



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Contribución de las proteínas DELLA al funcionamiento de  
enhancers transcripcionales.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Muñoz del Rincón, Raquel

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: ALABADI DIEGO, DAVID

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

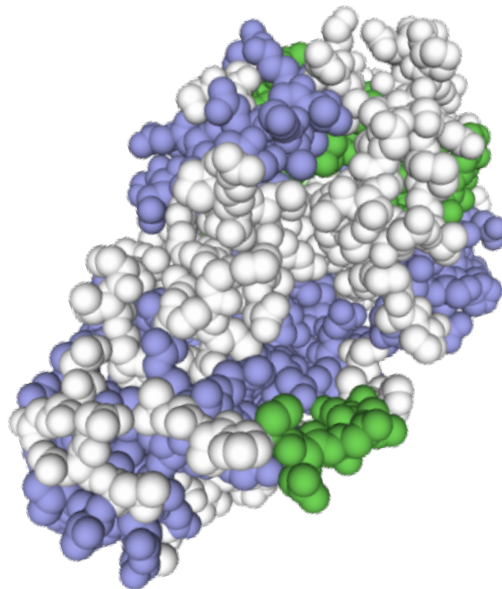


UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# **Contribución de las proteínas DELLA al funcionamiento de “enhancers” transcripcionales.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS



Autor: Raquel Muñoz del Rincón

Tutor: David Alabadí Diego

Curso: 2023/2024



# RESUMEN

Las proteínas DELLA son reguladores transcripcionales específicos de plantas. Uno de los mecanismos por los que la DELLA regula la expresión de genes es interaccionando con factores de transcripción (TFs) mientras estos están unidos a la cromatina, donde actúa como co-activador transcripcional. En el laboratorio, hemos identificado mediante ChIP-seq las regiones de la cromatina donde se une la DELLA de *Arabidopsis* RGA, que corresponden en su mayoría a regiones intergénicas. Nuestro análisis ha mostrado además que esas regiones, o picos de unión, coinciden con zonas abiertas de la cromatina donde también está la RNA polimerasa II, apuntando a que esos sitios, que están alejados del inicio de transcripción, corresponden a “enhancers” transcripcionales. En este TFM hemos caracterizado un “enhancer” transcripcional regulado por RGA en el promotor del gen *GID1a* (su expresión está inducida por DELLAs). El análisis de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan diferentes versiones del promotor *GID1a* fusionado a GUS nos ha permitido determinar que el pico de unión de RGA actúa “enhancer”, siendo necesario y suficiente para conferir regulación a este gen por DELLAs. Además, mostramos que la regulación por DELLAs está mediada, probablemente, por el TF IDD7. Tanto RGA como GAI son capaces de interaccionar con IDD7 en ensayos de doble híbrido en levadura. Ensayos de transactivación en plantas de *Nicotiana benthamiana*, empleando LUC como testigo, nos han permitido mostrar que las DELLA e IDD7 son capaces de activar un promotor mínimo consistente en el “enhancer” de *GID1a* y que actúan, muy probablemente, de manera conjunta.

Palabras clave: DELLA, co-activador, “enhancer”, *GID1a*

# ABSTRACT

DELLA proteins are specific transcriptional regulators in plants. One of the mechanisms through which DELLA regulates gene expression is by interacting with transcription factors (TFs) while they are bound to chromatin, where DELLA acts as a transcriptional co-activator. In the lab, we identified through ChIP-seq the chromatin regions where Arabidopsis RGA's DELLA binds, mostly corresponding to intergenic regions. Our analysis further showed that these regions, or binding peaks, coincide with open chromatin areas where RNA polymerase II is also present, suggesting that these sites, distant from the transcription start, correspond to transcriptional enhancers. In this Master's Thesis, we characterized a transcriptional enhancer regulated by RGA in the promoter of the GID1a gene (whose expression is induced by DELLAs). Analysis of transgenic Arabidopsis lines expressing different versions of the GID1a promoter fused to GUS has allowed us to determine that RGA's binding peak acts as an enhancer, being necessary and sufficient to confer regulation to this gene by DELLAs. Additionally, we demonstrate that regulation by DELLAs is mediated, probably, by the TF IDD7. Both RGA and GAI are capable of interacting with IDD7 in yeast two-hybrid assays. Transactivation assays in *Nicotiana benthamiana* plants, using LUC as a reporter, have allowed us to show that DELLA and IDD7 are able to activate a minimal promoter consisting of the GID1a enhancer and they likely act together.

Keywords: DELLA, co-activator, enhancer, GID1a

# Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las giberelinas y su metabolismo	1
1.1.1 Función en plantas	1
1.1.2 Ruta de biosíntesis e inactivación	2
1.1.3 Vía de señalización	3
1.2 Las proteínas DELLA: Represores de respuesta a giberelinas	5
1.2.1 Estructura y función de las proteínas DELLA	6
1.2.2 Mecanismos de acción de las proteínas DELLA	6
1.2.3 Aspectos evolutivos de las proteínas DELLA	9
1.3 La implicación del complejo DELLA-IDD en la regulación 'feedback' de la biosíntesis de giberelinas	10
1.4 Marco teórico	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Material vegetal	14
3.1.2 Material microbiológico	15
3.2 METODOLOGÍA	16
3.2.1 Ensayos GUS de líneas homocigotas	16
3.2.2 Clonación	17
3.2.3 Ensayo doble híbrido (Y2H)	19
3.2.4 Ensayo de transactivación	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Análisis de la regulación del gen <i>GID1a</i> por DELLAs en <i>Arabidopsis</i> mediante el uso de fusiones transcripcionales a GUS	23
4.2 Estudio de factores de transcripción que median la regulación de <i>GID1a</i> por DELLAs	29
4.2.1 Análisis de interacción proteína-proteína por Y2H	29
4.2.2 Ensayo de transactivación	31

5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	38

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de GAs (Binenbaum et al., 2018). .....	2
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las rutas de inactivación de giberelinas (GAs) (Yamaguchi, 2008). .....	3
<b>Figura 3.</b> Modelo actual de la actividad de las GA en las plantas. Un alivio de la represión induce el crecimiento de la planta. La inactivación se produce a través de la ubiquitinación de las DELLAs que conduce a su degradación. GID1, SCF (SLY1, Skp1-cullin-F-box), Ub (ubiquitina) (Adaptada de la Tesis de Noel Blanco-Touriñán, UPV, 2020). .....	4
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los dominios y motivos característicos de las proteínas DELLA (Gao et al., 2017). .....	6
<b>Figura 5.</b> Mecanismos principales por los que las proteínas DELLA regulan la transcripción (Vera-Sirera et al., 2017). .....	8
<b>Figura 6.</b> Representación de la evolución de las proteínas DELLA en plantas terrestres (Phokas y Coates, 2021). .....	9
<b>Figura 7.</b> ChIP-seq de RGA, una proteína DELLA, y de RNAPII. A) Co-ocurrencia de picos de RGA con la RNAPII. B) Sitios de unión de RGA con el promotor del gen <i>GID1a</i> . RGA_rn (réplicas biológicas del ChIP-seq). RNAPII y RNAPII + GAs (valor medio de dos réplicas biológicas). El ATAC-seq y el ChIP-seq de MED12 están publicados (Liu et al., 2020). C) Análisis Hi-C que muestra que RGA forma un “loop” con el intrón de <i>GID1a</i> . .....	12
<b>Figura 8.</b> Modelo de actuación propuesto por el que las proteínas DELLA actúan reclutando componentes para la transcripción del gen <i>GID1a</i> . .....	13
<b>Figura 9.</b> Sistema de clonación por Gateway. ....	18
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo de la clonación por GoldenBraid. ....	19
<b>Figura 11.</b> Construcciones de las diferentes versiones del promotor <i>GID1a</i> . A) Promotor silvestre. B) Promotor sin la región “enhancer”, de aproximadamente 500 pb, donde se une RGA. C) Promotor sin el intrón. D) y E) Región correspondiente al sitio de unión de RGA (“enhancer”) en orientación “forward” y “reverse”, respectivamente. ....	23
<b>Figura 12.</b> Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen <i>GID1a</i> . Las plántulas fueron tratadas con 5 µM PAC o con una combinación de 5 µM PAC y 10 µM GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 3h a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm. ....	25



<b>Figura 13.</b> Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen <i>GID1a</i> sin la región “enhancer”. Las plántulas fueron tratadas con 5 µM PAC o con una combinación de 5 µM PAC y 10 µM GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 1h a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.....	26
<b>Figura 14.</b> Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen <i>GID1a</i> sin el intrón. Las plántulas fueron tratadas con 5 µM PAC o con una combinación de 5 µM PAC y 10 µM GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 2h a 37°C en oscuridad. La escala establecida fue de 1 mm. ....	27
<b>Figura 15.</b> Tinción GUS de líneas homocigotas con la región “enhancer”, en dirección “forward”, del promotor del gen <i>GID1a</i> . Las plántulas fueron tratadas con 5 µM PAC o con una combinación de 5 µM PAC y 10 µM GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS o/n a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.....	28
<b>Figura 16.</b> Tinción GUS de líneas homocigotas con la región “enhancer”, en dirección “reverse”, del promotor del gen <i>GID1a</i> . Las plántulas fueron tratadas con 5 µM PAC o con una combinación de 5 µM PAC y 10 µM GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS o/n a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.....	28
<b>Figura 17.</b> Ensayo de interacción proteína-proteína por Y2H. En este ensayo hemos probado la interacción de M5GAI y RGA52 con los factores de transcripción IDD2, IDD7 e IDD11 en medio selectivo sin histidina. Diluciones de levaduras en medio sin leucina (L) ni triptófano (W), y medio sin leucina (L), triptófano (W) ni histidina (H) incubadas 28°C durante 2 días. AD corresponde a fusiones a Gal4-AD expresadas en el vector pGADT7 y BD a fusiones Gal4-DNA BD, expresadas desde el vector pGBKT7.....	30
<b>Figura 18.</b> Construcción empleada en los ensayos de transactivación con el “enhancer” en orientación “forward”. ....	31
<b>Figura 19.</b> Ensayo de transactivación en hojas de <i>N. benthamiana</i> . Las muestras fueron normalizadas obteniendo la actividad LUC relativa (LUC/REN). Se presentan 6 combinaciones: “enhancer” silvestre (pWT), con GAI (pWT:GAI), con diferentes IDD (pWT:IDD7; pWT:IDD11), y con IDD7 u 11 + GAI (pWT:IDD7:GAI; pWT:IDD11:GAI). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005 comparado con el promotor (pWT), Student’s t-test.....	32
<b>Figura 20.</b> Construcción de la región donde se une RGA (“enhancer”) en orientación “forward” mutado. ....	33
<b>Figura 21.</b> Ensayo de transactivación en hojas de <i>N. benthamiana</i> . Las muestras fueron normalizadas obteniendo la actividad LUC relativa (LUC/REN). Se presentan 8	

combinaciones: “enhancer” silvestre (pWT), con GAI (pWT:GAI), con IDD7 (pWT:IDD7), y con IDD7 y GAI(pWT:IDD7:GAI); y “enhancer” mutado (pMUT), con GAI (pMUT:GAI), con IDD7(pMUT:IDD7) y con IDD7 y GAI (pMUT:IDD7:GAI). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 comparado con el promotor (pWT; pMut), Student’s t-test. ....34

