 37°C en agitación. Pasado este tiempo fueron plaqueadas en LB sólido con el antibiótico necesario en función del plásmido introducido.

En el caso de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el mismo método de transformación con algunas variaciones. El voltaje empleado para el pulso eléctrico fue de 1440V, y posteriormente las células se mantuvieron 2-3 horas en agitación a 28°C antes de plaquearse en placas de LB sólido con los antibióticos necesarios: rifampicina y gentamicina (a los que *A. tumefaciens* tiene resistencia), más el entibiótico necesario en función del plásmido introducido.

### 3.2.2 Transformación de levadura por choque térmico

Para llevar a cabo la transformación de levadura se cultivaron las cepas utilizadas en una placa de SD suplementado con glucosa, los respectivos aminoácidos y nucleotídicos requeridos y agar durante 2 días a 28°C. Se inoculó una colonia en 2 ml de SD líquido suplementado y se dejó crecer a 28°C en agitación durante 12 horas. Se utilizó este cultivo saturado para inocular 50 ml de medio SD líquido suplementado con glucosa y los respectivos aminoácidos. Se cultivó durante 12 horas y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 25 ml de agua destilada estéril. Se repitió la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 15 ml de agua destilada estéril. Esta solución se depositó en los tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugó a 6000 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió en cada tubo 534 µl de PEG 45%, 72 µl de LiAc 1M pH7,5, 100 ng de "DNA carrier" previamente hervido durante 10 minutos y 86 µl de agua destilada estéril conteniendo entre 0,5 y 1 µg del plásmido en cuestión. Se incubó durante 30 minutos a 28°C en agitación y se sometió a un choque térmico de 42°C durante 15 minutos moviéndose varias veces. Se centrifugó durante 5 minutos

a 6000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril para plaquear la solución en SD sólido suplementado con glucosa y los requerimientos necesarios. Las placas se cultivaron a 28°C durante 2-3 días hasta la aparición de las colonias.

### 3.3 Técnicas de biología molecular y celular

#### 3.3.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* y *S. cerevisiae*

Para extraer DNA plasmídico se cultivó *E. coli* en 5 ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes y se empleó el kit “Plasmid Mini Kit I (E.Z.N.A.)” siguiendo el protocolo del proveedor. En el caso de las extracciones masivas de DNA plasmídico de *E.coli* durante la obtención de la genoteca se empleó el kit “Plasmid Midi Kit (QIAGEN)” siguiendo el protocolo del proveedor.

Cuando la extracción se realizó en *S. cerevisiae*, se utilizó, en algunos de los casos y con algunas modificaciones, el kit que utilizamos para *E.coli* “Plasmid Mini Kit I (E.Z.N.A.)”. En el paso de la lisis de las células además de emplear la solución de lisis del kit con RNAsa se sometieron las células a una lisis mecánica utilizando micro esferas de vidrio. Ya que la pared celular de las levaduras es más resistente que la que presenta *E.coli*.

En algunos casos, se realizaron también extracciones de DNA plasmídico de levadura empleando el protocolo descrito en (Robzyk and Kassir, 1992). Las levaduras son cultivadas durante 12 horas en SD con los requerimientos aminoacídicos correspondientes y centrifugadas para eliminar el sobrenadante. Se añaden 100ul de la solución STET (8% Sacarosa, 5mM Tris pH8, 50mM EDTA, 5% Triton X-100), se resuspenden las células y se añaden 0,2g de bolas de vidrio de 0,45mm. Posteriormente los tubos son agitados vigorosamente utilizando un vórtex durante 5 minutos antes de añadir otros 100ul de STET. Más tarde se hierven las células durante 5 minutos, se enfrían en hielo y se centrifugan en frío para obtener un sobrenadante limpio. 100ul de este sobrenadante se pipetea en un tubo de microcentrífuga que contiene 50ul de acetato de amonio 7,5M y se incuban durante 1 hora a -20°C. Vuelven a centrifugarse en frío y se vuelve a transferir 100ul del sobrenadante a un tubo que contiene etanol absoluto frío que hará que el DNA precipite. Los tubos vuelven a ser centrifugados y tras un lavado con etanol 70% el DNA es resuspendido en 20ul de agua.

### 3.3.2 Extracción y cuantificación de proteínas de hojas de *N. benthamiana*

Se extrajeron las proteínas totales procediendo a la homogeneización de un volumen de 150ul de tejido infiltrado de hoja de *Nicotiana benthamiana*, previamente triturado manteniendo el tejido congelado con nitrógeno líquido, en 150ul tampón Laemli 2X [Tris-Cl 0,5 M pH 6,8, 10%SDS, glicerol, 1,5% azul de bromofenol y agua estéril] suplementado con DTT 1M. Los extractos fueron agitados vigorosamente en vórtex durante 30s y hervidos a 95°C durante 5 minutos. Inmediatamente las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm. Las proteínas solubles totales se recogieron con el sobrenadante y se cuantificaron mediante una curva de calibrado utilizando diferentes concentraciones conocidas de BSA (0.0, 0.2, 0.5, 1.1 y 1.5 µg/µl). De las muestras se añadieron 5 µl de cada una a 20 µl de Laemli 1X. Tanto las muestras de interés como los controles se cuantificaron mediante un método colorimétrico derivado del de Lowry (LOWRY et al., 1951): el Kit de cuantificación de proteínas RC DCTM (BioRad). Se midió la absorbancia a 750 nm de los controles con BSA para realizar la recta de calibrado y del mismo modo se midió la absorbancia de las muestras. Con ayuda de la función resultante de la recta se calculó la concentración total de proteínas.

### 3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los programas de amplificación empleados en el termociclador variaron según el producto de PCR a obtener.

En el caso de la amplificación de M5GAi para su aislamiento y verificación el programa constó de 1 minuto inicial a 94°C para la desnaturalización del DNA y 30-40 ciclos de: 30 segundos a 94°C para la separación de las hebras, 30 segundos a 50-60°C (según la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos) para la hibridación de los oligos y un tiempo variable (según tamaño del producto a amplificar; 1 Kb/min) a 72°C para la síntesis de la nueva cadena. En tubos de 0,2 ml y en un volumen final de reacción de 50 ul se incluyó el DNA molde, agua desionizada estéril, el tampón de la reacción 1x, 0,2 µM oligonucleótidos, 0,2 mM nucleótidos y 1 unidad de polimerasa. Dependiendo del caso de utilizó la polimerasa Biotaq o la Cleanup UvatBio.

La PCR de baja fidelidad utilizada para obtener la genoteca el programa fue diferente. Constó de 15 segundos a 96°C para la desnaturalización 35 ciclos de: 15 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto y 15 segundos a 72°C para la síntesis de la nueva cadena con una extensión final de 5 minutos a 72°C. En tubos de 0,2 ml y en un volumen final de reacción de 50 ul se incluyó 1 ng de DNA molde, agua desionizada estéril, el tampón de la reacción 1x, 2 µM de los oligonucleótidos, 10 mM de 3 de los nucleótidos y 5mM del nucleótido donde se deseaba que la polimerasa cometiera un error y 2 unidades de polimerasa Biotools.

### 3.3.4 Digestiones

Las digestiones de DNA se llevaron a cabo en tubos de 0,2 ml. En un volumen final de reacción de 15 ul se incluyeron 100 ng del DNA molde, un número de unidades de enzima calculado con la fórmula que se muestra al final de este apartado y como tampón se utilizó en cada caso el indicado por el proveedor a una concentración final de 10X. Las reacciones se desarrollaron en el termobloque a 37°C durante 2 horas.

$$N^{\circ} \text{ unidades} = \frac{Kb \text{ ADN referencia}}{Kb \text{ ADN diana}} \times \frac{N^{\circ} \text{ cortes ADN diana}}{N^{\circ} \text{ cortes ADN referencia}} \times \mu g \text{ ADN diana}$$

### 3.3.5 Sistema Gateway

El sistema Gateway es una tecnología de clonaje basada en la recombinación del fago  $\lambda$  que permite la transferencia de secuencias de DNA heterólogas entre vectores con secuencias de reconocimiento (*att*). Existen dos tipos de reacciones Gateway, la reacción BP, llevada a cabo por una BP clonasa y la reacción LR, producto de la acción de una LR clonasa.

Para llevar a cabo las reacciones BP añadimos en tubos de 0,2 ml entre 100 y 150 ng de ese producto de PCR, 100 ng del vector pDONR, 1  $\mu$ l del enzima BP clonasa II y el volumen necesario del tampón que suministra la casa comercial Invitrogen para alcanzar un volumen final de 4  $\mu$ l. La reacción se incubó a 25°C durante 8-12 horas. A continuación se añade 0,5  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10.

Las reacciones LR se llevaron a cabo añadiendo en el tubo de microcentrífuga entre 50 y 150 ng del vector pENTRY con el gen de interés, 150 ng del vector destino, 1 ul del enzima LR clonasa II y el volumen necesario del tampón que suministra la casa comercial Invitrogen hasta llegar a un volumen final de 4 ul. La reacción se incubó a 25°C durante 8-12 horas. A continuación se añade 0,5  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10.

### 3.3.6 Separación en geles de agarosa en gel y visualización de ácidos nucleicos

Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1,0% (p/v) en tampón TAE1X (Tris 0,40 M; acetato 0,19M; EDTA 1mM; pH 7,5), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v); azul de xilencianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v) hasta una concentración final de 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante (80V) durante el tiempo necesario. Además los geles contenían 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el ADN tras exponer el gel a luz ultravioleta.

### 3.3.7 Ensayo de doble híbrido

Para realizar los ensayos de doble híbrido se clonaron tanto las diferentes versiones mutadas de la DELLA M5GAI como cada uno de los factores de transcripción en los vectores pDEST22 y pDEST32 respectivamente como se detalla en el apartado "3.4 Construcciones generadas". Estos vectores permiten fusionar estas proteínas al dominio de activación (GAL4-AD) y al dominio de unión (GAL4-DBD) de la proteína GAL4 que actúa como activador transcripcional del gen reportero (HIS3). Tras la obtención de las cepas de levadura con sus respectivos plásmidos se realizó el apareamiento o mating de estas cepas haploides obteniéndose cepas diploides (Fields and Song, 1989). Para ello se inocularon en 100 µl de medio YPDA 2x (1% extracto de levadura, 1% peptona, 2% glucosa) líquido una colonia de cada cepa haploide con su plásmido correspondiente dejándolo posteriormente a 28°C durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, los 100 µl son centrifugados para eliminar el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas posteriormente en 100 µl agua destilada estéril y plaqueadas en SD sólido suplementado con glucosa y los requerimientos aminoacídicos de las nuevas células diploides. La cepa Y187 con pDEST32 (DBD) es auxotrófica para triptófano y la cepa Y2HGold con pDEST22 (AD) son auxotróficas para leucina. Las nuevas cepas diploides presentan estas dos auxotrofías. Después de 2-3 días a 28°C se volvió a cultivar en medio de selección, sin leucina ni triptófano, una de las colonias mediante triple estría para obtener una colonia aislada. La colonia única aislada se creció en 0,5 ml de SD líquido suplementado con glucosa y los requerimientos aminoacídicos 1 día a 28°C y en agitación para proceder con los ensayos de crecimiento en medio sólido o goteos. Con los cultivos de levadura que se dejaron en agitación se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril y se depositaron 5 µl de cada dilución en placas control (SD- L-W), placas con medio de selección (SD-L-W-H) y con concentraciones crecientes de 3AT (3-Amino-1, 2, 4-triazol), un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3 que permite evitar falsos positivos por el efecto de una posible autoactivación del gen HIS3. Los goteos se cultivaron durante 5 días a 28°C y se analizaron los resultados teniendo en cuenta la mayor dilución a la que aun se observaba crecimiento.

### 3.3.8 Ensayo de BiFC

Los factores de transcripción PIF4, ARR1 y SAW1 junto con las diferentes versiones de la proteína DELLA GAI se clonaron por Gateway en los vectores pMDC43-YFN y pMDC43-YFC, respectivamente. Mediante electroporación se introdujeron cada una de las construcciones en la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* y los distintos clones obtenidos se emplearon para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana* de 2 semanas de edad. Este procedimiento se llevó a cabo preparando un preinóculo de todos los clones en 5ml de LB con los respectivos antibióticos a 28°C en agitación y oscuridad durante 18 horas. Después se midió la OD de cada uno de los cultivos con las diferentes construcciones y se calculó el volumen necesario para obtener una OD de 1 en un volumen total de 2 ml. Se añadió ese volumen en tubos de centrifuga de 2 ml, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 20 min para obtener los respectivos sedimentos y se resuspendieron en 2 ml de solución de infiltración (1 mM MES, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> y acetosiringona 200 µM). Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente, en

oscuridad y durante 2 horas. Finalmente se mezclaron los cultivos en las combinaciones deseadas a una OD en la mezcla final de 0,2. Posteriormente se agroinfiltraron las hojas de *N. benthamiana*. Pasados tres días se observó la fluorescencia de las muestras utilizando un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica, <http://www.leica.com>) y. Para excitar la YFP fue necesario emplear un láser de 488 nm y la emisión generada se recogió entre 490 y 540 nm (máximo de emisión: 509 nm).