**Figura 22.** Versiones mutantes del “enhancer”. Construcción con el “enhancer” WT (A) y aquellas en las que se han eliminado los sitios 1+2 (B), los sitios 3+4 (C) y los cuatro (D). ....35

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición del medio MS sólido, ajustado a un pH de 5,7 utilizando una base ácida (KOH o NaOH) o básica (HCl) según sea necesario.	14
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio LB utilizado en el cultivo de E.coli y A.tumefaciens.	15
<b>Tabla 3.</b> Líneas homocigotas por construcción.	16
<b>Tabla 4.</b> Composición empleada en la elaboración de la solución de niacinamida.	17
<b>Tabla 5.</b> Composición de los medios utilizados para el cultivo de levaduras.	20
<b>Tabla 6.</b> Aminoácidos suplementados al medio como método de selección de levaduras transformadas.	20
<b>Tabla 7.</b> Orden y cantidades empleadas de cada componente durante el proceso de transformación. *La cantidad de plásmido varía según la concentración inicial del mismo.	21

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Las giberelinas y su metabolismo

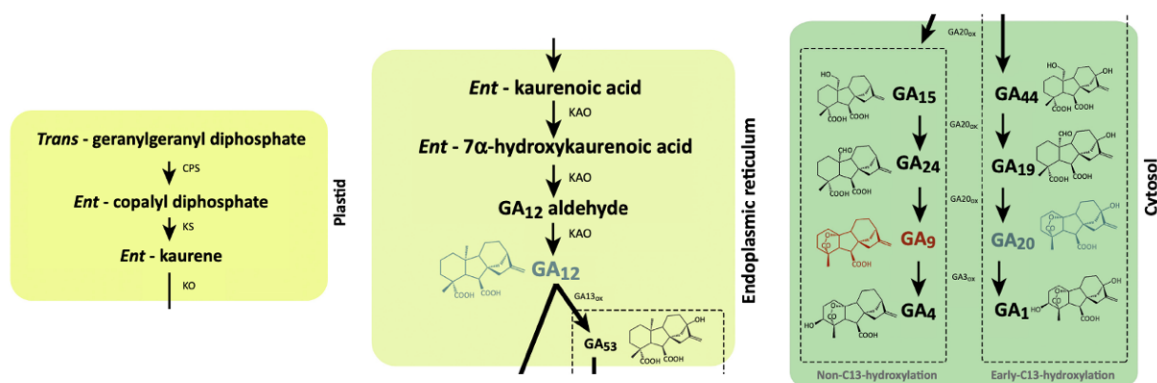
Las giberelinas (GAs) son biomoléculas complejas descubiertas a mediados del siglo XX al aislarse el compuesto activo del hongo *Gibberella fujikuroi*, que causaba una enfermedad denominada 'bakane', la cual provocaba un crecimiento excesivo en las plantas de arroz, impidiendo que se sostuvieran por sí mismas y, en última instancia, causando la muerte de la planta (Salazar-Cerezo et al., 2018). Esta fitohormona tiene una estructura de diterpeno tetracíclico con un anillo ent-giberelina. Se han identificado más de cien giberelinas en plantas vasculares, pero solo unas pocas son bioactivas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>). Las GAs también se han identificado en hongos (Stirk et al., 2019). La mayoría de las formas no activas se encuentran en la planta principalmente como precursores de las formas activas.

### 1.1.1 Función en plantas

Las GAs están involucradas en diversos procesos de desarrollo de las plantas (Yamaguchi, 2008; Richards et al., 2001; Davière, 2013). Las funciones en las que participan incluyen la germinación, floración, formación, expansión y senescencia de hojas, entre muchas otras (Richards et al., 2001). La interacción de las GA con otras fitohormonas es compleja y modula el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sun, 2008). Por ejemplo, durante la germinación de semillas, las GAs aumentan el potencial de crecimiento del embrión e inducen enzimas hidrolíticas. Durante la germinación, se liberan GAs embrionarios que debilitan la cubierta de la semilla (Gupta y Charkrabarty, 2013). Las GAs son esenciales para la inducción de la floración en muchas especies, además de la germinación del polen y el desarrollo del tubo polínico. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, las GAs son absolutamente necesarias para la floración en condiciones de día corto (Wilson et al., 1992). Los estambres requieren una mayor concentración de GAs en comparación con otros órganos florales, siendo un posible punto de biosíntesis de GAs (Gallego-Giraldo et al., 2014).

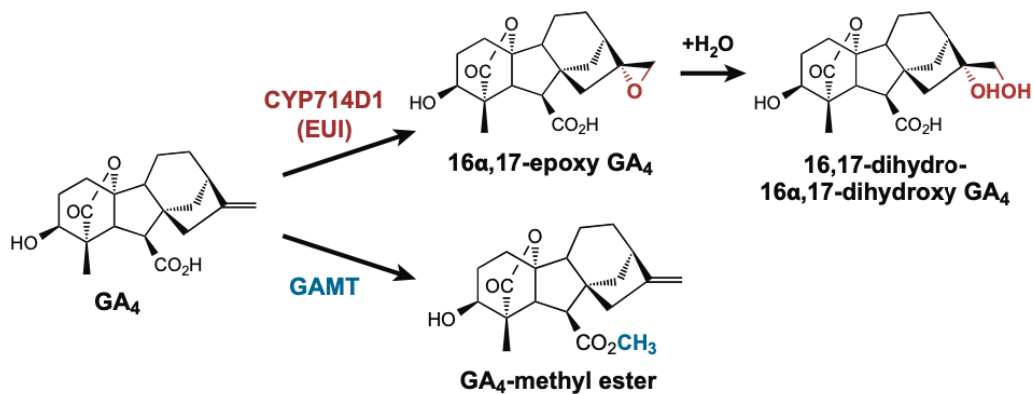
### 1.1.2 Ruta de biosíntesis e inactivación

La ruta metabólica de las GAs ha sido estudiada a lo largo de los años, lo que ha permitido descubrir los genes que codifican enzimas metabólicas. La biosíntesis de las GA (Figura 1) comienza en el plastidio con la conversión del trans-geranylgeranyl difosfato (GGDP) a ent-kaureno, catalizada por ent-copalil difosfato sintasa (CPS) y ent-kaureno sintasa (KS). El ent-kaureno se transporta al retículo endoplásmico, donde el ácido ent-kaurenoico se convierte en GA<sub>12</sub>-aldehído, regulado por las enzimas ent-kaureno oxidasa (KO) y ácido ent-kaureno oxidasa (KAO) (Hedden et al., 2001). GA<sub>12</sub> es el precursor de todas las GAs; a través de una hidroxilación, se convierte en GA<sub>53</sub>. Los precursores GA<sub>12</sub> y GA<sub>53</sub> siguen rutas paralelas para convertirse en los precursores inmediatos GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub>. A través de la 3-beta-hidroxilación (GA3ox) de GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub> se generan las GAs activas GA<sub>4</sub> y GA<sub>1</sub> (Sakamoto et al., 2004; Richards et al., 2001).



**Figura 1.** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de GAs (Binenbaum et al., 2018).

La desactivación de las GAs bioactivas (Figura 2) se lleva a cabo a través de diversas vías; la más estudiada es la catalizada por 2-beta-hidroxilasas (GA2ox), que se encargan de inactivar las GAs bioactivas, así como los precursores inmediatos (Sakamoto et al., 2004). Otra vía de inactivación es mediante el citocromo P450 denominado EUI, que epoxida el 16-alfa, 17 de GA<sub>4</sub>. En las semillas de *Arabidopsis*, las enzimas GA metiltransferasas (GAMT) desempeñan un papel en la desactivación de las GAs al metilar el carboxilo, produciendo ésteres metílicos (Varbanova et al., 2007).



**Figura 2.** Representación esquemática de las rutas de inactivación de giberelinas (GAs) (Yamaguchi, 2008).

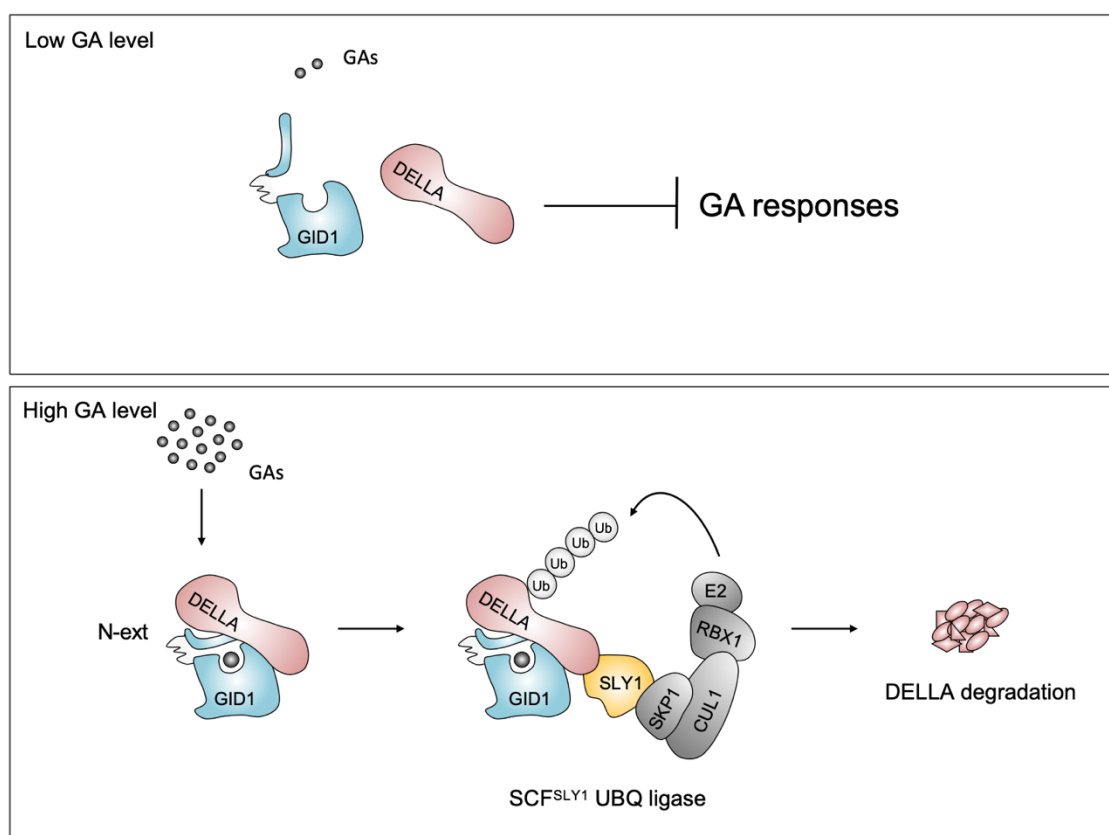
### 1.1.3 Vía de señalización

El modelo de señalización (Figura 3) propuesto comienza con el reconocimiento de GAs por parte del receptor GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1). Este receptor soluble codifica una proteína nuclear y citosólica y fue identificado inicialmente en mutantes *gid1* de plantas de arroz (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). En *Arabidopsis*, existen tres ortólogos de *GID1* (*GID1a*, *GID1b* y *GID1c*) con funciones redundantes, siendo *GID1a* y *GID1c* los más relevantes durante la germinación de semillas (Gallego-Giraldo et al., 2014). Este receptor es homólogo a la lipasa sensible a hormona en humanos, aunque ha perdido esta función en plantas, y consta de un dominio C-terminal con un sitio de unión a GAs y un dominio N-terminal de estructura flexible (Li et al., 2023; Hernandez-Garcia et al., 2021).