### 3.3.9 Western Blot

Para verificar la presencia de las diferentes versiones de M5GAI y de los factores de transcripción en el ensayo de bioluminiscencia (BiFC) se llevó a cabo un Western Blot. Se emplearon muestras recogidas en el mismo momento en el que se realizó la observación al confocal de plantas de 3 semanas de edad. Las proteínas totales desnaturalizadas se separaron en geles SDS-PAGE al 12% y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para comprobar que los pocillos se habían cargado con cantidades iguales de proteínas y, tras la eliminación del colorante, se saturaron con una solución de bloqueo (TBS 0.1% Tween 20 + 20% leche en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante una hora en agitación a temperatura ambiente y posteriormente con el anticuerpo secundario de la misma forma. Se empleó un anticuerpos primario anti-YFN policlonal (ab 280 SigmaAldrich) capaz de reconocer la dos partes de la proteína, la parte C terminal de la YFN y la parte N terminal. Se revelaron las membranas con "Bio-Rad DC Protein Assay" y se observaron empleando el imager LAS-3000 de Fujifilm.

## 3.4 Construcciones generadas

### 3.4.1 Generación de la colección de mutantes

Para obtener las versiones mutantes de M5GAI se generó una librería de alelos mediante PCR mutagénica en la que además los oligos añaden secuencias attB para posteriormente llevar a cabo una reacción gateway. Se llevaron a cabo dos PCRs de baja fidelidad empleando mezclas no equilibradas de aminoácidos (Tabla 1).

## MATERIALES Y MÉTODOS

	PCR1	PCR2
<b>DNA</b>	1 ng	1 ng
<b>Tampón</b>	1X	1X
<b>dATP</b>	5 mM	10 mM
<b>dTTP</b>	10 mM	10 mM
<b>dGTP</b>	10mM	5 mM
<b>dCTP</b>	10mM	10 mM
<b>attB1M5GAI-For</b>	2 uM	2 uM
<b>attB2M5GAI-Rev</b>	2 uM	2 uM
<b>Polimerasa</b>	2 ud.	2 ud.

**Tabla 1:** Detalle de los componentes de las dos PCRs de baja fidelidad realizadas para la obtención de la genoteca de mutantes de M5GAI.

El programa empleado fue de 15 segundos iniciales a 96°C, 30 ciclos de: 15 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente los productos de PCR fueron purificados en gel, cuantificados por separado y se realizaron los cálculos pertinentes para mezclarlos de forma equimolar.

Los oligos empleados que permitieron añadir sitios attB en los extremos de los productos de PCR para su posterior clonaje mediante Gateway se detallan en la tabla 2.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
attB1M5GAI-For	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTc aAACGGCGTCGTGGAAACCA
attB2M5GAI-Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcgcATTGGTGAGAGTTTCCA

**Tabla 2:** Nombre y secuencia de los oligos empleados en las PCRs mutagénicas realizadas.

En la reacción BP se utilizaron 244 ng del vector destino pDONR-express, 163 ng del mix de productos de PCR con las versiones mutadas, 3,26 ul de TrisHCl 10mM pH8 y 2 ul de BP clonasa II. La reacción se llevó a cabo a 25°C durante 12 horas.

Para comprobar si se había obtenido una genoteca representativa, con la capacidad de generar mutaciones en todas sus posiciones se transformaron células competentes top10 de *E.coli* con la reacción de BP previa diálisis en glicerol al 10%. La transformación se llevó a cabo empleando 2ul de la BP, 950 ul de LB y 1mM de IPTG, inductor del promotor que gobierna la expresión de M5GAI fusionado a la resistencia a kanamicina en estos vectores y que no es necesario pero añadimos con la intención de maximizar la expresión. Por otra parte, 2ul de la transformación de coli con la BP fueron plaqueados en espectinomicina y el resto en 3 placas con kanamicina, 260ul en cada una de ellas. Se contaron las colonias totales obtenidas (545) y las colonias presentes en las placas con kanamicina para determinar el total teórico de plásmidos presentes y los cambios teóricos en cada una de las posiciones de la secuencia de nucleótidos.

Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico del césped obtenido en las 3 placas con kanamicina realizando una midiprep que alcanzó los 1820ng/ul y mediante una reacción LR se introdujo la genoteca de M5GAI generada en los vectores destino pDEST32 y pDEST22. La LR se desarrolló durante 12 horas a 25°C empleando 594ng del vector de destino pDEST32 y pDEST22, 300 ng del vector origen pDONR-express con la genoteca de M5GAI, 2ul del enzima LR clonasa II y 3,58 ul del tampón TrisHCl 10mM pH8. Previa diálisis con glicerol 10% se transformó la cepa top10 de *E.coli* con los 10ul de la reacción de LR a un voltaje de 1600V y utilizando SOC como medio de resuspensión, se plaquéó en 7 placas con ampicilina en el caso del pDEST22, gentamicina para pDEST32 y se extrajo el DNA plasmídico mediante midiprep.

### **3.4.2 Construcciones para la selección por color**

Para llevar a cabo los rastreos por color frente a ARR1 basados en el mutante *ade2* se transformó la cepa AH109 de levadura con ARR1 clonado mediante tecnología gateway en el vector pDEST22, y la librería de M5GAI en pDEST32. Para los rastreos por color frente a PIF4 se transformó esta misma cepa de levadura mutante con otro de los interactores descritos, PIF4 clonado mediante gateway en el vector pDEST22, y la librería de M5GAI en pDEST32. Las colonias obtenidas durante esta selección crecieron en medio SD sin leucina ni triptófano, auxotrofías que les proporcionan los vectores pDEST22 y pDEST32 respectivamente. En ambos casos durante la selección se utilizaron controles de coloración para contrarrestar las posibles variaciones.

### **3.4.3 Construcciones para los ensayos de doble híbrido**

Para realizar los ensayos de doble híbrido se transformó la cepa de levadura Y187 con las diferentes versiones mutadas de la DELLA M5GAI en el vector pDEST32, clonación obtenida mediante gateway. Se disponía en el laboratorio de cada uno de los factores de transcripción con los que se quería comprobar la interacción en pDEST22 y se transformó con ellos la cepa Y2HGold. Estas construcciones aparecen detalladas en la tabla 6 del apartado de resultados.

### **3.4.4 Construcciones para BiFC**

Todos los genes detallados en la tabla 7 del apartado de resultados, excepto M5GAI y del2-M5GAI, fueron clonados a un vector pDONR221 mediante clonación gateway. Posteriormente desde este vector pDONR221 fueron transferidos a los vectores pYFC o pYFN mediante una reacción LR. A las versiones mutadas de M5GAI, seleccionadas mediante ensayo de doble híbrido (315, 329 y 373), se les tuvieron que añadir secuencias attB a cada uno de sus extremos mediante PCR para poder clonarlos en pDONR221 por gateway. Los oligos que se utilizaron para ello se detallan en la tabla 3.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
attB1-M5GAI	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTAACGGCGTCGTGGAAAC
attB2-M5GAI	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGAATTCGCCCTTAATTGGTGGAGAGTTT

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para clonar las versiones mutadas de M5GAI en los vectores pDONR.

## **4. Resultados**

### **4.1 Generación de una genoteca mutagenizada de GAI**

Se ha descrito que el dominio N-terminal de SLR (la proteína DELLA presente en el arroz) tiene una alta capacidad de transactivación de la expresión génica (Hirano et al., 2012). Por eso en los rastreos de doble híbrido usando DELLAs como cebo se utiliza una versión truncada sin el extremo N-terminal, para que sólo se active la expresión del gen reportero cuando exista interacción entre la DELLA y la proteína presa. Además, la interacción con los factores de transcripción siempre sucede a través del dominio GRAS, presente en su forma completa en dicha versión truncada, que en el caso de la proteína GAI se ha denominado “M5-GAI”. Por esta razón, se utiliza en este trabajo el dominio GRAS de la proteína GAI (M5GAI), ya que tiene la misma capacidad de interacción en levadura que la proteína entera y sin embargo no presenta una autoactivación tan fuerte en ausencia de interactores.

Para obtener la colección mutagenizada de M5GAI, se realizaron dos PCRs: una favoreciendo la aparición de sustituciones en posiciones con el nucleótido A o T, y otra favoreciendo los cambios en posiciones C o G. Una vez purificados y cuantificados los productos de ambas PCRs, se mezclaron en proporciones equimolares para maximizar una distribución homogénea y aleatoria de mutaciones en todas las posiciones. Se utilizaron aproximadamente 250 ng de producto de PCR para transferirlo, mediante una reacción de recombinación BP (Sistema Gateway, Invitrogen), al vector pDONR-Express y a continuación transformar *E. coli* (TOP10). Las pruebas de transformación con diferentes concentraciones de kanamicina no mostraron diferencias importantes, así que se seleccionó una concentración de 50 µg/ml para ser utilizada en la selección de la librería. La secuenciación de 16 colonias aisladas de las placas de prueba mostró una incidencia de mutaciones que se aproximaba a una distribución Poisson de valor  $n$  entre 1 y 2, que es el valor que indica la presencia de forma mayoritaria de secuencias con 1 o 2 mutaciones. Los cambios de nucleótido observados también indicaban una distribución homogénea entre mutaciones en posiciones A/T y C/G (Tabla 4).

La cuantificación del número de colonias en las placas de evaluación (con 2 µl de la transformación) indicó que la estimación de número de colonias en el total restante sería de alrededor de 70.000 colonias individuales. Teniendo en cuenta el tamaño de M5GAI (1.142 pb) y la distribución poisson observada, se estimó que cada posición presentaría unos 30 cambios. El total restante de la transformación fue plaqueado en 3 placas de selección con kanamicina e IPTG, y tras 16h a 37°C, la película uniforme de crecimiento bacteriano que cubría cada placa fue recogida totalmente para realizar una extracción de ADN plasmídico con un kit de midiprep.

Para transferir la librería a los vectores destino que se utilizarán en el rastreo de doble híbrido (los vectores pDest22 y pDest32) se realizó una reacción de recombinación LR (Sistema Gateway, Invitrogen), utilizando 500 ng de la librería en pDONR-Express; a continuación se transformó *E. coli* (TOP10) con toda la reacción LR y

## RESULTADOS

se plaqueó en varias placas con las selección adecuada para cada vector. Se recogió todo el crecimiento bacteriano y se obtuvo ADN plasmídico con un kit de midiprep.

16 colonias	3	Secuencia
	7	Mutación
	4	2 mutaciones
	1	3 mutaciones
	1	4 mutaciones

**Tabla 4.** Número de mutaciones obtenidas en las 16 colonias muestrales secuenciadas tras la primera transformación de *E.coli* con la genoteca obtenida.

## 4.2 Identificación de arísticos

### 4.2.1 Rastreo de doble híbrido

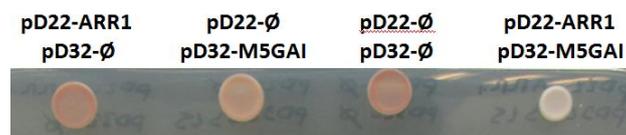
Dado que es la primera vez que se aborda la identificación de alelos arísticos de las proteínas DELLA, se seleccionaron interactores que presentan una interacción fuerte, es decir aquellas que crecen en altas concentraciones de 3AT, ya que facilitan el rastreo de doble híbrido. Entre las posibles opciones se seleccionaron ARR1, cuya unión a sus genes diana se ve mejorada por la interacción con las DELLAs, y PIF4, al que las DELLAs impiden su unión al DNA.

Se decidió comenzar con ARR1 para la puesta a punto del rastreo y con la experiencia adquirida, que será discutida en este trabajo, se modificó el protocolo para realizar el rastreo con PIF4.

### 4.2.2. Método de selección de ausencia de interacción

Como se ha comentado previamente hemos utilizado la versión M5GAI por la fuerte autoactivación de la proteína entera (GAI) en levadura; aún así, M5GAI también presenta, aunque de forma leve, cierto grado de autoactivación. En nuestro caso se consideró esta característica como una ventaja para el rastreo de doble híbrido debido al efecto sobre el color.

Los rastreos por color se han realizado, como se ha explicado en la introducción, creando las fusiones proteicas GAL4AD-ARR1 y GAL4BD-M5GAI con la ayuda de los vectores pDEST22 y pDEST32 respectivamente. Cuando estas dos proteínas, presentes en una misma célula, son capaces de interactuar se recompone GAL4 y se une a las secuencias UAS(GAL1-10)-ADE2 activándose la expresión del gen reportero *ADE2*. Esto nos permiten realizar análisis de interacción por coloración en cepas de levadura con una versión mutada no funcional de este gen *ADE2*. Al estar implicado en la ruta de síntesis de la adenina, una versión no funcional del mismo da lugar a la acumulación de un intermediario de color rojo. Cuando se produce la activación del gen reportero *ADE2* se obtienen colonias de levadura de color blanco. La leve, pero significativa, autoactivación del gen *ADE2* cuando M5GAI se expresa hace que la colonia presente un color menos intenso que cuando M5GAI no está presente y sólo se expresa, por ejemplo, ARR1 o se usan los vectores vacíos, mientras que cuando ambas proteínas están presentes y se da la interacción las colonias son blancas (figura 6).