Otro componente clave en la señalización por GAs es *SLEEPY1* (*SLY1*, en *Arabidopsis*) y *GID2* (arroz), que codifican proteínas F-box que forman parte de un complejo SCF E3 ubiquitina ligasa. Se caracterizaron mediante el análisis fenotípico de mutantes con pérdida de función *gid1-2* y *sly1-10*, lo que resultó en un fenotipo enano insensible a GAs (McGinnis et al., 2003). *SLY* y *GID2* son reguladores positivos de la señalización de GAs, promoviendo la degradación de proteínas DELLA, que son los reguladores negativos en la vía (ver más abajo) (Figura 3) (Gao et al., 2008). Los ensayos de doble híbrido en levadura han demostrado la interacción directa de *SLY1* con las proteínas

DELLA, respaldando su implicación en el reclutamiento de proteínas DELLA para su degradación (Dill et al., 2004).

En presencia de GAs bioactivas, estas se unen al receptor *GID1* promoviendo un cambio conformacional en la región N-terminal, la cual se pliega sobre su dominio C-terminal, dejando una superficie expuesta capaz de interactuar con la DELLA (Murase et al., 2008). El complejo formado se une a las proteínas DELLA (represoras de la señalización por GA) y provoca un nuevo cambio conformacional que permite su unión con SLY1/GID2. Cuando se forma el complejo SCF E3 ubiquitina ligasa con GID1-GA-DELLA, ésta se poliubiquitina y es degradada por el proteasoma 26S (Gao et al., 2008).



**Figura 3.** Modelo actual de la actividad de las GA en las plantas. Un alivio de la represión induce el crecimiento de la planta. La inactivación se produce a través de la ubiquitinación de las DELLAs que conduce a su degradación. GID1, SCF (SLY1, Skp1-cullin-F-box), Ub (ubiquitina) (Adaptada de la Tesis de Noel Blanco-Touriñán, UPV, 2020).

## 1.2 Las proteínas DELLA: Represores de respuesta a giberelinas

Las DELLA son proteínas cuyo nombre se les atribuyó por una corta secuencia de aminoácidos (ácido aspártico - ácido glutámico - leucina - leucina - alanina) en la región N-terminal que está muy conservada. La primera DELLA fue descubierta cuando se caracterizó el mutante semidominante *gibberellic acid insensitive-1 (gai-1)* en *Arabidopsis*, que presenta un fenotipo enano con hojas oscuras, reducción de la dominancia apical y floración tardía (Vera-Sirera et al., 2016). Los mutantes *gai-1* son fenotípicamente similares a los mutantes *ga1-3*, pero son incapaces de responder a GA exógena. Al identificar la lesión molecular del mutante *gai-1*, se observó una delección de 17 aminoácidos que incluye el motivo DELLA (Peng et al., 1997). Más tarde se demostró que para la degradación de las proteínas DELLA dependiente de GA solo se requiere del dominio DELLA.

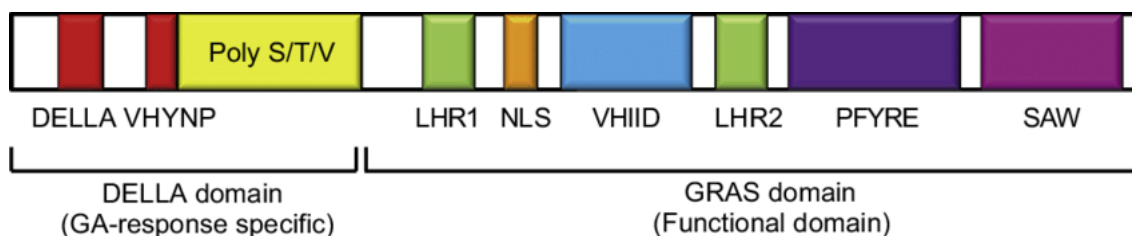
En *Arabidopsis* hay 5 proteínas DELLA: REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA), GAI, y RGA-Like Protein1, 2 y 3 (RGL1, RGL2 y RGL3) (Sukiran et al., 2022). La función bioquímica de las distintas proteínas DELLA es la misma y los papeles diferentes se deben a sus patrones de expresión diferencial en la planta (Gallego-Bartolomé et al., 2010). No obstante, hay cierta redundancia en cuanto a la represión de la respuesta a GAs. Por ejemplo, RGA y GAI actúan reprimiendo el crecimiento vegetativo y la inducción de la floración (Achard y Genschik, 2009). Además, las proteínas DELLA están altamente conservadas en plantas, y en muchas plantas como arroz (SLR1), trigo (*Rht1*), cebada (SLN1), y tomate (PRO) hay solo una proteína DELLA (Gao et al., 2008).

Las proteínas DELLA se han mostrado de utilidad en Agricultura. Un factor importante para la obtención de variedades de mayor rendimiento durante la revolución verde fue el desarrollo e implementación de cultivos semienanos de alto rendimiento en variedades de trigo y arroz. Esto se debió a la introducción de alelos mutantes de los loci de altura reducida (*Rht-B1* y *Rht-D1*) con función alterada, logrando aumentar el rendimiento del cereal. Los alelos *Rht-B1* y *Rht-D1* del trigo codifican para proteínas DELLA mutantes, confiriendo enanismo semidominante insensible a GA, igual que ocurre en el mutante *gai-1* en *Arabidopsis* (Peng et al., 1999).



### 1.2.1 Estructura y función de las proteínas DELLA

Las proteínas DELLA pertenecen a una subfamilia de la familia GRAS de reguladores transcripcionales. Su estructura se divide en dos dominios: un dominio GRAS que ocupa los dos tercios C-terminal de la proteína, altamente conservado, y un dominio DELLA específico en el tercio N-terminal que confiere sensibilidad a GAs (Vera-Sirera et al., 2016). El dominio GRAS permite interactuar con múltiples proteínas reguladoras y consta de dos repeticiones heptadas de leucina (LHR1 y LHR2), una señal de localización nuclear (NLS) y tres motivos conservados (VHIID, PFYRE y SAW). Las LHR son importantes para la homodimerización de la proteína y son necesarias para la actividad de las proteínas DELLA y su degradación dependiente de GA. Los motivos PFYRE y SAW están involucrados en las interacciones secundarias con el receptor GID1, mientras que el motivo VHIID interactúa con los motivos LHR y las proteínas F-box. El dominio DELLA se compone de los motivos DELLA y el motivo VHYNP, que media la unión con el receptor GID1, y el motivo polimérico S/T/V, implicado en la fosforilación de DELLA (Briones-Moreno et al., 2017; Davière y Achard, 2013) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de los dominios y motivos característicos de las proteínas DELLA (Gao et al., 2017).

### 1.2.2 Mecanismos de acción de las proteínas DELLA

Las DELLA no tienen dominio de unión al ADN, por lo que se cree que actúan regulando la expresión de sus genes diana mediante interacción con factores de transcripción (TFs). Varios estudios en *Arabidopsis* han permitido descubrir que las DELLA interactúan con una larga lista de reguladores de la transcripción que incluye TFs, complejos remodeladores de cromatina, chaperonas y reguladores transcripcionales. La

identificación de estos interactores además de proporcionar una explicación mecánica a cómo las DELLA regulan la transcripción de genes, ha permitido comprender las conexiones de DELLA con las otras vías de señalización (Vera-Sirera et al., 2017). En concreto, las DELLA son capaces de interactuar con cientos de TFs y reguladores transcripcionales (Marín-de la Rosa et al., 2014; Lantzouni et al., 2020).

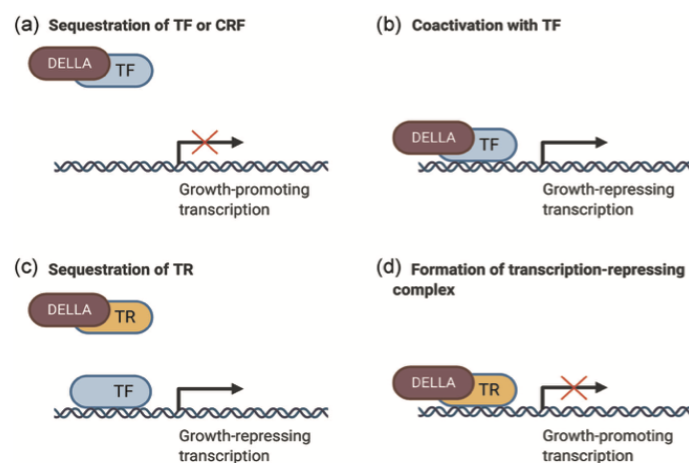
Los mecanismos por los que las proteínas DELLA regulan la expresión génica se clasifican dependiendo del tipo de interacción y la proteína con la que interactúan (Figura 5). El primer mecanismo de acción de DELLAs que se identificó fue el secuestro de TF (Figura 5a). En estos casos la interacción de la DELLA con el TF previene la unión del TF a la cromatina, previniendo de esta manera que ejerza su función. Este mecanismo fue descrito por primera vez en los trabajos pioneros que mostraron la interacción de las DELLA con los TF del tipo bHLH PIF3 y PIF4 (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Estos trabajos, además, mostraron el mecanismo molecular de interacción de las vías de GAs y luz, pues PIF3 y PIF4 son TFs que actúan aguas abajo de los fotorreceptores. Desde entonces se han descrito muchos ejemplos de este tipo de regulación que han mostrado cómo interactúa la vía de GAs con otras vías de señalización. Por ejemplo, las DELLA secuestran TFs de la señalización por brasinosteroides, BZR1 (Gallego-Bartolomé et al., 2012), o de la señalización por auxinas ARF6 (Oh et al., 2014).

Las DELLA también interactúan con TFs mientras estos están unidos a la cromatina (Figura 5b). De hecho, análisis CHIP-seq llevados a cabo en nuestro laboratorio y otros han mostrado que las proteínas DELLA se unen a cientos de loci en el genoma (Marín-de la Rosa et al., 2015; Serrano-Mislata et al., 2017; Huang et al., 2023). En muchos de estos casos la proteína DELLA actúa como un coactivador transcripcional. Este es el caso de la interacción de la DELLA con el TF de señalización por citoquininas ARR1 (Marín-de la Rosa et al., 2015). En este trabajo se demostró, por ejemplo, que la actividad DELLA es necesaria para que las citoquininas prevengan la división celular en el meristemo de la raíz vía ARR1. Así mismo, se mostró que la unión de DELLAs a algunas de sus dianas se ve comprometida en mutantes *arr1*. En otros casos, el reclutamiento de la DELLA al contexto de la cromatina vía interacción con un TF resulta en la represión del gen diana (Figura 5d). Esto ocurre durante la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* con la interacción RGA-SPL15 (Hyun et al., 2016). Esta interacción previene que el complejo MEDIATOR (vía la subunidad MED18) sea reclutado al gen diana y de esta manera no se activa su expresión.

Un trabajo muy reciente ha mostrado que, aunque parezca paradójico, la DELLA también está unida a la cromatina mediante la interacción con aquellos TF a los que secuestra, y que todas las interacciones con TFs en la cromatina están estabilizadas por interacción de la DELLA con la histona H2A (Huang et al., 2023). En este trabajo se mostró la RGA unida a sitios donde también se unen los PIFs o BZR1, TFs que se había visto que unen peor a la cromatina en presencia de DELLAs. No obstante, ambos mecanismos no son excluyentes, pues la interacción con el TF puede ocurrir en tanto en el nucleoplasma como en la cromatina. La DELLA puede inhibir la unión a las dianas de los TFs que estén libres en el nucleoplasma, mientras que la interacción que ocurra en la cromatina va a inhibir la acción transcripcional de estos TFs.

Además de regular la actividad de TFs, las DELLA también interaccionan y regulan negativamente a otros reguladores transcripcionales, i.e. reguladores de la transcripción que no pueden unir ADN (Figura 5c). Tal es el caso de la interacción de las DELLA con los JAZ, que son reguladores negativos de la señalización por ácido jasmónico, en el contexto del ‘tradeoff’ crecimiento-defensa (Yang et al., 2012), o con BBX24 en la regulación de la respuesta a sombra (Crocco et al., 2015).

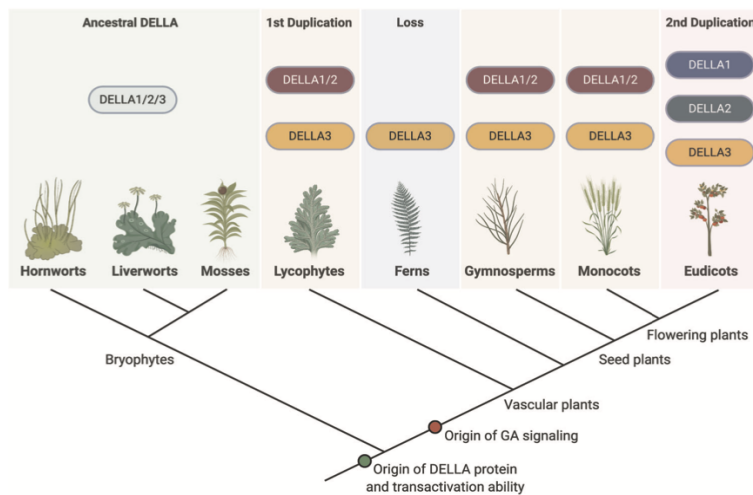
La expresión génica se ve influenciada por la interacción de las DELLA con componentes de la remodelación de cromatina y modificación de histonas, como SWIC3C y PICKLE (PKL) (Vera-Sirera et al., 2017). Las DELLA se unen a PICKLE para evitar que interaccione con otros factores de transcripción (PIF3, BZR1) y favorece la triple metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) en promotores de genes diana (Phokas y Coates, 2021; Thomas et al., 2016).



**Figura 5.** Mecanismos principales por los que las proteínas DELLA regulan la transcripción (Vera-Sirera et al., 2017).

### 1.2.3 Aspectos evolutivos de las proteínas DELLA

La evolución de las proteínas DELLA en plantas terrestres ha sido un tema de interés que, hasta hace poco, no se había logrado abordar debido a la escasa disponibilidad de datos genómicos y transcriptómicos (Hernández-García et al., 2019). Las algas carecen de proteínas DELLA, ya que las proteínas GRAS de algas son monofiléticas y su evolución es independiente de la de las plantas terrestres. Se han realizado análisis filogenéticos independientes que han identificado dos eventos de duplicación en los genes que codifican proteínas DELLA (Phokas y Coates, 2021). Estos eventos de duplicación ocurrieron en el ancestro de las plantas vasculares y en plantas de flores eudicotiledóneas (Figura 6). Las plantas no vasculares (briofitas) poseen solo un clado DELLA1/2/3, pero las plantas vasculares que no son eudicotiledóneas tienen un clado DELLA1/2 y un clado DELLA3, mientras que las eudicotiledóneas tienen tres clados DELLA. Algunas especies de plantas con flores parecen haber perdido clados o han experimentado más eventos de duplicación de DELLA (Hernández-García et al., 2019). En el caso del arroz, que presenta flores monocotiledóneas, el clado DELLA 3 ha perdido el dominio DELLA en el extremo N-terminal como parte de un mecanismo evolutivo para inhibir el crecimiento cuando las condiciones favorecen una baja presencia del clado DELLA1/2 (Phokas y Coates, 2021).



**Figura 6.** Representación de la evolución de las proteínas DELLA en plantas terrestres (Phokas y Coates, 2021).

Se ha comprobado que un mayor número de proteínas DELLA no está directamente relacionado con la diversidad de funciones de DELLA, ya que en el tomate solo hay una proteína DELLA que desempeña la misma función que el conjunto de proteínas DELLA en *Arabidopsis*. El número de proteínas DELLA que presenta una especie parece depender de la diversificación de los patrones de expresión, dado que los factores de transcripción no discriminan entre las proteínas DELLA de una misma especie para su interacción. Además, algunas proteínas DELLA pueden tener funciones intercambiables cuando se expresan bajo un promotor específico, como sucede con AtRGA1 y AtRGL2 (Gallego-Bartolomé et al., 2010).

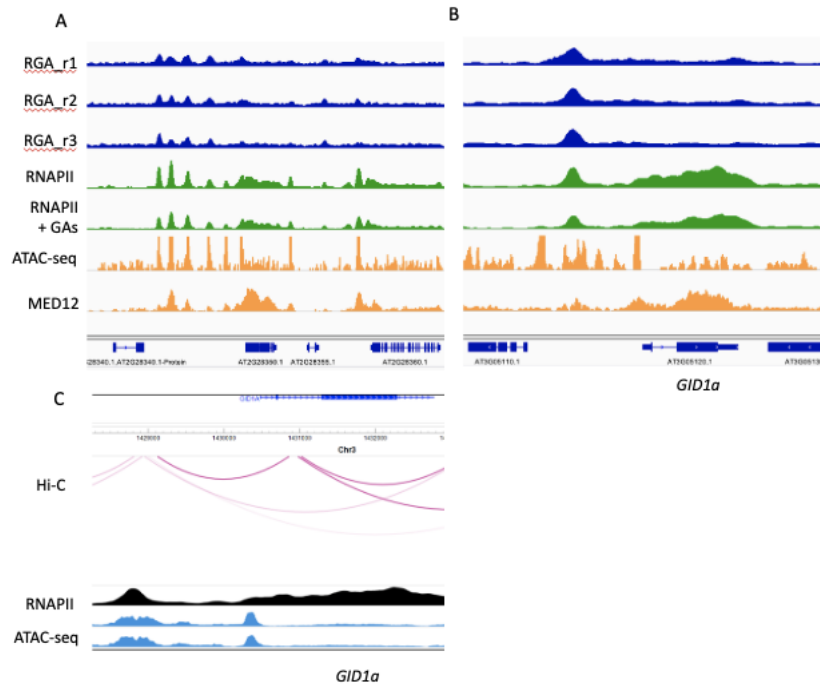
### 1.3 La implicación del complejo DELLA-IDD en la regulación 'feedback' de la biosíntesis de giberelinas

La identificación de los TFs con los que interaccionan las proteínas DELLA ha permitido desenmascarar el mecanismo molecular de la regulación "feedback" negativa a la que está sometido el metabolismo de GAs (Hedden et al., 2000). Esta regulación opera para que los cambios en los niveles de GAs sean transitorios. Se había observado que la expresión de los genes que codifican enzimas limitantes en la biosíntesis, como son los genes *GA20ox* y *GA3ox*, aumentan su expresión cuando disminuyen los niveles de GAs. No obstante, el mecanismo por el que ocurría esto era desconocido. Fukazawa et al (Fukazawa et al., 2014) mostraron que esta regulación está basada en la interacción de la DELLA con el TF GAF1, también conocido como IDD2. Los autores mostraron que GAF1 se une al promotor del gen *GA20ox2*, y que es capaz de reclutar dos reguladores transcripcionales diferentes en función del nivel de GAs. Cuando los niveles de GAs son altos, GAF1 recluta al represor transcripcional TPR, de manera que la expresión del gen *GA20ox2* es baja y por tanto no hay síntesis de GAs. Por el contrario, cuando los niveles de GAs son bajos, la estabilización de las DELLA hace que estas aumenten en cantidad y desplacen a TPR de GAF1 mediante interacción directa con este último. Las DELLA actúan en este contexto de activadores transcripcionales, promoviendo la expresión de *GA20ox2* y por tanto aumentando los niveles de GAs. Este aumento provocará la subsecuente degradación de las DELLA, por lo que TPR podrá unirse de nuevo a GAF1 y reprimir *GA20ox2*. De esta manera, la planta se asegura que los cambios en los niveles de GAs sean transitorios.