**Figura 6:** Gama de coloraciones que adquiere la cepa de levadura AH109 según las construcciones con las que es transformada que se utilizaron como control de crecimiento y coloración durante el rastreo.

Algunas mutaciones presentes en la colección pueden afectar a la estructura terciaria de tal forma que la proteína pierda toda su funcionalidad; es esperable en ese caso que también se pierda la capacidad de autoactivación de M5GAI y por tanto las colonias presenten un color rojo más oscuro. En base a este razonamiento, las colonias más interesantes para la identificación de alelos arísticos de GAI serían las de color rojo claro, ya que las de color blanco denotarían una interacción normal entre M5GAI y ARR1, y las de color rojo indicarían presumiblemente una inactivación completa de la proteína M5GAI

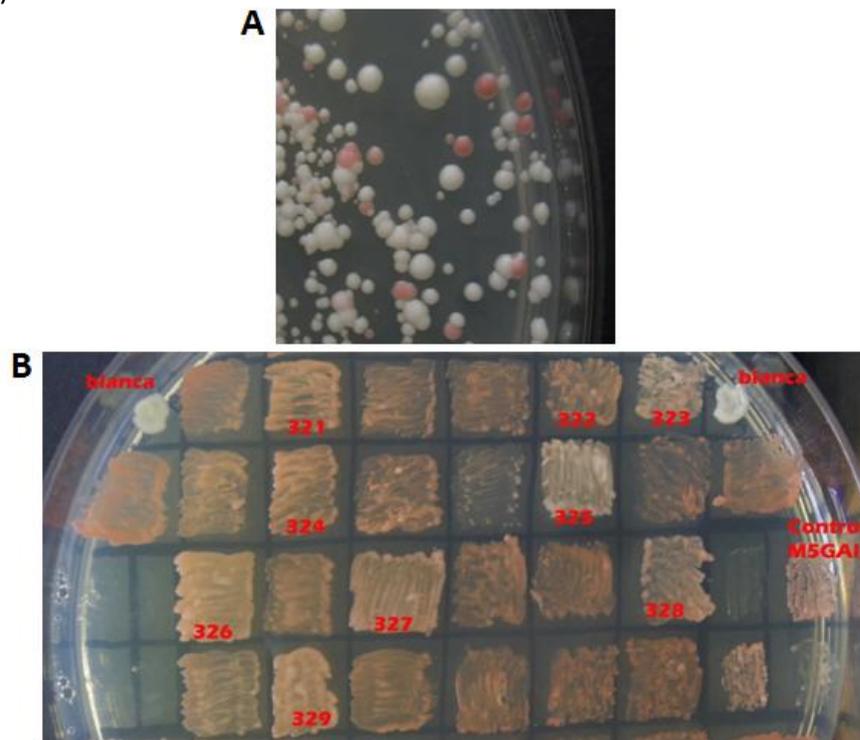
#### 4.2.3 Rastreo de versiones de M5GAI incapaces de interactuar con ARR1

La cepa AH109 de *S. cerevisiae* se transformó por separado con los vectores pDest22-ARR1 y pDest22-∅, dando lugar a las cepas AH109-ARR1 y AH109-∅ respectivamente, y éstas a su vez se transformaron con los vectores pDest32-M5GAI y pDest32-∅ (AH109-ARR1-M5GAI, AH109-ARR1-∅, AH109-∅-M5GAI y AH109-∅-∅, respectivamente). Estas cepas, que podemos ver en la figura 6, fueron utilizadas como controles en el rastreo.

El rastreo se realizó transformando la cepa AH109-ARR1 con la genoteca de M5GAI en pDEST32 y plaqueando sobre medio SD sin leucina y sin triptófano (SD-L-W) para permitir el crecimiento de las colonias que contengan los dos vectores. Como se esperaba, se observó la presencia de colonias con diferentes tonalidades entre el rojo oscuro y el blanco (Figura 7 A). Estas colonias fueron replicadas y numeradas en placas

## RESULTADOS

con medio SD sin Leucina y sin Triptófano (SD-L-W) junto a los controles de coloración (Figura 7 B).

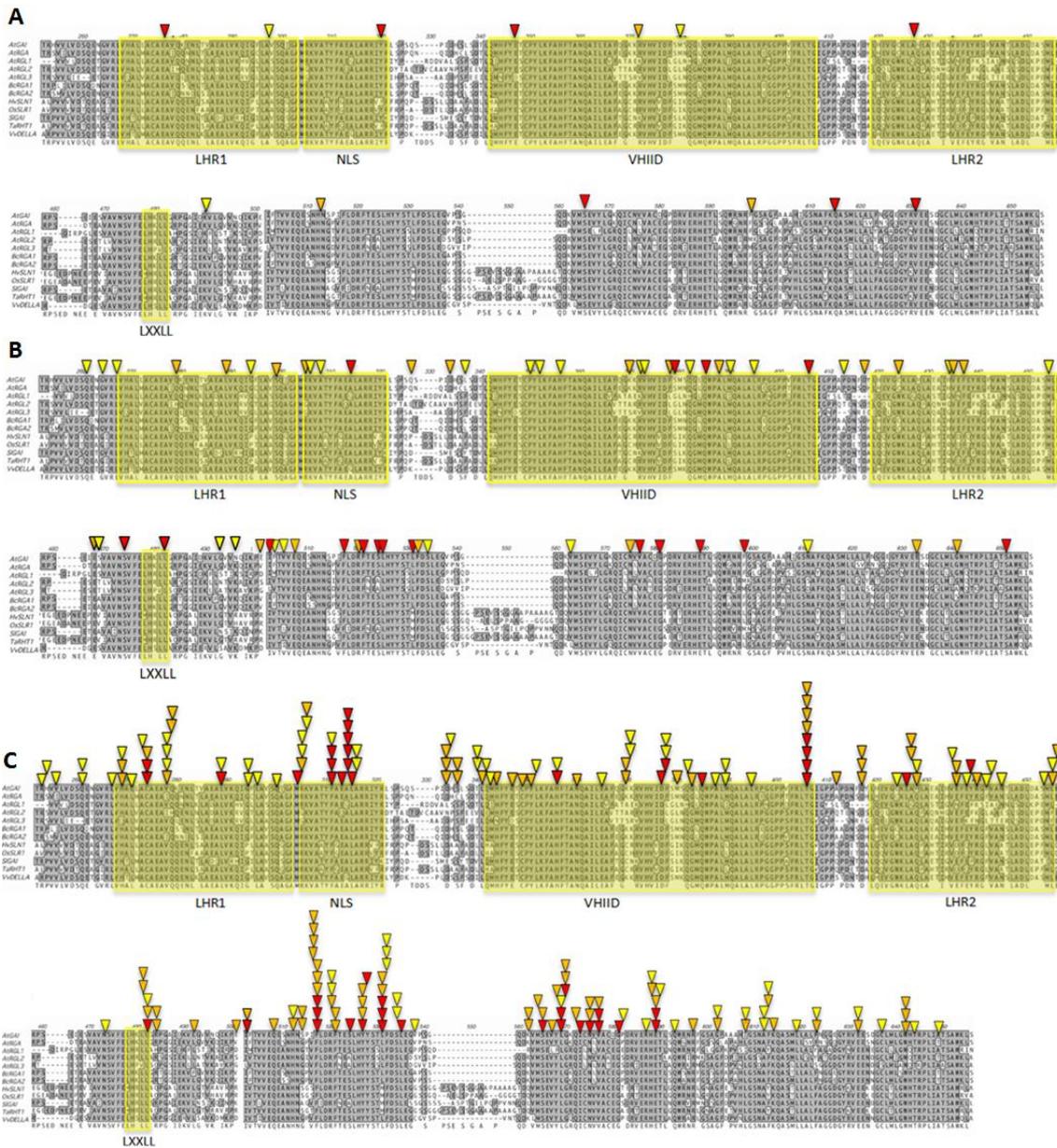


**Figura 7: (A)**, Coloración de las colonias obtenidas tras la transformación la cepa Y2H-ARR1 con la genoteca de M5GAI en pDest32 en medio SD sin Leucina y sin Triptófano (SD-L-W). **(B)**, Detalle de las colonias rosas replicadas y numeradas en medio SD sin Leucina y sin Triptófano (SD-L-W) obtenidas tras la transformación la cepa Y2H-ARR1 con la genoteca de M5GAI en pDEST32 junto a los controles de coloración.

### 4.2.3.1 Identificación de las mutaciones seleccionadas en el rastreo

Como era la primera vez que este tipo de rastreo se realizaba, decidimos evaluar las secuencias presentes en los tres grupos de color establecidos. Para ello, se extrajo ADN plasmídico de 68 colonias rojas, 124 colonias rosas y 48 colonias blancas, utilizando el protocolo descrito en (Robzyk and Kassir, 1992). Se procedió a la amplificación de M5GAI por PCR y a su secuenciación para determinar las mutaciones presentes en cada colonia. Una primera evaluación rápida de la distribución de las mutaciones identificadas en cada grupo de color refleja diferencias claras entre los grupos (Figura 8).

Como era esperable, la mayoría de las secuencias de las 48 colonias blancas no presentaron mutaciones o eran sinónimas y sólo 14 secuencias presentaron algún cambio de aminoácido. En el caso de las colonias rojas, las mutaciones se distribuían a lo largo de toda la secuencia sin repeticiones, mientras que las identificadas en las secuencias rosas parecían agruparse en ciertas regiones y mutaciones idénticas o equivalentes se aislaron varias veces de forma independiente. En definitiva, estaba enriquecido en mutaciones diferentes, lo que sugiere que la selección por color había separado efectivamente diferentes tipos de mutaciones.

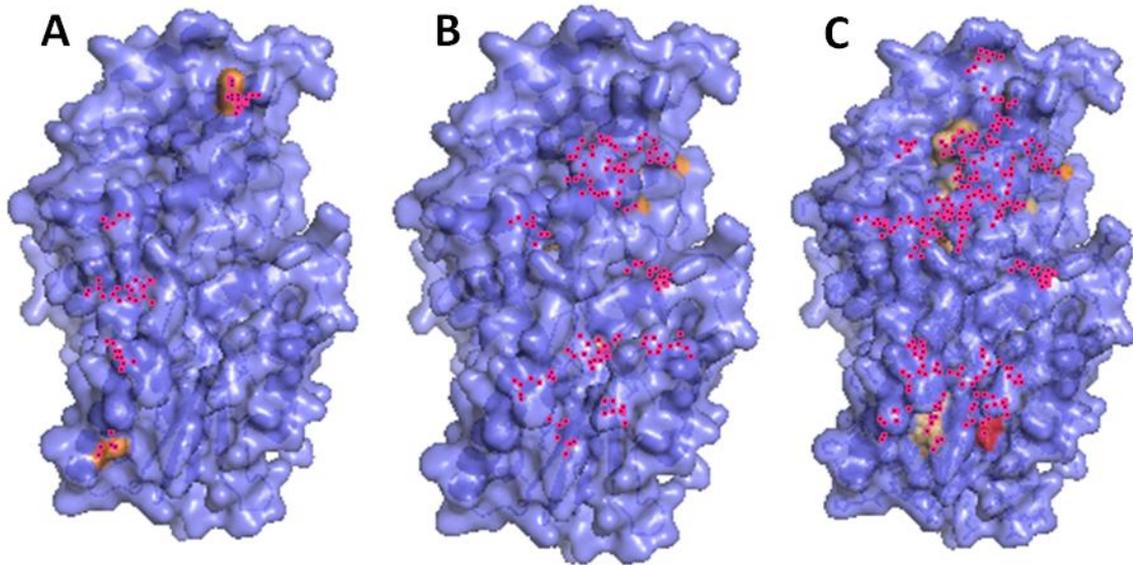


**Figura 8:** Localización de las mutaciones en la secuencia aminoacídica de la proteína M5GA1 presentes en las colonias, **(A)** blancas; **(B)** rojas y **(C)** rosas obtenidas en el rastreo por color frente ARR1. Las etiquetas rojas corresponden a cambios de aminoácido únicos en la secuencia. Las etiquetas naranjas indican cambios de aminoácido acompañados de otro cambio en la misma secuencia y las etiquetas amarillas son cambios de aminoácido acompañados de dos o más cambios en la misma secuencia.

La representación de las mutaciones en la estructura tridimensional de M5GA1, a partir de la modelización sobre la estructura de la proteína GRAS Scarecrow-Like7 de arroz (Li et al., 2016), confirma las diferencias entre grupos de color. Curiosamente, la mayoría de las mutaciones identificadas en las colonias rosas afectan a aminoácidos que no se encuentran en la superficie de la proteína y que preferentemente se agrupan en dos regiones (Figura 9), lo que sugiere que más que afectar directamente a los aminoácidos implicados en las interacciones, los cambios pueden estar generando desplazamientos de la posición de algunos aminoácidos de superficie, lo que haría que

## RESULTADOS

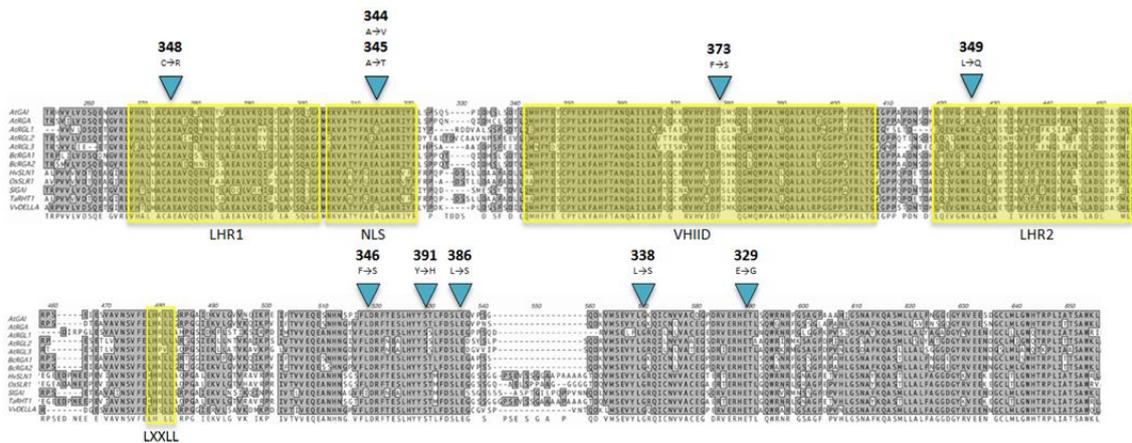
no pudieran establecer las interacciones requeridas, y que es especialmente en esas dos regiones donde los cambios afectan a la interacción con ARR1.



**Figura 9:** Localización de los cambios aminoacídicos únicos en la estructura tridimensional de la proteína M5GAI presentes en las colonias blancas (A), rojas (B), y rosas (C), obtenidas en el rastreo por color frente a ARR1. Las zonas marcadas en naranja corresponden a cambios aminoacídicos únicos en la secuencia (las etiquetas rojas de la figura 8), la intensidad creciente de coloración que aparece en la figura C corresponde a un número creciente de secuencias en las que aparece ese mismo cambio único (el número de etiquetas rojas de cada posición en la figura 8). Las marcas rosas son los átomos que componen los aminoácidos marcados que nos permiten visualizarlos en la estructura aunque estos se encuentren en el interior de la proteína.

### 4.2.3.2 Selección de 10 alelos M5GAI candidatos a arísticos

En este punto se decidió seleccionar un reducido número de alelos de M5GAI para llevar a cabo con ellos los posteriores análisis de interacción de acuerdo a dos criterios de preferencia: 1) que contengan una mutación única de cambio de aminoácido, que facilitaría la interpretación futura si se confirmaba como alelo arístico, y 2) aquellas posiciones en las que se han identificado repetidamente cambios en secuencias diferentes. De entre las 124 colonias rosas se seleccionaron 10 mutantes con cambios únicos de aminoácido en sus secuencias, en posiciones donde se produjeron un mayor número de cambios. Se seleccionó también una de las secuencias sin mutaciones de las colonias blancas para ser usada como control silvestre exactamente equivalente en secuencia a las mutadas. La versión no mutada de M5GAI se nombro como 315 y las 10 versiones mutantes recibieron los identificadores (329, 338, 344, 345, 346, 348, 349, 373, 386, 391). La localización de sus mutaciones aminoacídicas únicas en la secuencia y el cambio de aminoácido correspondiente se presenta en la figura 10.



**Figura 10:** Localización de las mutaciones únicas en la secuencia aminoacídica de M5GAI de cada una de las 10 versiones seleccionadas de entre las colonias rosas obtenidas en el rastreo por color frente a ARR1. Acompañado del identificador de cada uno de los mutantes en negrita aparece cuál es el cambio de aminoácido en cada posición.

#### 4.2.3.3 Aislamiento de los 10 alelos M5GAI candidatos seleccionados

La confirmación de que un alelo M5GAI candidato es realmente un alelo arístico requiere comprobar que mantiene su capacidad de interacción con otros interactores, para ello debemos recuperar el vector con el alelo candidato y reintroducirlo en levadura con otros interactores. Se extrajo el ADN plasmídico de cada cepa seleccionada, y se utilizó para transformar *E. coli* (cepa TOP10) usando como selección la resistencia a gentamicina, presente sólo en el vector pDEST32. Posteriormente se extrajo ADN plasmídico de una colonia aislada de cada transformación y se secuenció para verificar la secuencia del alelo M5GAI recuperado.

Como podemos ver en la tabla 5, en la mayoría de los casos las mutaciones continuaban siendo las mismas excepto para el mutante 373. En el caso del 373, no se encontró la mutación identificada en la PCR de levadura y se encontró una mutación diferente en otra posición. La explicación más plausible es que en la cepa de levadura original hubiera una mezcla de plásmidos que por PCR no se hizo evidente, aunque no podemos descartar otras posibilidades, como contaminación en la PCR de levadura. Por tanto y dado que sólo se vió discrepancia en el 373, se decidió no descartarlo en este punto y continuar con los 10 candidatos.

## RESULTADOS

Alelo M5GAI	PCR levadura	<i>E. coli</i>
315	-	-
329	E-589-G	E-589-G
338	L-569-S	L-569-S
344	A-314-V	A-314-V
345	A-314-T	A-314-T
346	F-517-S	F-517-S
348	C-274-R	C-274-R
349	L-426-Q	L-426-Q
373	<b>F-378-S</b>	<b>S-323-P</b>
386	L-535-S	L-535-S
391	Y-588-H	Y-588-H

**Tabla 5:** Comparación de las mutaciones identificadas por PCR de las colonias rosas seleccionadas en el rastreo por color frente a ARR1, y las mutaciones identificadas en los vectores recuperados por transformación en *E. coli*.

### 4.2.3.4 Ensayos de doble híbrido de los 10 candidatos seleccionados.

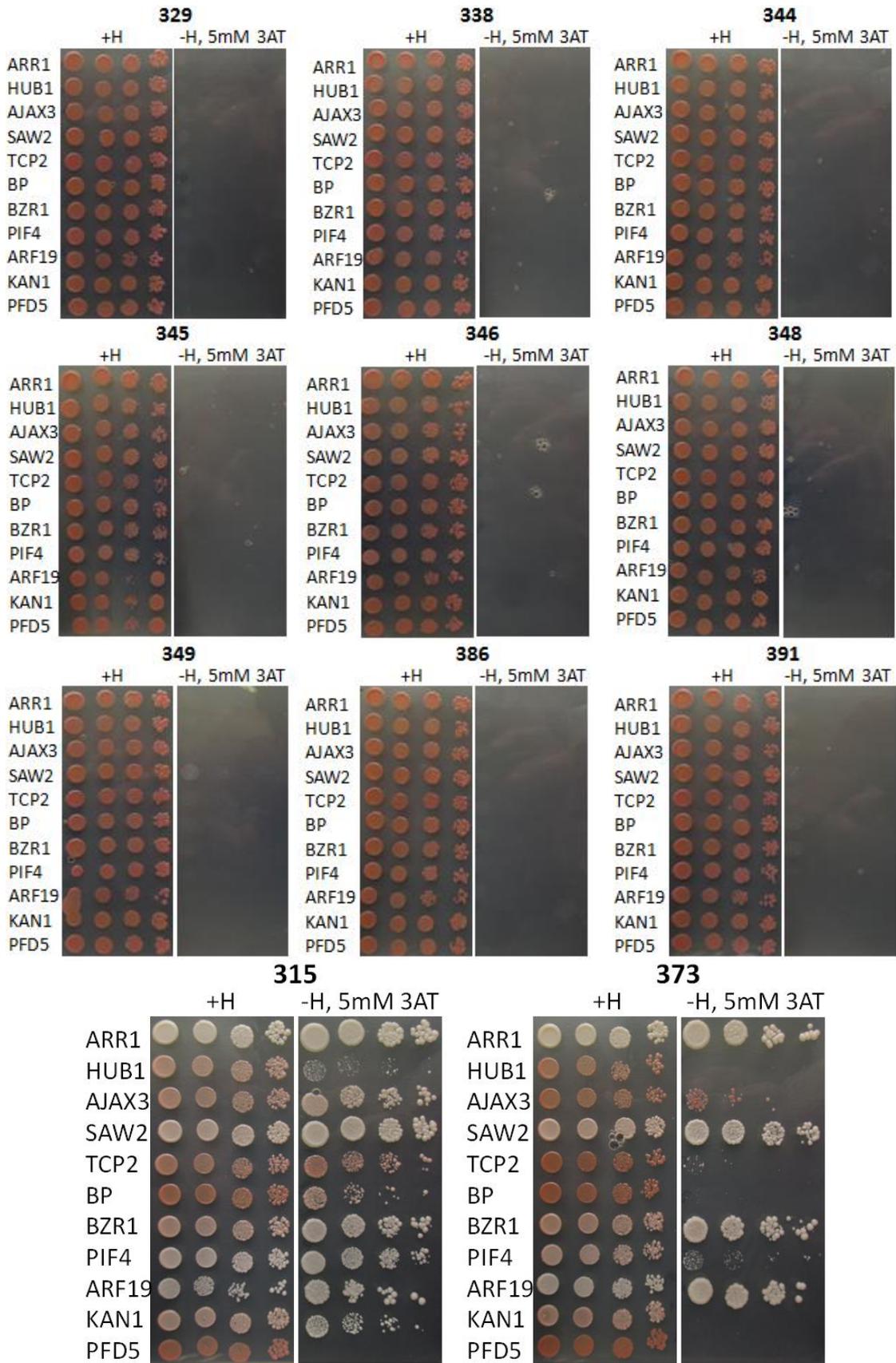
Para determinar la capacidad de los 10 alelos candidatos de M5GAI para interactuar con otros interactores descritos en la bibliografía se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido frente a 10 de los factores de transcripción más interesantes en los objetivos actuales del laboratorio: AJAX3, HUB1, PFD5, ARF19, BZR1, SAW2, KNAT1, TCP2, KAN1 Y PIF4; además de con ARR1. Para ello, se transformó la cepa haploide de levadura Y187 con las 10 versiones mutadas de M5GAI y la versión silvestre y se transformó la cepa haploide de levadura Y2H Gold con los 11 factores de transcripción seleccionados (Tabla 6).

Cepa de levadura	Vector	Gen	Dominio GAL4
Y187	pDEST32	M5GAI (315)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (329)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (338)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (344)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (345)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (346)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (348)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (349)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (373)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (386)	DBD
Y187	pDEST32	M5GAI (391)	DBD
Y2H Gold	pDEST22	ARR1	AD
Y2H Gold	pDEST22	AJAX3	AD
Y2H Gold	pDEST22	HUB1	AD
Y2H Gold	pDEST22	PFD5	AD
Y2H Gold	pDEST22	ARF19	AD
Y2H Gold	pDEST22	BZR1	AD
Y2H Gold	pDEST22	SAW2	AD
Y2H Gold	pDEST22	KNAT1	AD
Y2H Gold	pDEST22	TCP2	AD
Y2H Gold	pDEST22	KAN1	AD
Y2H Gold	pDEST22	PIF4	AD

**Tabla 6:** Detalle de las construcciones introducidas en las cepas haploides de levadura para obtener cepas diploides mediante “mating” para el ensayo de doble híbrido.

Se utilizó la capacidad de cepas haploides compatibles para fusionarse y generar cepas diploides (proceso denominado “*mating*”), para obtener cepas de levadura diploides con todas las combinaciones de los alelo M5GAI con interactores en medio selectivo SD-L-W. El ensayo de doble híbrido se llevó a cabo obteniendo cultivos líquidos de cada una de las cepas diploides obtenidas, y realizando diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000 en agua estéril. Se fueron depositando 5µl de cada una de estas diluciones de manera ordenada en placas control (SD -L-W), placas con medio de selección (SD-L-W-H), y en placas con 5mM de 3AT (Figura 11). El control silvestre 315 creció en las placas SD-L-W-H +3AT con todos los interactores con excepción de PFD5, por lo que no lo consideramos para la evaluación de las interacciones de los alelos M5GAI con mutaciones, y el crecimiento con HUB1 tampoco fue óptimo aunque hubo un leve crecimiento. Los alelos M5GAI candidatos no crecieron con ninguno de los interactores utilizados, indicando una pérdida de interacción con todos. Curiosamente, fue el alelo 373, el que había mostrado discrepancia entre la secuencia identificada en la PCR de levadura y el vector recuperado en *E. coli*, el que mostró un patrón esperable para un alelo arístico: pérdida de interacción con HUB1, BP y KAN1, debilitamiento de la interacción con AJAX3, TCP2 y PIF4, y mantenimiento de la interacción con ARR1, SAW2, BZR1 y ARF19. Fue sorprendente observar crecimiento con ARR1, ya que el rastreo empleado era para seleccionar pérdida de interacción con este factor de transcripción, siendo la única explicación que la colonia original de levadura contenía una mezcla de plásmidos.

# RESULTADOS



**Figura 11:** Resultados de los ensayos de doble híbrido realizados con las 10 versiones de M5GA1 seleccionadas en los ensayos por color frente ARR1 y la versión sin mutaciones (315).