## 1.4 Marco teórico

Un análisis CHIP-seq realizado en nuestro grupo con la proteína DELLA RGA y con la RNA polimerasa II (RNAPII) en plántulas de *Arabidopsis*, ha mostrado que existe una co-ocurrencia de picos de RGA y de la polimerasa que es casi completa (Figura 7a; resultados no publicados). Este resultado es muy interesante, puesto que la mayoría de los picos de RGA ocurren en regiones promotoras alejadas del inicio de la transcripción, donde no se esperaría encontrar a la RNAPII. No obstante, en animales sí se ha encontrado a la RNAPII en sitios alejados del inicio de transcripción, por ejemplo, mediado por el TF FOXO (Eijkelenboom et al., 2013). Estos sitios alejados del inicio de transcripción donde aparece la RNAPII suelen actuar como “enhancers” transcripcionales y se han descrito también en plantas (Weber et al., 2016). Los “enhancers” suelen estar en zonas abiertas de la cromatina y suelen estar unidos por TFs, que reclutan a la RNAPII. De hecho, el pico de RNAPII se ve reducido por un tratamiento con GAs que degrada RGA, por lo que parte de su reclutamiento es dependiente de la proteína DELLA. La formación de un “loop” acerca el “enhancer” cargado con el TF y la RNAPII al inicio de la transcripción. Los sitios co-ocupados por RGA y por la RNAPII también lo están por el complejo MEDIATOR y son zonas accesibles a la cromatina (Figura 7a). Estos resultados apuntan a que los sitios de unión de RGA alejados del inicio de transcripción podrían actuar de “enhancers” transcripcionales.

Uno de esos “enhancers” podría corresponder al pico de unión de RGA en el promotor del gen que codifica el receptor de GAs, *GID1a* (Figura 7b), donde se observa colocalización con RNAPII y MED, y es una zona accesible. Además, un análisis por Hi-C que recoge la formación de contactos entre zonas alejadas de la cromatina, mostró que la zona donde se une RGA forma un “loop”, con alta significancia estadística, con el intrón de *GID1a*, que está justo a continuación del inicio de transcripción (Dr Moussa Benhamed, comunicación personal) (Figura 7c). El gen *GID1a* está sujeto a regulación “feedback” negativa por GAs (Griffiths et al., 2006), aunque el mecanismo molecular no se conoce. Varias evidencias apuntan a que el mecanismo podría ser similar al descrito para el gen *GA20ox2* descrito más arriba: (i) las DELLA interaccionan con varios TF de la familia IDD (Briones-Moreno et al., 2023; Fukazawa et al., 2014); y (ii) un abordaje DAP-seq mostró que el TF IDD7 se une en el mismo sitio que RGA en el promotor de *GID1a* (O'Malley et al., 2016).



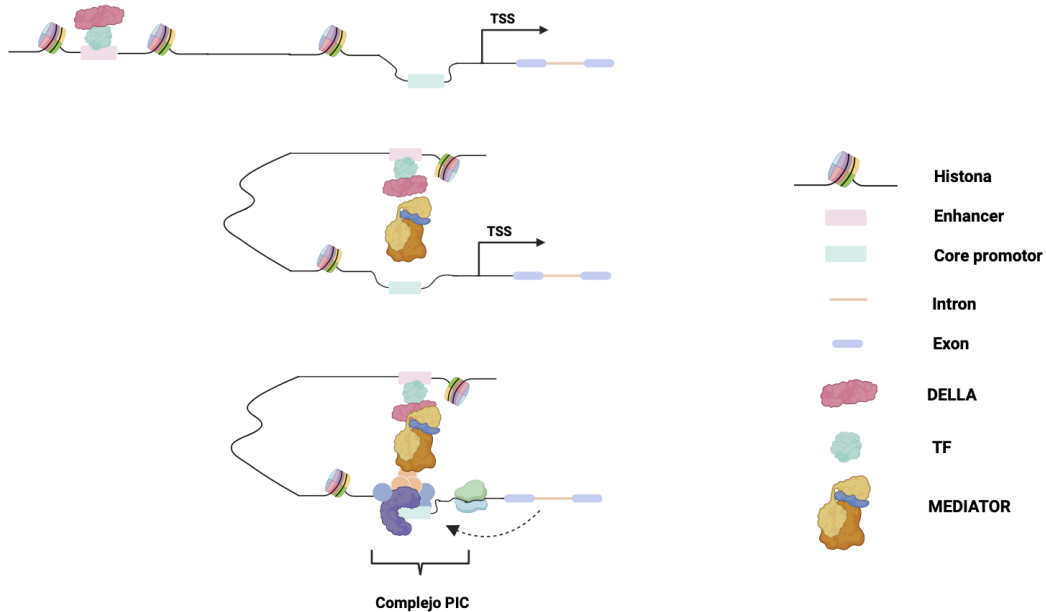
**Figura 7.** ChIP-seq de RGA, una proteína DELLA, y de RNAPII. A) Co-ocurrencia de picos de RGA con la RNAPII. B) Sitios de unión de RGA con el promotor del gen *GID1a*. RGA\_rn (réplicas biológicas del ChIP-seq). RNAPII y RNAPII + GAs (valor medio de dos réplicas biológicas). El ATAC-seq y el ChIP-seq de MED12 están publicados (Liu et al., 2020). C) Análisis Hi-C que muestra que RGA forma un “loop” con el intrón de *GID1a*.

## 2. OBJETIVOS

Así pues, la **hipótesis de trabajo** es que la unión de RGA a un “enhancer” transcripcional situado en el promotor del gen *GID1a* media la regulación “feedback” negativa a la que está sometida la expresión del gen (Figura 8). La unión de RGA al “enhancer” de *GID1a* está mediada por interacción física con IDD7.

Para probar esta hipótesis vamos a abordar los siguientes objetivos:

- 1.1 Determinar la funcionalidad del sitio de unión de RGA en el promotor de *GID1a* como “enhancer” transcripcional.
- 1.2 Probar que IDD7 media la regulación de *GID1a* por DELLAs.



**Figura 8.** Modelo de actuación propuesto por el que las proteínas DELLA actúan reclutando componentes para la transcripción del gen *GID1a*.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Material vegetal

###### Arabidopsis thaliana

Se emplearon semillas transgénicas que contenían diversas versiones del promotor *GID1a* fusionadas al gen reportero GUS disponibles en el laboratorio (ver Resultados y Discusión).

Las semillas utilizadas pertenecen a la accesión Columbia-0 (Col-0). La esterilización de las semillas de *A. thaliana*, consistió en un primer paso donde se sumergieron primero en una solución al 70% de etanol con un 0,05% de tritón X-100 durante 5 minutos. Luego, se transfirieron a una solución al 96% de etanol durante 5 minutos, sin exceder los 10 minutos en total. Una vez esterilizadas, se depositaron sobre papel de filtro estéril y se dejaron secar antes de sembrarlas en MS (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición del medio MS sólido, ajustado a un pH de 5,7 utilizando una base ácida (KOH o NaOH) o básica (HCl) según sea necesario.

Componentes	Cantidad (gr/l)
Medio MS	2,45 gr/l
Sacarosa	10 gr/l
Agar	8 gr/l

###### Nicotiana benthamiana

Se utilizaron hojas de plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad para realizar ensayos de transactivación, análisis de niveles de proteínas por western blot y coimmunoprecipitación (co-IP) tras agroinfiltración (ver más abajo). Las plantas se cultivaron a 22°C en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

Los ensayos de agroinfiltración para expresar de manera transitoria distintas versiones del promotor *GID1a* en *N. benthamiana* se llevaron a cabo preparando cultivos de 5 ml de *Agrobacterium*. Estos cultivos expresaban p19 (supresor del silenciamiento génico) o distintas construcciones. Las concentraciones utilizadas en cada uno de ellos variaron entre los diferentes cultivos. La solución de infiltración contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 0,1 uM y acetosiringona 40 ug/ml. Las mezclas se emplearon para infiltrar el envés de hojas de *N. benthamiana* con una jeringa sin aguja.

### 3.1.2 Material microbiológico

#### *Escherichia coli*

La cepa utilizada durante el proceso de clonaje es la TOP10. Su transformación se llevó a cabo mediante electroporación, que consiste en agregar a 50 µl de células competentes el vector de interés (1 a 5 µl, dependiendo de la construcción) a una alícuota. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación y se eliminaron las burbujas remanentes. Posteriormente, se aplicó un pulso eléctrico de alrededor de 1500 V durante unos milisegundos. Para la recuperación del contenido, se añadieron 500 a 700 µl de LB (Tabla 2).

Una vez completada la transformación, se incubaron las bacterias en una cámara a 37°C en un agitador durante 1 hora. Pasado el tiempo establecido, se vertieron las células transformadas en una placa de LB sólido con el antibiótico correspondiente para seleccionar el vector de interés. Posteriormente, se incubó o/n a 37°C.

**Tabla 2.** Composición del medio LB utilizado en el cultivo de *E.coli* y *A.tumefaciens*.

Componentes	Cantidad (gr/l)
Triptona	10 gr/l
Extracto de levadura	5 gr/l
NaCl	10 gr/l
(Agar)	7,5 gr/l

## Agrobacterium tumefaciens

Se utilizó la cepa C58 para la agroinfiltración de *N. benthamiana*. La transformación se llevó a cabo mediante electroporación, al igual que con *E. coli*, con la diferencia de que la corriente aplicada fue de 1440 V. La temperatura de incubación fue de 28°C, el tiempo de reposo 3 horas, y una vez realizado el plaqueo de la transformación, se dejó incubar durante 2 días a 28°C. Los antibióticos empleados fueron rifampicina, gentamicina, y el antibiótico utilizado para seleccionar el plásmido en medio LB (Tabla 2).

### 3.2 METODOLOGÍA

#### 3.2.1 Ensayos GUS de líneas homocigotas

Para cada construcción, se seleccionaron líneas homocigotas utilizando higromicina en medio MS (Tabla 1) como método de selección. Las líneas seleccionadas para las distintas versiones del promotor *GID1a* (Tabla 3) fueron sembradas en medio MS y estratificadas durante 4 días a 4°C. Pasado ese tiempo, se colocaron en la cámara de cultivo a 23°C para su germinación. Al cuarto día, las plántulas fueron trasladadas a una placa con diferentes tratamientos por 5 días. Estos consistieron en un control (mock), 5 uM de paclobutrazol (PAC) y una combinación de 5 uM de PAC con 10 uM de GAs.

**Tabla 3.** Líneas homocigotas por construcción.

<b>Construcciones</b>	<b>Líneas homocigotas</b>
GID1a	2, 3, 4, 7, 12, 13, 16, 18
Sin intrón	5, 15, 1
Sin <i>enhancer</i>	1, 4, 9, 10, 13
<i>Enhancer forward</i>	12, 15, 16, 20
<i>Enhancer reverse</i>	1, 6, 7, 11, 14, 16, 17, 20

Transcurrido el tiempo bajo los tratamientos, se procedió a la tinción GUS de 3 o 4 líneas por construcción. Para ello, se utilizaron recipientes cerrados donde se incubaron las plántulas en acetona al 100% durante 20 minutos a 4°C. Después de este tiempo, se retiró la acetona y se agregó la solución de niacinamida (Tabla 4) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

**Tabla 4.** Composición empleada en la elaboración de la solución de niacinamida.

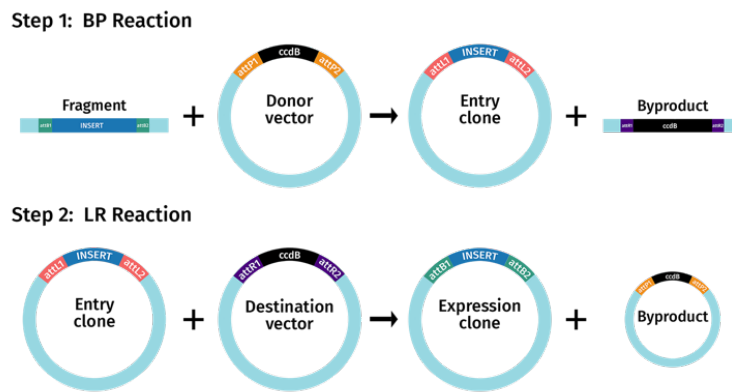
<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen (50 mL)</b>
Triton X100	0.1%	50 µL
Potassium Ferrocyanide 100 mM	1 mM	500 µL
Potassium Ferricyanide 100 mM	1 mM	500 µL
**Buffer Phosphate 100mM pH 7.2	50 mM	25 mL
dH2O		23.95 mL

Se utilizó el sustrato X-glu (ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic) a 1 mM, y las plántulas se incubaron a 37°C en la oscuridad durante el tiempo necesario según la construcción. Una vez que las plántulas adquieren color azul, se detiene la reacción incubándolas durante 30 minutos en soluciones progresivas de etanol (30%, 50%, 70%). Una vez que las plántulas se encuentran en etanol al 70%, pueden almacenarse a 4°C hasta que se realicen las capturas de imágenes en el macroscopio.

### 3.2.2 Clonación

#### Gateway

El sistema de clonación por Gateway fue utilizado para la elaboración de las construcciones empleadas en los ensayos de doble híbrido, además de algunas de las construcciones utilizadas en para expresión en *N. bethmami*. Este sistema de clonaje consiste en el uso de plásmidos que contienen sitios de recombinación específicos, lo que permite la inserción del fragmento de ADN de interés en el plásmido en la orientación adecuada. El proceso se logra mediante dos reacciones conocidas como reacción BP y reacción LR (Figura 9). Estas reacciones son específicas y utilizan diferentes mezclas enzimáticas.



**Figura 9.** Sistema de clonación por Gateway.

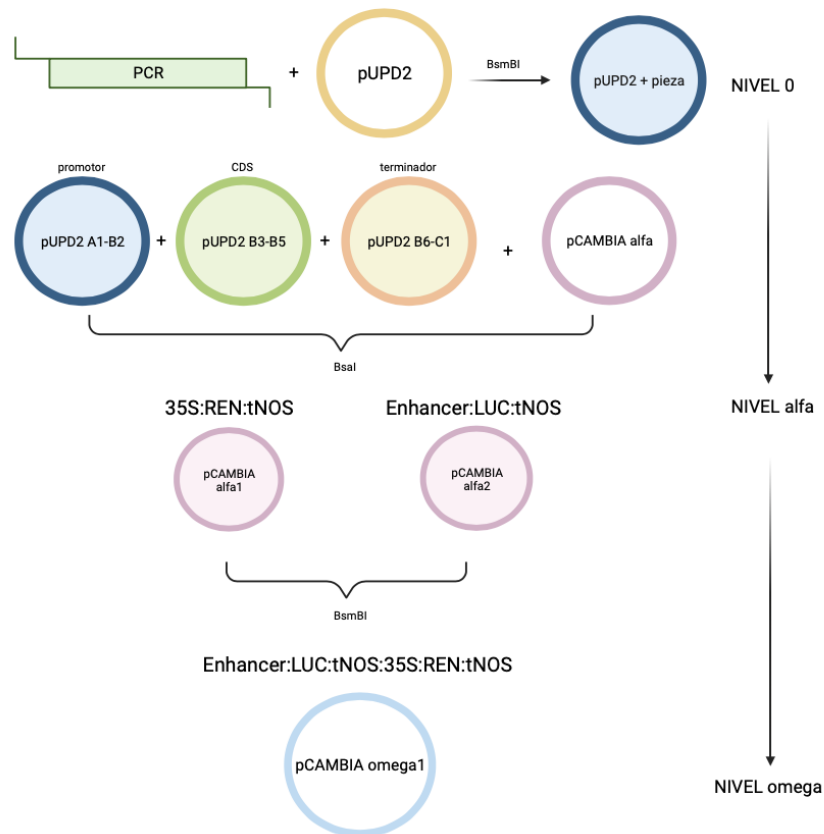
Las construcciones se obtuvieron mediante la recombinación de clones de entrada en vectores de destino Gateway mediante la enzima LR clonase II (invitrogen). En los ensayos de doble híbrido, se llevaron a cabo varias reacciones LR en las que las regiones codificantes de los factores de transcripción IDD7 e IDD11 se insertaron en el vector pGADT7, el cual confiere permite a las levaduras crecer en medios sin leucina. De manera similar, M5-GAI y 52-RGA se clonaron en el vector pGBKT7, que permite crecer a la levadura transformada en medio sin triptófano. Por otro lado, para los ensayos de transactivación, se insertaron las regiones codificantes IDD7 e IDD11 en el vector de destino pEarleyGate 104 (N-YFP) y M5GAI en el pEarleyGate 203 (Myc).

Los vectores fueron amplificados en *E. coli* (apartado 3.1.2), donde cada vector confiere una resistencia específica. Las colonias resultantes se verificaron tras la extracción del plásmido mediante el uso de enzimas de restricción.

### GoldenBraid

El sistema utilizado para ensamblar las versiones del promotor con luciferasa se basó en el empleo de GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al., 2011), resumido en la figura 10. Se fundamenta en un sistema de módulos que siguen un orden jerárquico, donde las unidades básicas se ensamblan para originar una unidad transcripcional. Consiste en el uso de plásmidos que contienen los fragmentos de interés en una orientación y orden específicos. A través de varias reacciones de corte y ligación se logra la unidad transcripcional, donde cada reacción contiene BsaI o BsmBI según corresponda, así como T4 DNA ligasa.

Se llevó a cabo la unión de varias versiones modificadas del *enhancer* con el gen *LUCIFERASA* y el terminador *tNOS* en un vector Alpha2, empleando la enzima *Bsa*I. Posteriormente, el vector alpha2 y un vector alpha1 se ensamblaron en un vector omega1 utilizando la enzima *Bsm*BI. El vector Alpha1 contiene el promotor 35S, el gen *RENILLA* y el terminador *tNOS*.



**Figura 10.** Esquema representativo de la clonación por GoldenBraid.

### 3.2.3 Ensayo doble híbrido (Y2H)

Las construcciones utilizadas fueron obtenidas mediante el sistema de clonaje por Gateway (apartado 3.2.2). La cepa Y187 fue transformada con plásmidos pGADT7 y la cepa Y2HGold fue transformada con plásmidos pGBKT7.

Se inició con un pre-cultivo inicial de las cepas Y187 y Y2HGold en 5 ml de SD (Tabla 5) suplementado con varios aminoácidos (leucina, histidina, triptófano; Tabla 6) y se

incubó a 28°C con agitación durante 2 días. Posteriormente, el pre-cultivo de Y187 se transfirió a un Erlenmeyer de 50 ml y se incubó a 28°C durante toda la noche.

**Tabla 5.** Composición de los medios utilizados para el cultivo de levaduras.

Tipo de medio	Componentes	gr por L	pH
SD	Yeast nitrogen base w/o aminoácidos	6,7	5,8
	Dropout	1,4	
	Agar	20	
YPD	Yeast extract	20	6,5
	Difco peptone	10	
	Agar	20	

**Tabla 6.** Aminoácidos suplementados al medio como método de selección de levaduras transformadas.

Aminoácidos	mg por 50 ml (100x)
Leucina	100
Histidina	100
Uracilo	100
Triptofano	100

Al día siguiente, se transfirió el cultivo a un falcon de 50 ml y se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio en el que estaban las células y se procedió a hacer un lavado con 15 ml de agua destilada estéril. Se resuspendieron las células y se centrifugó a la misma velocidad y tiempo mencionados anteriormente. Una vez completado el lavado, se resuspendió el pellet de células en 5 ml de agua y se distribuyó en alícuotas de 1 ml en tubos de Eppendorf estériles. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm y se retiró el sobrenadante, el cual fue sustituido por una mezcla de PEG, acetato de litio, ssDNA, plásmido y agua, según se indica en la tabla 7.

**Tabla 7.** Orden y cantidades empleadas de cada componente durante el proceso de transformación. \*La cantidad de plásmido varía según la concentración inicial del mismo.

<b>Compuestos</b>	<b>Concentración</b>	<b>volumen</b>	<b>Consideraciones</b>
PEG	50%	480 ul	
LiAc	1M	72 ul	
ssDNA	10 mg/ml	5 ul	Hervir a 95°C durante 5 min antes de utilizarlo
Plásmido	1 ug	*	
Agua	-	Hasta 702	

Una vez agregados todos los componentes al pellet de levaduras, se homogeniza con la pipeta y se incuba a 28°C con agitación durante 30 minutos. A continuación, se incuban a 42°C durante 15 minutos, removiendo las células cada 5 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 µl de agua estéril. Las levaduras transformadas se plaquean en medio sin leucina y se incuban a 28°C durante 2 días.

Después de obtener levaduras haploides transformadas, se procede con el “mating” para obtener diploides que expresen los dos plásmidos. Para ello, se refrescan las levaduras transformadas y se incuban a 28°C durante 2 días. Una vez frescas, se preparan tubos Eppendorf con 500 µl de YPD (Tabla 5) y 2% de glucosa, se toma una cantidad adecuada de ambas cepas de levaduras haploides y se mezclan. Se incuban durante toda la noche a 28°C con agitación. Al día siguiente, se centrifugan, se resuspenden en 100 µl de agua destilada estéril y se plaquean en medio de selección SD sin leucina ni triptófano. Por último, se incuban a 28°C durante 2 días.

El paso final consistió en el ensayo de goteo, donde las levaduras diploides en medio de selección se transfirieron a una nueva placa para refrescar el cultivo, incubándolas a 28°C durante 2 días. En una placa de 96 pocillos se prepararon diluciones (1:1; 1:10; 1:100) de las levaduras haploides y se realizó el ensayo de goteo añadiendo 3 µl por dilución en placas de selección con o sin histidina. Las placas se incubaron a 28°C durante 2 días. Pasado este tiempo, se tomaron fotografías de los resultados para su interpretación.