**4.2.3.5 Ensayos de BiFC.**

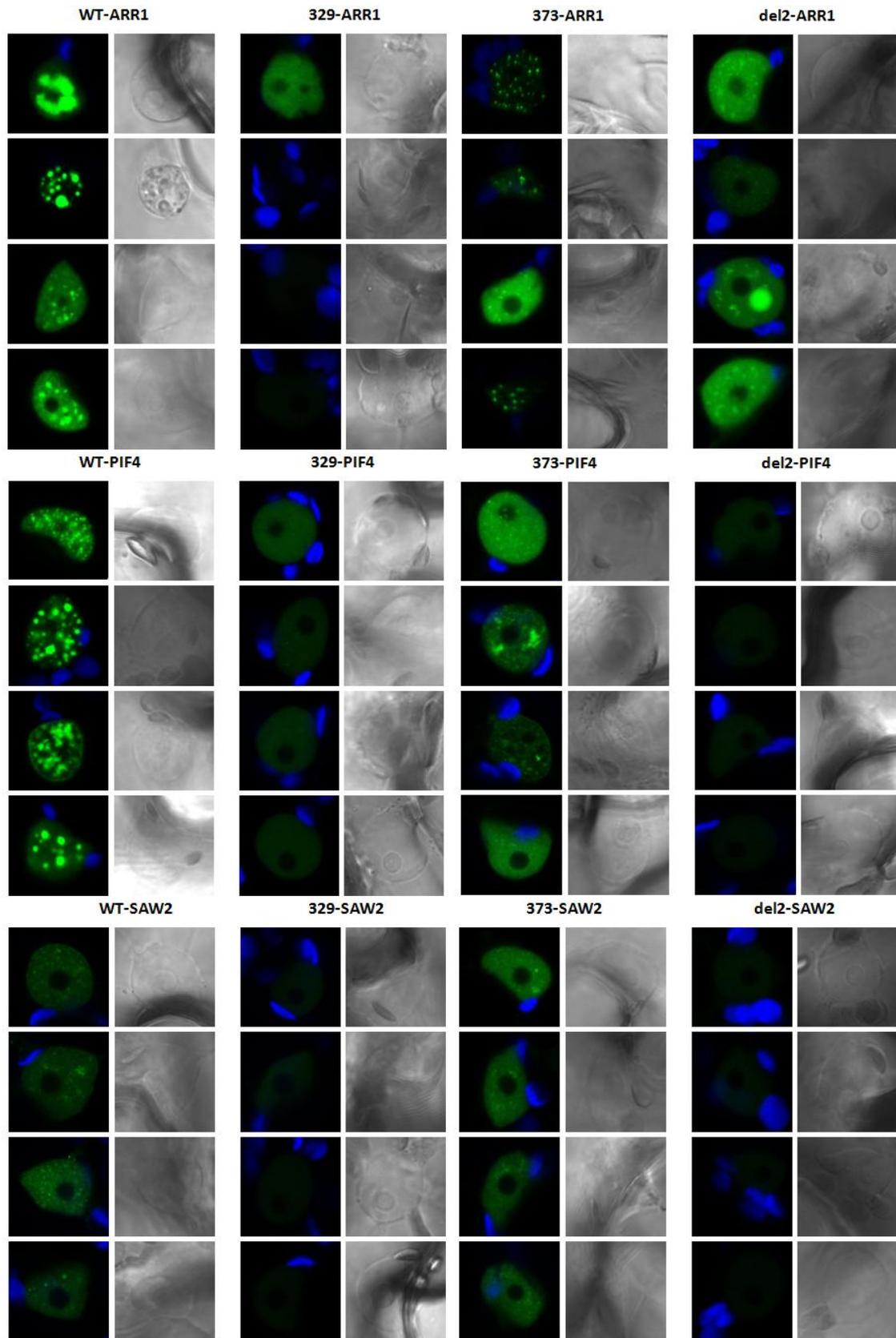
Como paso previo al establecimiento de líneas transgénicas estables, utilizamos la técnica de BiFC para verificar en expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* las interacciones determinadas por doble híbrido. Las secuencias de M5GAI desde el vector pDEST32 se pasaron al vector pDONR221 mediante PCR y reacción BP. Por limitaciones de tiempo del presente TFM se han comprobado las interacciones de alelo M5GAI-373 sólo frente a los interactores PIF4, SAW2 y ARR1, utilizando M5GAI-315 como control positivo. Se decidió comprobar la pérdida de interacciones de otro de los alelos y se utilizó el alelo M5GAI-329. Como control negativo de la BiFC se decidió utilizar la delección del2GAI, que carece de gran parte de la secuencia en amino-terminal, y que toda la información, tanto en la bibliografía como en nuestro laboratorio, indica que no interactúa con ningún interactor. Mediante reacciones LR se transfirieron los alelos M5GAI y los interactores PIF4, SAW2 y ARR1, a los vectores pMDC43-YFN y pMDC43-YFC (tabla 7). Se introdujeron cada una de las construcciones en *Agrobacterium tumefaciens* para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se observó la fluorescencia emitida por la reconstitución de la proteína YFP mediante microcopía confocal (Figura 12).

Vector	Gen
pYFC	M5GAI (WT)
pYFC	del2GAI
pYFC	M5GAI (329)
pYFC	M5GAI (373)
pYFN	SAW2
pYFN	ARR1
pYFN	PIF4

**Tabla 7:** Detalle de las construcciones generadas para los ensayos de BiFC.

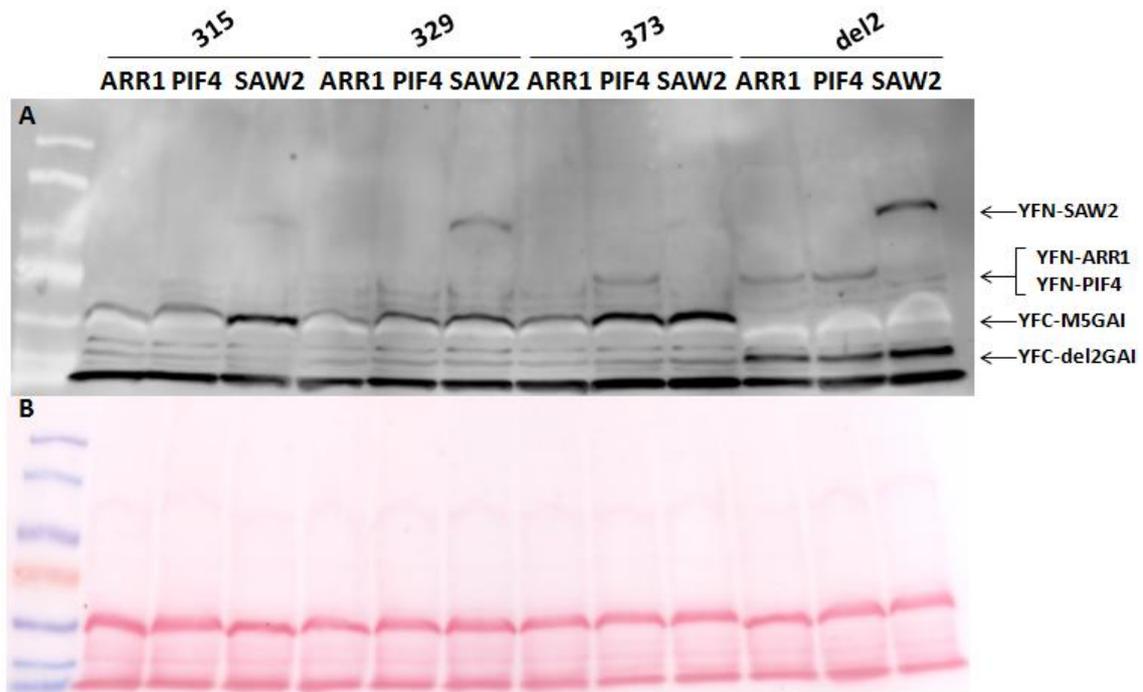
La interacción de alelo silvestre M5GAI-315 con los tres interactores se refleja en la formación de puntos intensos de fluorescencia en los núcleos de las células transformadas (en inglés “speckles”) (Figura 12). El control negativo utilizado, del2GAI, no mostró interacción ni con SAW2 ni con PIF4, aunque sorprendentemente sí se formaron “speckles” con ARR1. Aunque inesperado, en realidad este resultado refleja el hecho de que cualquier sistema heterólogo tiene un margen de error y de falsos positivos/negativos, si bien serían necesarias más pruebas, incluyendo interacción *in vivo* en *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, el alelo M5GAI-329, que en el ensayo de doble híbrido mostraba una pérdida total de interacción, mostró un comportamiento equivalente en BiFC, y en ningún caso se observó la aparición de speckles. En el mismo sentido, el alelo M5GAI-373 dio lugar a la formación de “speckles” con ARR1 y SAW2 equivalentes a los observados con el alelos silvestre. También se observó interacción con PIF4 aunque en comparación con M5GAI-315 los “speckles” parecen claramente de inferior intensidad, lo que resulta muy interesante ya que en el ensayo de doble híbrido se observaba un debilitamiento de la interacción.

## RESULTADOS

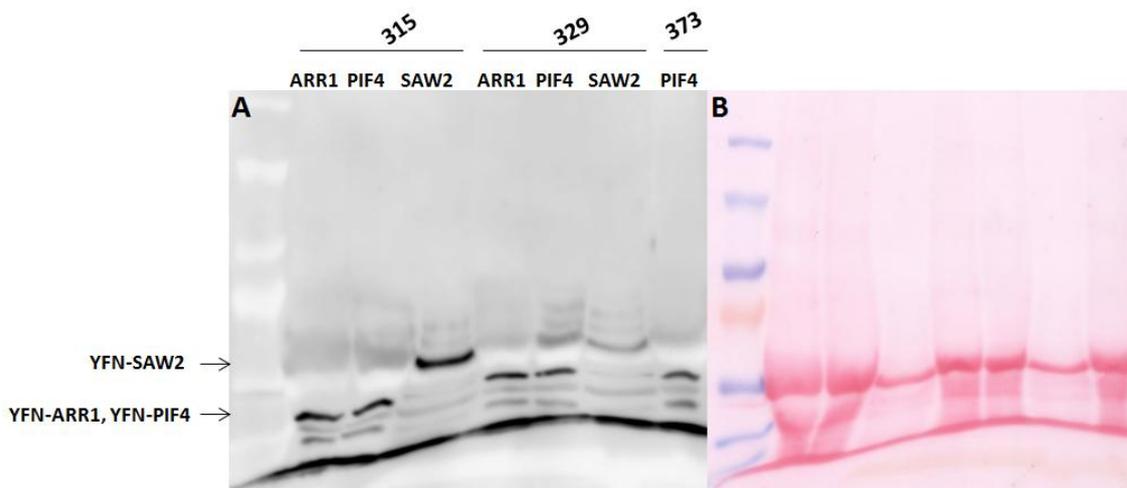


**Figura 12:** Imágenes del ensayo de BiFC realizado en las que se muestra la luminiscencia verde emitida por la recomposición de la YFP cuando se da interacción entre los factores de transcripción ARR1, PIF4 y SAW2 y las versiones de MSGAI 315, 329, 373 y del2.

Se verificó la presencia proteica de las diferentes versiones de YFC-M5GAI (315, 329, 373; 56 KDa), YFC-del2GAI (39 KDa) y de los factores de transcripción YFN-PIF4 (69 KDa), YFN-ARR1 (68 KDa) e YFN-SAW2 (95 KDa) en las muestras del ensayo de BiFC por Western Blot. La detección de YFC-M5GAI e YFC-del2GAI se correspondió perfectamente a lo esperado. Mientras que en las muestras en las que se expresa YFC-del2GAI se detectó correctamente a los tres interactores con YFN, en las muestras con los diferentes alelos de M5GAI, no se detectó la banda correspondiente a YFN-PIF4 ni a YFN-ARR1 en las muestras que coexpresan YFC-M5GAI-315 o YFC-M5GAI-329 y tampoco se detecta YFN-PIF4 en la coexpresión con YFC-M5GAI-373 (Figura 13). Se repitió el Western-Blot para dichas muestras cargando una mayor cantidad de proteína total y se consiguió detectar las bandas esperadas (Figura 14).



**Figura 13:** (A), detalle de la membrana del primer western realizado de las muestras empleadas en los ensayos de BiFC hibridada con el anticuerpo secundario (ab 290). (B), Membrana del primer western realizado de las muestras empleadas en los ensayos de BiFC teñido con rojo Ponceau.