### 3.2.4 Ensayo de transactivación

Las muestras de la infiltración de *N. benthamiana* se recolectaron a las 72 horas, tomando 3 réplicas por combinación infiltrada y se congelaron en nitrógeno líquido. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo Dual-Glo (Promega), en el cual las muestras se trituraron en un machacador durante 15 segundos. Se añadieron 150 µl del tampón de lisis pasivo 1x y se mezclaron con el vortéx. Este procedimiento se repitió para todas las muestras, manteniéndolas en hielo hasta tener todas listas. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se distribuyeron 3 µl por muestra en una placa de 96 pocillos, añadiendo 40 µl de luciferina (1x) e incubando la placa durante 10 minutos en oscuridad antes de medir la actividad luciferasa en el luminómetro.

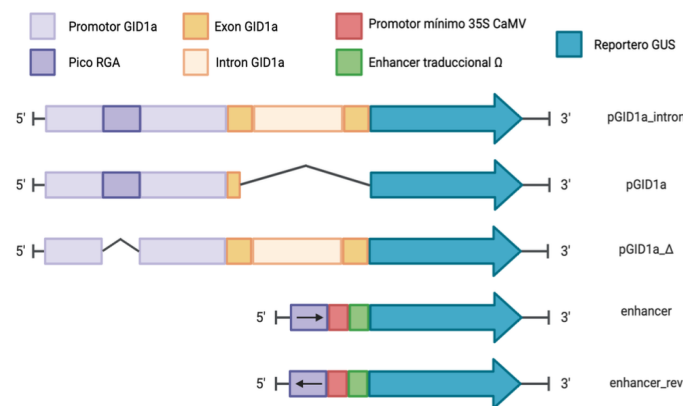
Las condiciones establecidas en el luminómetro fueron 10 segundos de integración, 3 lecturas y un periodo de 2 minutos entre muestras. Después de las lecturas de la placa, se añadieron 40 µl de la solución con coelenteracina (sustrato de la renilla) diluida 1x en la solución Stop&Glo, detenido la actividad luciferasa y se mantuvieron durante 10 minutos en oscuridad antes de la lectura. Se midió nuevamente la luminiscencia con las mismas condiciones mencionadas. Se calculó el ratio luciferasa:renilla para la normalización de los datos obtenidos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de la regulación del gen *GID1a* por DELLAs en *Arabidopsis* mediante el uso de fusiones transcripcionales a GUS

Nuestros resultados preliminares apuntan a que la región donde se une RGA en el promotor del gen *GID1a* podría actuar como un 'enhancer' transcripcional (Figura 7). Esta posibilidad se sustenta en varias evidencias: (i) en esta región coinciden RGA y la RNAPII, aunque la zona esté alejada del inicio de transcripción que es donde normalmente se encuentra la polimerasa; (ii) el pico de RNAPII se ve reducido por un tratamiento con GAs, lo que sugiere que su unión es, al menos en parte, dependiente de DELLAs; (iii) además de la RNAPII, el complejo MED también está reclutado a esa zona; (iv) es una zona de cromatina abierta; y (v) análisis Hi-C muestra que esa región forma un "loop" que la acerca al inicio de transcripción, como ocurre con los "enhancers". Nosotros proponemos que la unión de RGA promueve el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción al "enhancer", formando un 'loop' con el intrón de *GID1a* para acercar la maquinaria de transcripción al sitio de inicio de la transcripción y promover la expresión de *GID1a*.

Como primera aproximación para probar esta hipótesis, se evaluó la actividad de diferentes versiones del promotor *GID1a* fusionadas a *GUS* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Figura 11). Cuando me uní al grupo, en el laboratorio ya se habían preparado las construcciones y se había transformado con ellas plantas de *Arabidopsis*.



**Figura 11.** Construcciones de las diferentes versiones del promotor *GID1a*. A) Promotor silvestre. B) Promotor sin la región "enhancer", de aproximadamente 500 pb, donde se

une RGA. C) Promotor sin el intrón. D) y E) Región correspondiente al sitio de unión de RGA (“enhancer”) en orientación “forward” y “reverse”, respectivamente.

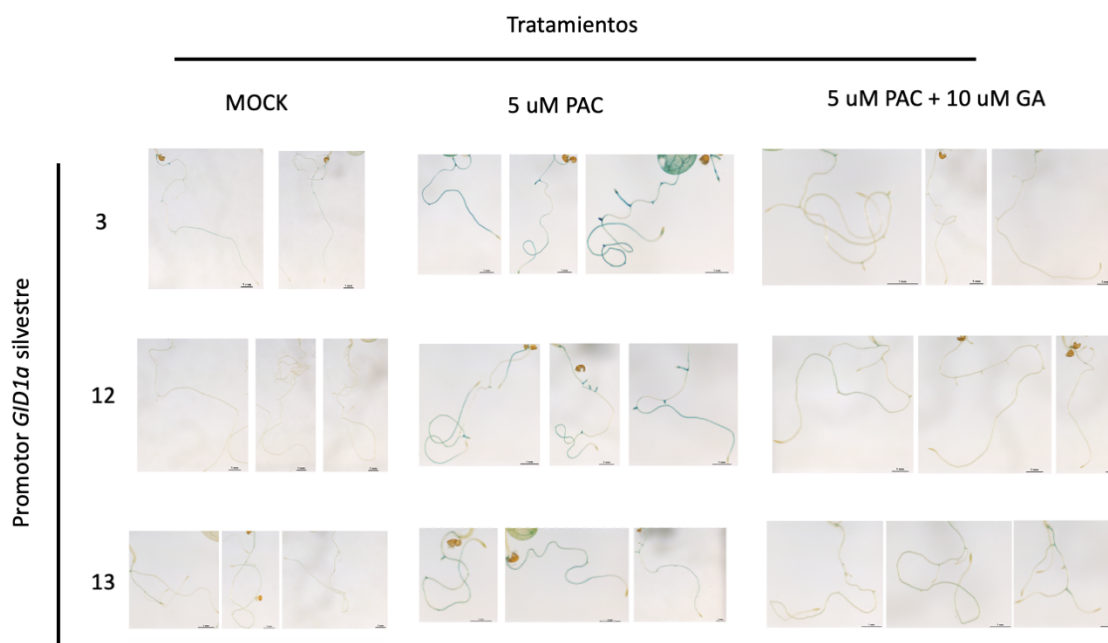
En el momento de iniciar mi TFM disponíamos de semillas T2 de varias líneas transformadas con las fusiones *GUS* del “enhancer forward” y “reverse”, mientras que de las demás se disponía de semillas por rastrear de las plantas T0. Lo primero que hice, y que me ha llevado varios meses de trabajo, fue identificar líneas transgénicas de las construcciones restantes. A continuación, establecí varias líneas homocigotas transformadas con cada una de las construcciones que presentaban una inserción única del transgén. Una vez identificadas varias líneas independientes y homocigotas para cada construcción, seleccioné tres de cada en las que se observaba tinción GUS. Estudios previos sobre la expresión del gen *GID1a* han mostrado que se expresa en hojas, primordios laterales de la raíz y meristemo apical del tallo (SAM) en plántulas de 7 días de edad crecidas en medio MS (Shi et al., 2021).

Para evaluar la respuesta de las distintas versiones del promotor a las proteínas DELLA, sometimos plántulas transgénicas de cada construcción a varios tratamientos: control (“mock”), 5  $\mu$ M paclobutrazol (PAC, es un inhibidor de la biosíntesis de GAs), y 5  $\mu$ M PAC + 10  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. El tratamiento control nos servirá para ver el nivel basal de actividad del promotor, que será consecuencia de los niveles de proteínas DELLA en esas condiciones de crecimiento, que no es muy alto. Los niveles de DELLAs, por el contrario, serán altos en las plántulas tratadas con PAC, debido a la inhibición de la biosíntesis de GAs, y muy bajos en las tratadas simultáneamente con PAC + GAs. Se han empleado plántulas cultivadas en medio MS durante 4 días, que posteriormente fueron transferidas a medio con diferentes tratamientos durante 5 días.

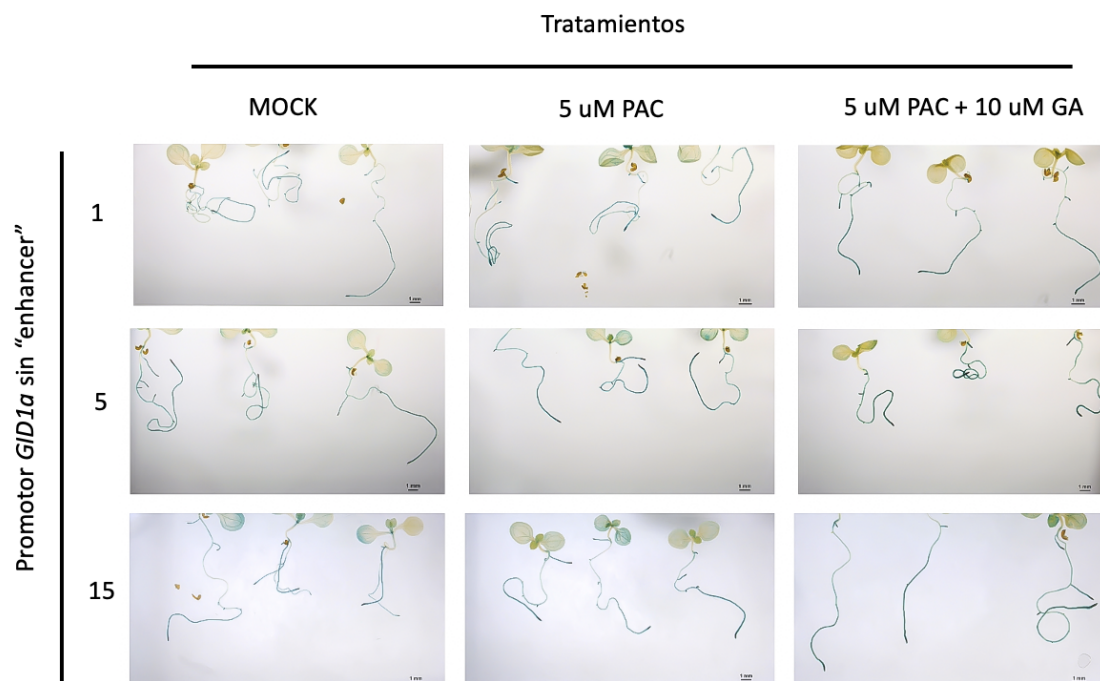
El gen *GID1a* se activa cuando los niveles de DELLA son altos y su expresión se ve reducida por un tratamiento con GAs (Griffiths et al., 2006). En la Figura 12 se muestran los resultados del análisis de las tres líneas que expresan la fusión del promotor completo a *GUS*. En los tres casos se observa que el promotor responde a los tratamientos de la manera esperada, si atendemos a los análisis de expresión por RT-qPCR publicados (Griffiths et al., 2006). Observamos una regulación del gen *GID1a* por DELLAs, ya que se observa una mayor actividad GUS en las raíces de las líneas tratadas con PAC respecto al control y al aplicar GAs la actividad de GUS disminuye. De acuerdo con los resultados publicados (Griffiths et al., 2006), observamos que la respuesta a la acumulación de DELLAs, aunque es evidente, está lejos de la de los

genes de biosíntesis *GA20ox* y *GA3ox*, apuntando a que la regulación “feedback” a la que está sometida el metabolismo es más fuerte que la del gen *GID1a*. Cabe destacar que estos resultados indican que los elementos *cis* necesarios para que el gen *GID1a* responda a DELLAs están incluidos en la construcción. A continuación, estudiamos la contribución a la respuesta de dos de esos elementos: el posible “enhancer” y el intrón.