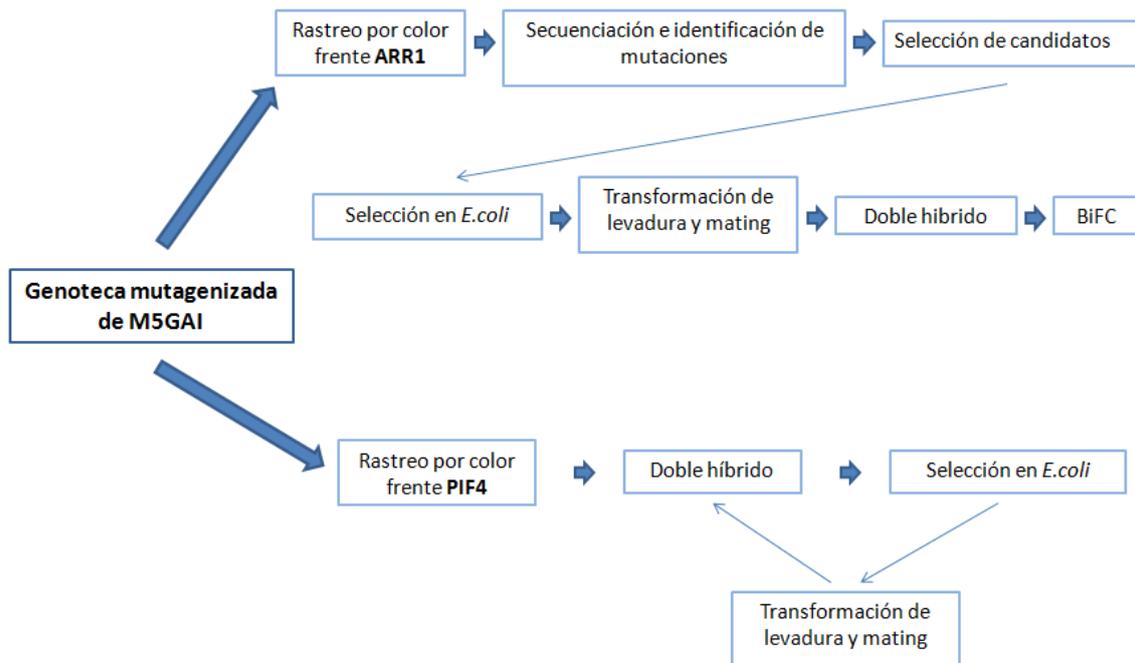


**Figura 14:** (A), detalle de la membrana del segundo western realizado de las muestras empleadas en los ensayos de BiFC hibridada con el anticuerpo secundario (ab 290). (B), Membrana del segundo western realizado de las muestras empleadas en los ensayos de BiFC teñida con rojo Ponceau.

#### 4.2.4 Rastreo de versiones de M5GAI incapaces de interactuar con PIF4

Con el rastreo de ARR1 solo pudimos identificar un alelo arístico. Aunque no puede descartarse que justamente ARR1 no sea un interacto óptimo para la búsqueda de arísticos, consideramos la modificación de la estrategia de rastreo con PIF4. Se ha considerado que un paso restrictivo ha sido la selección previa de los candidatos para recuperar de las colonias seleccionadas y evaluar con otros interactores: 1) la selección de mutaciones únicas elimina las posibilidades de alelos arísticos con varias mutaciones, y 2) hacer una selección reducida de candidatos sin conocer el efecto de los cambios ha demostrado ser una mala decisión. De hecho, el único arístico encontrado con ARR1 en realidad no había sido seleccionado. Por esta razón se descartó la secuenciación de las colonias de levadura y se evaluó la capacidad de interacción de todos los candidatos con otros interactores por doble híbrido. Los posibles arísticos así identificados se decidió que fueran secuenciados más adelante para identificar sus mutaciones.

La secuenciación de colonias rojas, rosas y blancas, mostró diferencias claras entre estos tres grupos, por lo que la selección de color sigue resultando atractiva por su sencillez. En cualquier caso, se puede mejorar la selección en este paso mediante una evaluación del crecimiento en placas selectivas sin histidina. En la figura 15 se detallan esquemáticamente de las dos estrategias seguidas.

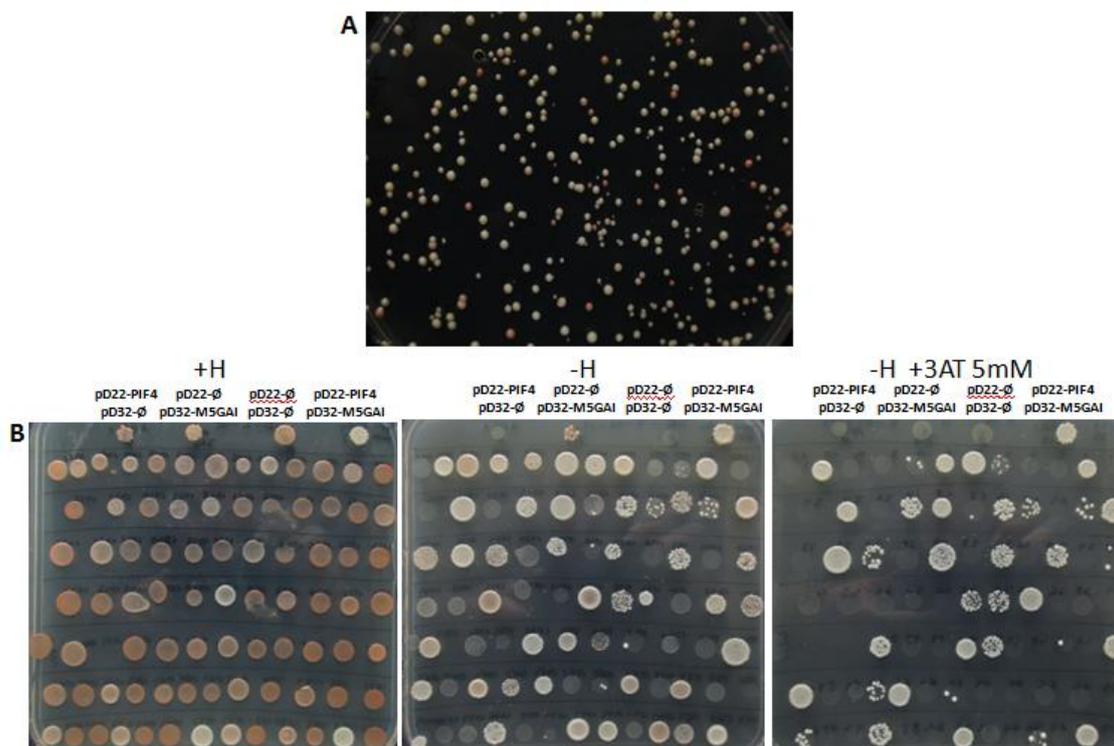


**Figura 15:** Esquema de las dos diferentes estrategias empleadas en este trabajo para la obtención de alelos arísticos.

#### 4.2.4.1 Selección de los alelos M5GAI candidatos a arísticos

La cepa de levadura Y2H-Gold se transformó con el vector pDEST22-PIF4. El rastreo se realizó en medio SD-L-W transformando la cepa Y2H-Gold-PIF4 con la genoteca pDEST32-M5GAI (Figura 16 A). Se descartaron todas las colonias blancas y el resto de colonias se replicaron en placas SD-L-W, SD-L-W-H y SD-L-W-H +3AT(5mM) (Figura 16 B). Cuando ni PIF4 ni M5Gai se expresan o cuando sólo se expresa PIF4, la levadura sólo crece en el medio SD-L-W; cuando sólo se expresa M5GAI la levadura crece también en SD-L-W-H (debido a la leve autoactivación de M5GAI); la interacción entre PIF4 y M5GAI permite crecer a la levadura incluso con 5 mM de 3AT. Los candidatos interesantes son aquellos que crecen en SD-L-W-H pero no lo hacen en presencia de 5 mM 3AT, indicando que se ha perdido la interacción. Se seleccionaron hasta 94 colonias que crecían en ausencia de histidina y no crecían en presencia de 5 mM 3AT.

## RESULTADOS



**Figura 16:** Detalle de la coloración de las colonias obtenidas en la transformación de Y2HGold pDEST22-PIF4 con la genoteca en pDEST32 (A). Detalle de las distintas colonias rosas seleccionadas en la selección por color frente PIF4 sometidas a selección por interacción con PIF4 en medio con histidina (+H), sin histidina (-H) y sin histidina con 5mM 3AT (-H +3AT 5mM) (B).

### 4.2.4.2 Ensayos de doble híbrido de los candidatos a arísticos

Como hemos comentado anteriormente, no se realizó secuenciación de las levaduras seleccionadas, directamente se extrajo ADN plasmídico de todas y se transformó *E.coli* seleccionando para la resistencia del vector pDEST32 (gentamicina). Se obtuvieron colonias en 75 de las 94 transformaciones, de las que se seleccionó una colonia y se obtuvo ADN plasmídico con el que se transformó la cepa Y187. Todas las combinaciones posibles entre candidatos (cepa Y187) e interactores (cepa Y2H-Gold: TCP2, KAN1, ARF19, PIF4, BZR1, SAW2, AJAX3 Y ARR1; Tabla 6) se obtuvieron mediante “mating”.

A diferencia de la estrategia seguida con ARR1, con PIF4 el número de ensayos de doble híbrido fue mucho mayor por lo que para agilizar este paso, y en base a la experiencia de los ensayos de doble híbrido con los interactores, sólo utilizamos una dilución (1/100) y tres placas de selección: SD-L-W, SD-L-W-H y SD-L-H +3AT(5mM). El crecimiento en la placa con 3AT reflejó el mantenimiento de la interacción del alelo M5GAI expresado.

Como se muestra en el apéndice 1, si comparamos el crecimiento de las levaduras de las diferentes versiones mutantes de M5GAI con el crecimiento de la versión no mutada 315 podemos destacar que 29 de los 75 candidatos a alelos arísticos seleccionados en esta estrategia perdieron totalmente su capacidad de

interacción con los 8 factores de transcripción estudiados y por lo tanto deben ser descartados como candidatos. Por el contrario las versiones mutantes 850, 887, 901 y 907 conservaron inalterada su capacidad de interacción con los 8 factores de transcripción estudiados. Sin conocer su comportamiento frente a otros factores de transcripción tampoco podemos considerar estas cuatro versiones de M5GAI como candidatos.

Las 45 versiones restantes serían potenciales alelos arísticos ya que al comparar su crecimiento con el que presenta la versión 315 sin mutaciones encontramos tanto interacciones inalteradas como pérdida total de interacción con alguno de los factores de transcripción estudiados. En la figura 17 podemos observar una tabla resumen de las interacciones que presentaron estos 45 alelos arísticos encontrados. Unos resultados que ponen de manifiesto que, si una vez secuenciados se confirma que son 45 versiones diferentes de M5GAI, con esta segunda estrategia de obtención de alelos arísticos hemos conseguido obtener cerca de 6 veces más candidatos, por número de versiones mutantes estudiadas, que con la primera estrategia en la que se llevaba a cabo una caracterización previa de las mutaciones.

Como podemos observar en la figura 18 las interacciones con ARF19 y ARR1 parecen ser las más repetidas, 33 veces. Las interacciones con PIF4 son las más escasas, solo en 3 ocasiones, y cuando aparecen lo hacen generalmente de manera débil. Algo esperado ya que el rastreo por color e interacción en esta segunda estrategia ha sido frente a PIF4. El crecimiento observado para AJAX3 y KAN1 es también muy escaso, únicamente lo observamos frente 7 y 6 versiones mutantes de M5GAI respectivamente. TCP2 y BZR1 presentan interacción con 13 y 16 alelos mutantes respectivamente y SAW con 21.

## RESULTADOS

	ARR1	ARF19	SAW2	BZR1	KAN1	TCP2	AJAX3	PIF4
gai-930								
gai-945								
gai-807								
gai-864								
gai-873								
gai-915								
gai-940								
gai-860								
gai-874								
gai-934								
gai-920								
gai-923								
gai-782								
gai-831								
gai-871								
gai-914								
gai-926								
gai-939								
gai-946								
gai-783								
gai-785								
gai-787								
gai-828								
gai-832								
gai-913								
gai-918								
gai-925								
gai-933								
gai-947								
gai-941								
gai-795								
gai-890								
gai-931								
gai-909								
gai-885								
gai-944								
gai-912								
gai-919								
gai-916								
gai-882								
gai-898								
gai-911								
gai-884								
gai-896								
gai-853								

**Figura 17:** Resumen de las interacciones mostradas por los 45 alelos arísticos obtenidos en los ensayos de doble híbrido realizados con las 75 versiones de M5GAI seleccionadas en los ensayos por color e interacción frente PIF4.

## 5. Discusión

Con la intención de generar nuevas herramientas biotecnológicas para el estudio y utilización de las proteínas DELLA este trabajo ha tenido como objetivo identificar alelos “arísticos” de M5GAI, versiones mutadas de esta proteína que pierden su capacidad natural de interacción con ciertos interactores mientras la mantienen con otras proteínas. Con la genoteca creada seguimos dos metodologías diferentes para la obtención de alelos arísticos.

### Rastreo con ARR1

La primera de ellas, en la que se llevó a cabo la secuenciación y selección previa de candidatos no fue demasiado exitosa en cuanto a número de arísticos obtenidos, sólo se identificó uno (gai-373). No obstante, el primer paso de selección por color frente ARR1 nos sirvió para estudiar la distribución de las mutaciones en la secuencia y en la estructura tridimensional de las colonias rojas, rosas y blancas obtenidas. Como era de esperar la mayoría de secuencias de colonias blancas no presentaban mutaciones o eran mutaciones sinónimas, sólo unas pocas daban lugar a cambio de aminoácido y este no afectaba a la interacción. En el caso de las colonias rojas la distribución no mostraba ningún patrón aparente y se situaban en su mayoría en la parte interna de la estructura tridimensional de la proteína, agrupadas en la zona superior e inferior de la estructura, previsiblemente afectando estructuralmente el plegamiento de la proteína. De las 124 colonias rosas secuenciadas todas ellas presentaban mutaciones y sí mostraban un patrón, coincidiendo una buena parte de las mutaciones en varias zonas concretas de la secuencia. La concentración de cambios de aminoácido en estas colonias rosas se produce principalmente en los dominios descritos de esta proteína (LHR1, NLS, VHIID, LHR2, LXXLL). En la estructura tridimensional las mutaciones aparecen en la mayoría de los casos en el interior de la proteína y en dos regiones diferenciadas. Un grupo de mutaciones se sitúan en la parte superior de la estructura y aparece otra agrupación en la parte inferior de la misma. Este hecho podría indicar que cambios en estas posiciones provocarían alteraciones en la conformación de la proteína que modificarían las posiciones de los aminoácidos de superficie, alterando la capacidad de interacción con ARR1.

A pesar del poco éxito de la estrategia seguida con ARR1, hemos sido capaces de identificar un alelo arístico que no interacciona con BP, HUB1 y PFD5, y tiene debilitada la interacción con PIF4, TCP2 y AJAX3. La interacción de gai-373 con SAW2, ARR1 y PIF4 fue observada mediante BiFC en planta, correspondiéndose con lo observado en levadura, y aunque es necesario realizar el mismo tipo de verificaciones con el resto de interactores, la ausencia de interacción con gai-329 nos sugiere que con seguridad la mayoría de las interacciones (o ausencia de ellas) observadas en levadura serán funcionales en planta. No obstante, cabe destacar la interacción identificada entre ARR1 y del2GAI, que demuestra que un sistema heterólogo presenta siempre un cierto grado de falsos positivos/negativos.

## DISCUSIÓN

### Rastreo con PIF4

De acuerdo a la experiencia con el rastreo de ARR1, modificamos el protocolo en el caso del rastreo de PIF4 y se ha demostrado una significativa mejora en la eficiencia, ya que hemos sido capaces de identificar 45 alelos arísticos. Es evidente que no limitar el número de candidatos de forma previa al ensayo de doble híbrido es un cambio importante. También debemos resaltar que el cribado mediante crecimiento en medio selectivo, para eliminar candidatos que no crecieran en medio sin histidina ha debido influir en el elevado porcentaje de arísticos válidos entre los seleccionados. Así mismo, la utilización de una única concentración de 3AT para el ensayo de doble híbrido con los interactores y una única dilución del cultivo de levadura, agilizó todo el ensayo y permitió evaluar un gran número de candidatos en menor tiempo.

La tabla de interacciones de los arísticos identificados refleja también un dato interesante: la mayoría de los arísticos mantienen la capacidad de interacción con ARR1 y ARF19. Teniendo en cuenta la naturaleza de cada interactor utilizado, debe observarse que el resto de interactores son bHLH o bHLH like, lo que sugiere que al realizar el rastreo con PIF4 hemos obtenido un sesgo hacia mutaciones que afectan las interacciones con este tipo de factores de transcripción. Esto podría estar sugiriendo que puede existir una región en la proteína GAI que es la que establece la interacción con todos los factores de interacción de tipo bHLH, aunque también existan residuos específicos para cada interactor de tipo bHLH. Esta información y posteriores datos pueden ser de gran utilidad para definir y explicar la enorme capacidad de interacción de las proteínas DELLA.

### Mejoras de la estrategia del rastreo

En base a la experiencia adquirida, los futuros rastreos que se tiene planificado realizar en el laboratorio seguirán fundamentalmente el protocolo utilizado con PIF4, que ha demostrado ser una eficiente metodología. No obstante, existen algunas limitaciones.

En el caso de PIF4 y ARR1 la interacción con GAI es muy fuerte, sin embargo existen interactores con interacciones más débiles que por ejemplo no dan lugar a colonias blancas. En estos casos resulta imposible realizar una selección inicial por color. En estos casos existen dos opciones:

1. Emplear la estrategia definida con PIF4, pero usando todas las colonias obtenidas en la transformación con la genoteca a placas selectivas para descartar todas las que crezcan con la concentración de 3AT a la que la versión silvestre crece, pero sí crecen en placas sin histidina.

2. Utilizar una estrategia de rastreo reverso, como la que puede realizarse utilizando 5-FOA, que es sustrato de la actividad de HIS3 dando lugar a un producto tóxico. En este caso es la ausencia de interacción, y por tanto la ausencia de activación de HIS3, lo que permite crecer a la levadura. La limitación de esta

metodología reside en el ajuste preciso de la concentración de 5-FOA, que no resulta fácil.

### Perspectivas futuras

En primer lugar, se ha iniciado la repetición del rastreo con ARR1 con la estrategia actual. Hay dos aspectos que lo justifican: (i) si el rastreo con PIF4 ha permitido identificar alelos que parecen perder la interacción con todos los bHLH y bHLH like, el rastreo con ARR1 (y en el futuro ARF19) puede permitirnos obtener nuevos alelos que mantengan las interacciones con todos los bHLH; y (ii) se debe explorar también la posibilidad de que ARR1 no sea un interactor óptimo para el rastreo de arísticos y que los alelos que dejen de interactuar con él pierdan la capacidad de interactuar con el resto de interactores. El resultado del rastreo actual nos dará las respuestas.

La identificación de un total de 46 alelos arísticos abre muchas posibilidades tanto a nivel de investigación como de aplicaciones biotecnológicas.

En primer lugar, todos los candidatos deberán ser identificados por secuenciación (está en proceso y seguramente estará ya disponible en el momento de presentar este trabajo, pero no ha sido posible incluirlo en la memoria), lo que permitirá evaluar las mutaciones presentes. Una vez con esta información y con la información de interacciones se podrán seleccionar los candidatos más prometedores (porque es imposible analizar todos) y realizar una contrastación de las interacciones mediante BiFC.

A nivel de la investigación básica, todos los arísticos que se identifiquen presentan enormes potenciales, ya que permiten generar subdivisiones de la red de interacciones de las proteínas DELLA. Una vez introducidas en plantas, por ejemplo en fondo carente de DELLAs, se puede estudiar de forma más precisa las implicaciones funcionales de la pérdida de determinadas interacciones. Sin duda esta información será útil para entender tanto las diferentes funciones de las DELLA como las funcionalidades de las interacciones entre rutas de señalización, pero también será una valiosa información para el estudio de las redes de regulación y los efectos de la pérdida de su complejidad sobre la plasticidad y robustez de todos los procesos del desarrollo de los seres vivos, aspectos fundamentales para la adaptación y la supervivencia.

El balance entre respuesta a estrés y crecimiento sigue siendo una cuestión importante con grandes implicaciones en la producción agraria. Conseguir arísticos que sean capaces de activar las respuestas de adaptación a estrés sin comprometer el crecimiento, y por tanto la producción, tendría un importante impacto en la agricultura.



## **6. Conclusión**

Hemos podido establecer un método eficiente de rastreo en levadura que nos ha permitido identificar un total de 46 alelos arísticos de GAI. La identificación de arísticos con diferentes combinaciones de pérdida de interacción demuestra, no sólo que es posible identificar este tipo de alelos para las proteínas DELLA, si no que pone de manifiesto también que estas proteínas establecen sus múltiples interacciones con diferentes regiones de su superficie, una cuestión debatida y sin respuesta hasta el momento y que ahora podremos empezar a responder.



## 7. Bibliografía

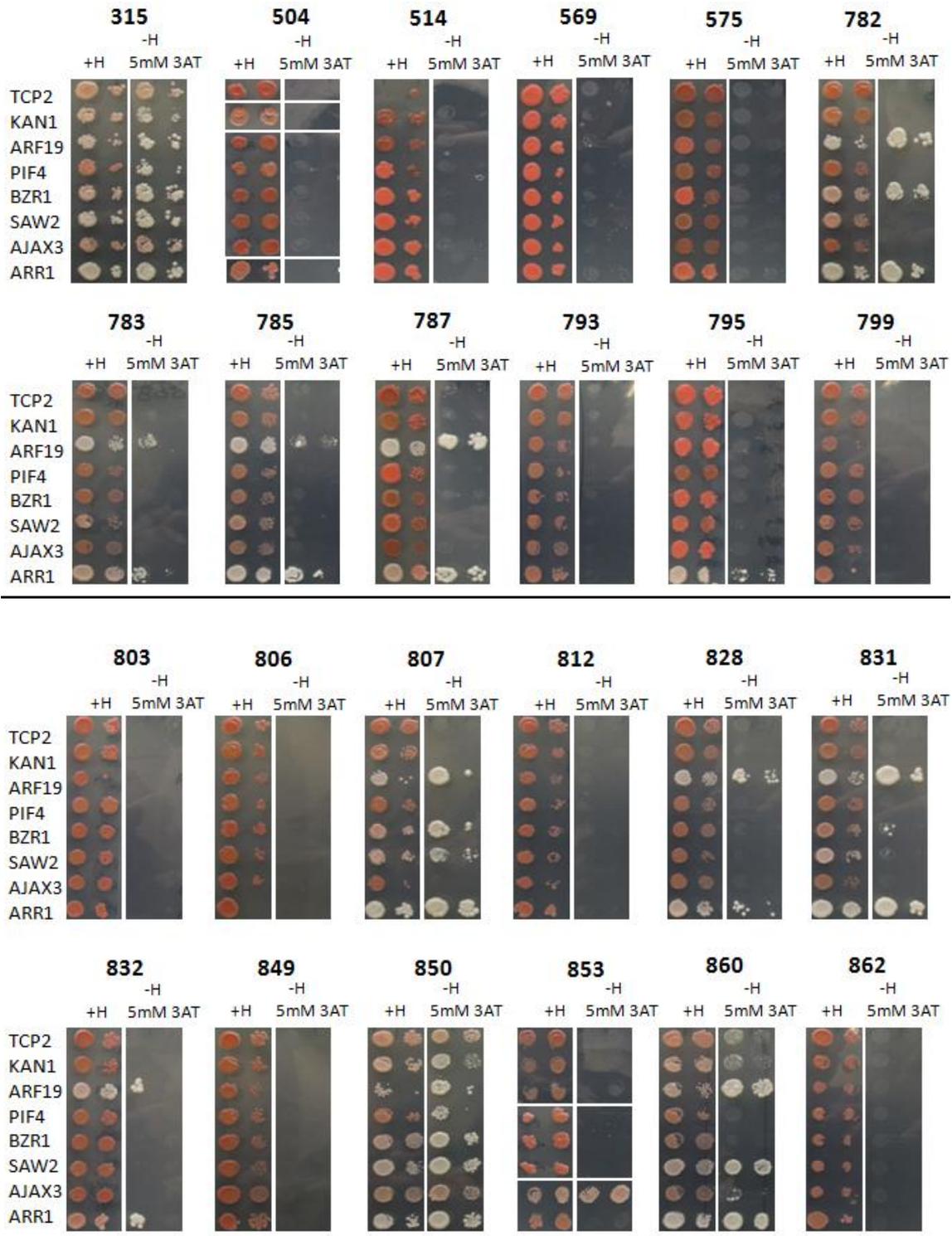
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816–2825
- Alabadi D (2004) Gibberellins Repress Photomorphogenesis in Darkness. *PLANT Physiol* 134: 1050–1057
- Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, Lawrenson T, Sablowski R, ??stergaard L (2010) Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 24: 2127–2132
- Bai M-Y, Shang J-X, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T-P, Wang Z-Y (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 14: 810–7
- Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683–692
- Casal JJ, Fankhauser C, Coupland G, Blázquez MA (2004) Signalling for developmental plasticity. *Trends Plant Sci* 9: 309–314
- Crocco CD, Locascio A, Escudero CM, Alabadí D, Blázquez MA, Botto JF (2015) The transcriptional regulator BBX24 impairs della activity to promote shade avoidance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms7202
- Davière J-M, Achard P (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* 140: 1147–51
- Dill A, Jung HS, Sun TP (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14162–7
- Dill A, Sun TP (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777–785
- Dreze M, Charlotheaux B, Milstein S, Vidalain P-O, Yildirim M a, Zhong Q, Svrzikapa N, Romero V, Laloux G, Brasseur R, et al (2009) “Edgetic” perturbation of a *C. elegans* BCL2 ortholog. *Nat Methods* 6: 843–9
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, et al (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475–9
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340: 245–246
- Fleet CM, Sun TP (2005) A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 77–85
- Galinha C, Bilsborough G, Tsiantis M (2009) Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Semin Cell Dev Biol* 20: 1149–1156
- Gallego-Bartolome J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadi D, Blazquez MA (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 109: 13446–13451
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadí D (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between della proteins in *arabidopsis*. *Mol Biol Evol* 27: 1247–1256
- Gray PN, Busser KJ, Chappell TG (2006) A Novel Approach for Generating Full-length, High Coverage Allele Libraries for the Analysis of Protein Interactions. *Mol Cell Proteomics* 6: 514–526
- Hedden P (2001) Gibberellin metabolism and its regulation. *J Plant Growth Regul* 20: 317–318
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523–530

- Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, James Peacock W, Dennis ES (2001) **A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway.** *Plant J* 28: 201–208
- Hirano K, Kouketu E, Katoh H, Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M (2012) **The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity.** *Plant J* 71: 443–453
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H (2010) **DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs.** *Dev Cell* 19: 884–894
- Itoh H, Matsuoka M, Steber CM (2003) **A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling.** *Trends Plant Sci* 8: 492–497
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) **KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities.** *Curr Biol* 15: 1560–1565
- Kumar R, Kushalappa K, Godt D, Pidkowich MS, Pastorelli S, Hepworth SR, Haughn GW (2007) **The Arabidopsis BEL1-LIKE HOMEODOMAIN Proteins SAW1 and SAW2 Act Redundantly to Regulate KNOX Expression Spatially in Leaf Margins.** *PLANT CELL ONLINE* 19: 2719–2735
- Kurepa J, Li Y, Smalle JA (2014) **Cytokinin signaling stabilizes the response activator ARR1.** *Plant J* 78: 157–168
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J (2002) **Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition.** *Genes Dev* 16: 646–658
- Li S, Zhao Y, Zhao Z, Wu X, Sun L, Liu Q, Wu Y (2016) **Crystal Structure of the GRAS Domain of SCARECROW-LIKE7 in *Oryza sativa*.** *Plant Cell* 28: 1025–1034
- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D (2013a) **Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction.** *Curr Biol* 23: 804–809
- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D (2013b) **Genomic analysis of della protein activity.** *Plant Cell Physiol* 54: 1229–1237
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 193: 265–275
- Lucas M, Davière J-M, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S, et al (2008) **A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation.** *Nature* 451: 480–484
- Marín-de la Rosa N, Pfeiffer A, Hill K, Locascio A, Bhalerao RP, Miskolczi P, Grønlund AL, Wanchoo-Kohli A, Thomas SG, Bennett MJ, et al (2015) **Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins.** *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1005337
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun T, Steber CM (2003) **The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase.** *Plant Cell* 15: 1120–30
- Minguet EG, Alabadí D, Blázquez MA (2014) **Gibberellin Implication in Plant Growth and Stress Responses.** *In* PL-S Tran, S Pal, eds, *Phytohormones A Wind. to Metab. Signal. Biotechnol. Appl.* Springer New York, New York, NY, pp 119–161
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) **The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses.** *Genes Dev* 11: 3194–3205
- Robzyk K, Kassir Y (1992) **A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast.** *Nucleic Acids Res* 20: 3790
- la Rosa NM -d., Sotillo B, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, Onate-Sanchez L, Holdsworth MJ, Bhalerao R, Alabadi D, et al (2014) **Large-Scale Identification of Gibberellin-Related Transcription Factors Defines Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as Functional DELLA Partners.** *PLANT Physiol* 166: 1022–1032

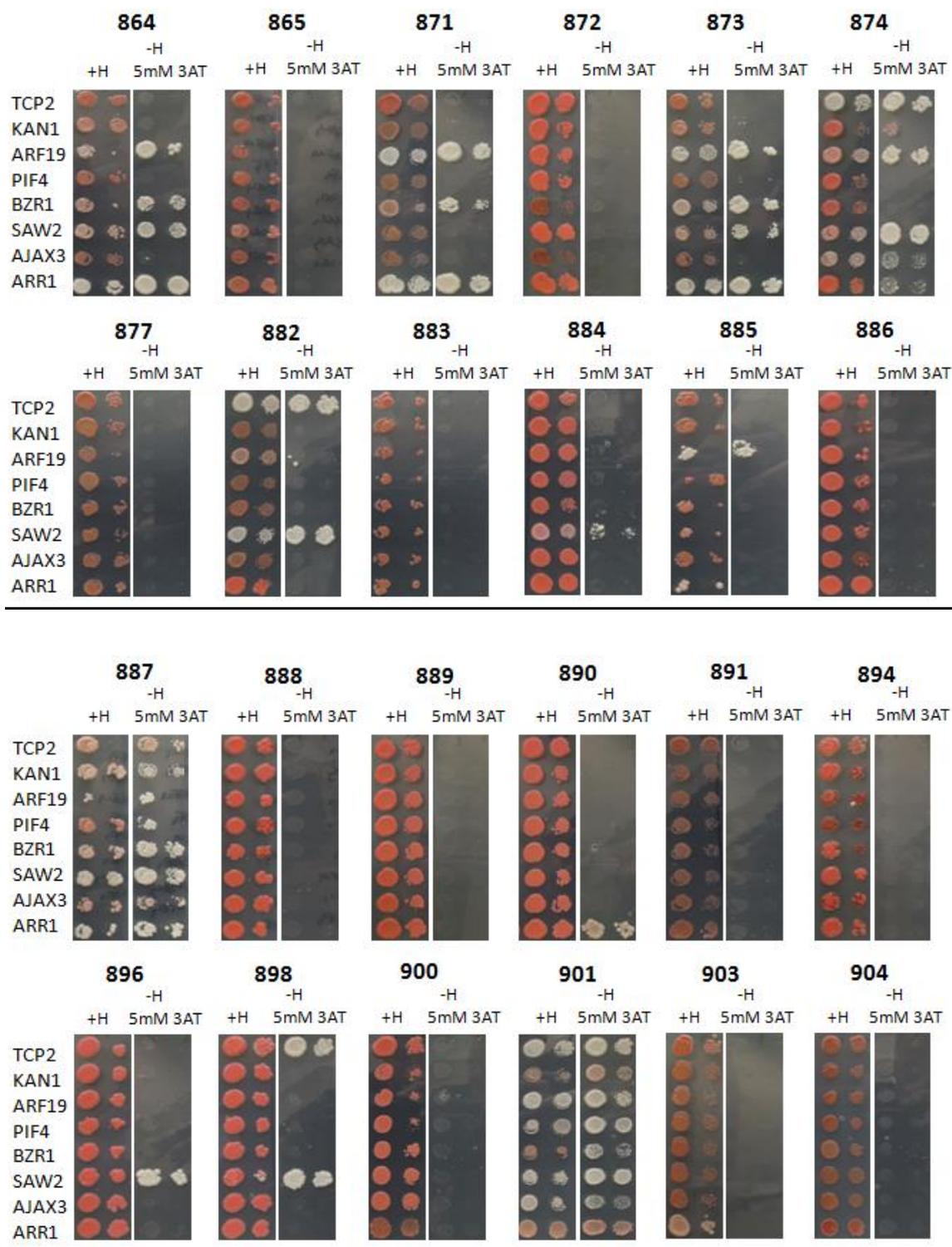
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, et al (2003) **Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. Science (80- ) 299: 1896–1898**
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, et al (2006) **Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: Phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. Plant J 48: 354–366**
- Silverstone a L, Ciampaglio CN, Sun T (1998) **The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. Plant Cell 10: 155–169**
- Taiz L, Zeiger E (2006) **Fisiología Vegetal. Fisiol. Veg. p 536,537**
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T, Hsing YC, Kitano H, Yamaguchi I, et al (2005) **GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature 437: 693–698**
- Ugolini S, Bruschi C (1997) **The red/white colony color assay in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Epistatic growth advantage of white ade8-18, ade2 cells over red ade2 cells. Curr Genet. doi: 10.1007/s002940050160**
- Vriezen WH, Achard P, Harberd NP, Van Der Straeten D (2004) **Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings is gibberellin dependent. Plant J 37: 505–516**
- Wen C-K, Chang C (2002) **Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. Plant Cell 14: 87–100**
- Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C (2011) **Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 23: 2184–2195**
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM (2004) **Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 7827–7832**
- Yu S, Galvão VC, Zhang Y-C, Horrer D, Zhang T-Q, Hao Y-H, Feng Y-Q, Wang S, Schmid M, Wang J-W (2012) **Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. Plant Cell 24: 3320–3332**

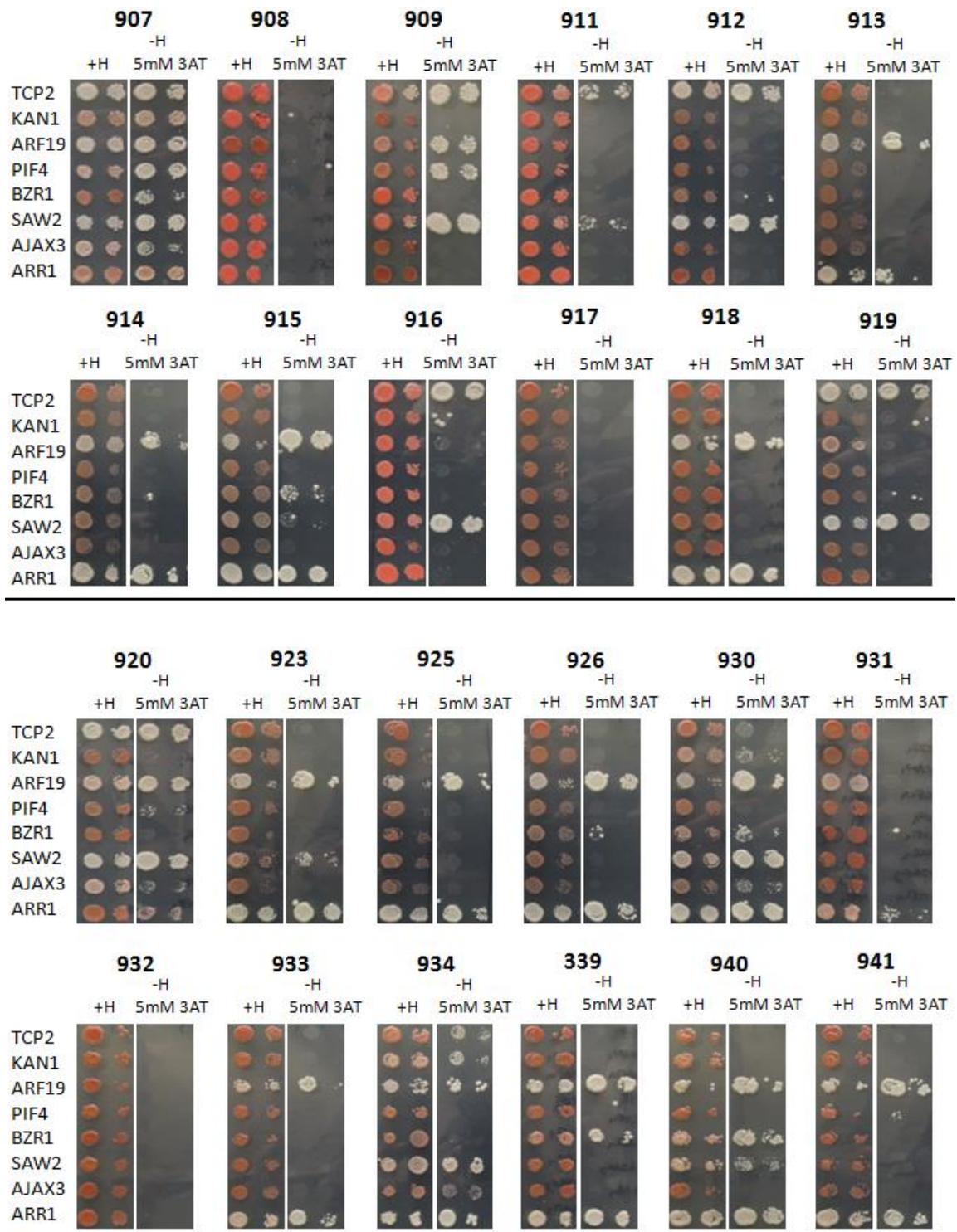


APÉNDICE

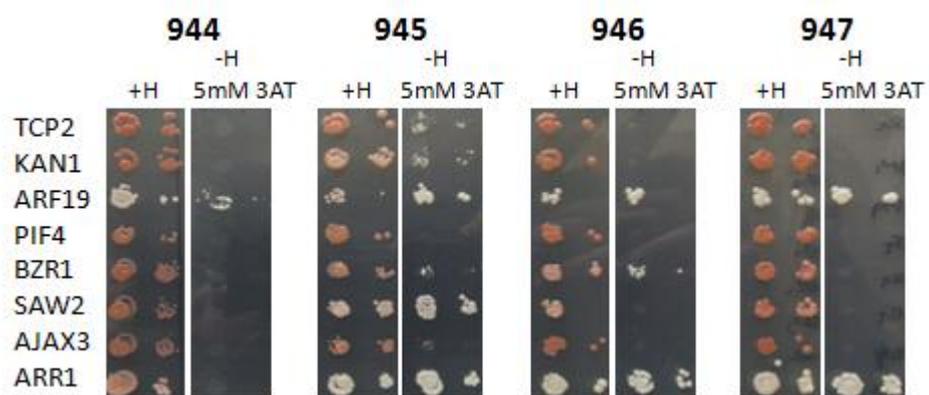


APÉNDICE





## APÉNDICE



**Apéndice 1:** Resultados de los ensayos de doble híbrido realizados con las 75 versiones de M5GAI seleccionadas en los ensayos por color e interacción frente PIF4 y de la versión sin mutaciones (315).