En primer lugar, estudiamos la respuesta de varias líneas homocigotas pertenecientes a las construcciones que carecían de la región “enhancer” (Figura 13). Dos resultados interesantes se derivan del análisis de estas líneas. Primero, se observó una elevada actividad basal del promotor en los tres tratamientos comparada con las muestras del promotor entero (Figura 12), a pesar de que la incubación para la tinción GUS fue más corta (1 h vs 3 h a 37°C). Segundo, se observó que la respuesta a DELLAs parece perderse en estas líneas. Estos sugieren que la región “enhancer” es necesaria para la respuesta a DELLAs y, posiblemente, para reclutar un represor transcripcional que mantiene la actividad del promotor baja.

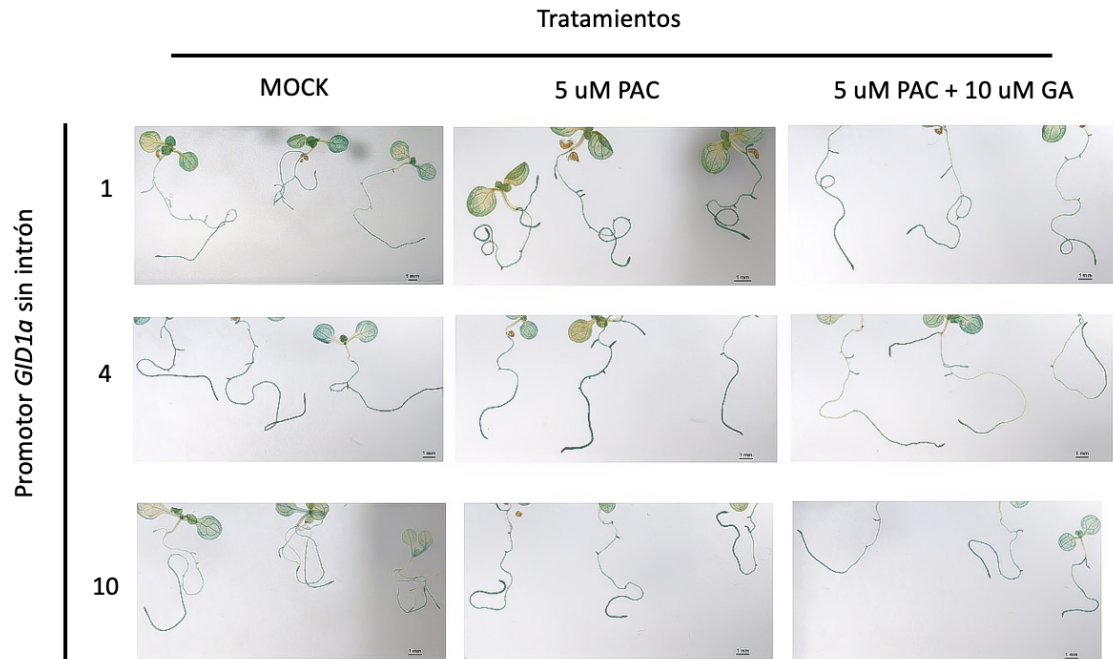


**Figura 12.** Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen *GID1a*. Las plántulas fueron tratadas con 5  $\mu$ M PAC o con una combinación de 5  $\mu$ M PAC y 10  $\mu$ M GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 3h a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.



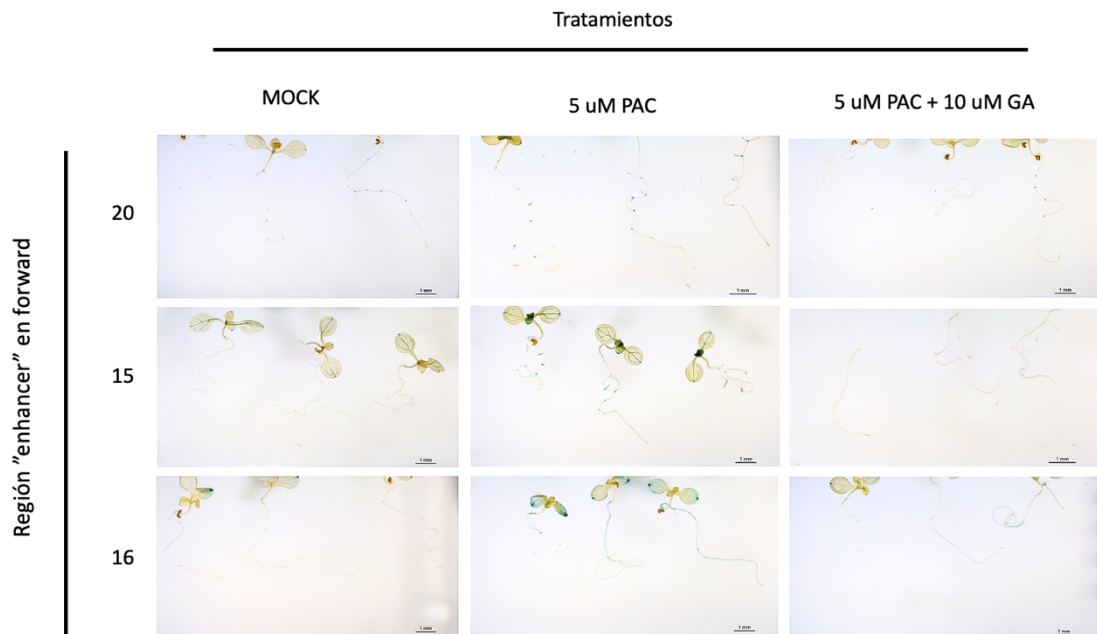
**Figura 13.** Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen *GID1a* sin la región "enhancer". Las plántulas fueron tratadas con 5  $\mu$ M PAC o con una combinación de 5  $\mu$ M PAC y 10  $\mu$ M GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 1h a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.

En segundo lugar, estudiamos la contribución del intrón a la regulación de la actividad del promotor *GID1a* por DELLAs (Figura 14). Los resultados obtenidos con el análisis de las tres líneas transgénicas de la construcción sin intrón fueron parecidos a los obtenidos con las construcciones que carecen de la región "enhancer" (Figura 13). En ambos casos se observó una actividad basal alta del promotor. No obstante, en este caso no parece que se haya perdido del todo la respuesta a DELLAs. La actividad basal de estas líneas tras incubación de 2 h a 37°C, aunque mayor que las del promotor entero (Figura 12), fue menor que las que carecen de "enhancer" (Figura 13). La similitud en el comportamiento de ambas construcciones en cuanto a los niveles basales de expresión del gen está en línea con el análisis Hi-C (Dr. Moussa Benhamed, comunicación personal) en el que se observó un "loop" que acerca el intrón a la región "enhancer" (Figura 7B). Estos resultados apuntan a que ambas regiones están relacionadas funcionalmente en el control de la expresión basal de *GID1a*, pero no en su respuesta a DELLAs.

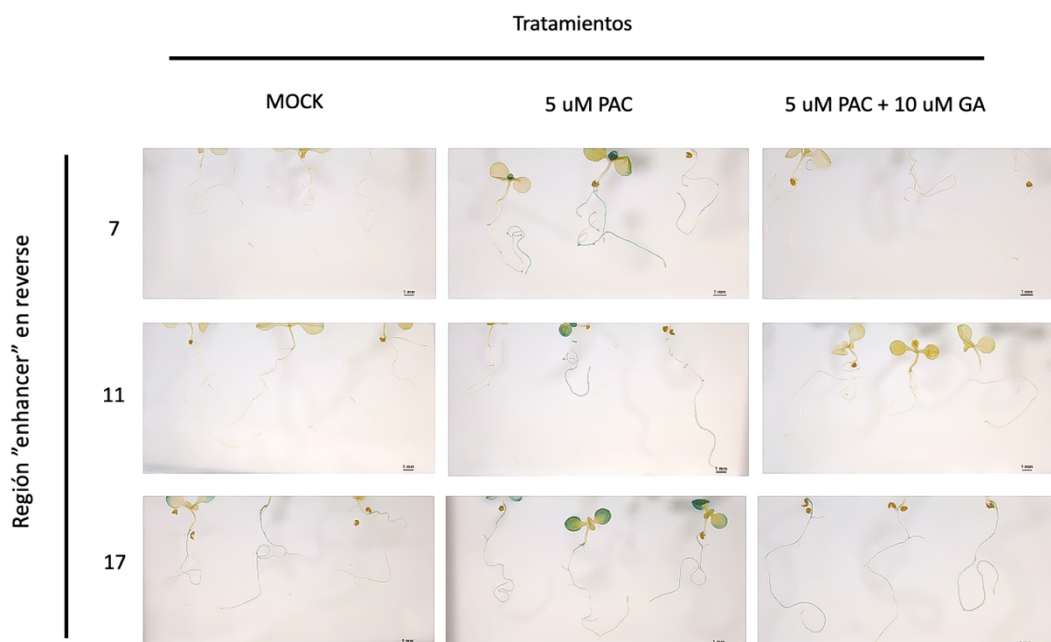


**Figura 14.** Tinción GUS de líneas homocigotas con el promotor del gen *GID1a* sin el intrón. Las plántulas fueron tratadas con 5  $\mu$ M PAC o con una combinación de 5  $\mu$ M PAC y 10  $\mu$ M GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS durante 2h a 37°C en oscuridad. La escala establecida fue de 1 mm.

Los resultados precedentes indicaron que la región que denominamos “enhancer” es necesaria para la regulación de la actividad del promotor por DELLAs y que por tanto podría representar un “enhancer” transcripcional. Para determinar si esta región puede actuar como un “enhancer” estudiamos su actividad tras descontextualizarla del promotor entero (Weber et al., 2016). Además, lo estudiamos en las dos orientaciones, “forward” (tal como aparece en el promotor) y “reverse”, pues estudios en animales indican que los “enhancers” actúan independientemente de la orientación (Weber et al., 2016). En ambos casos el fragmento de ADN se fusionó a un promotor mínimo 35S y a un activador traduccional. La actividad GUS en las plántulas transformadas con la región “enhancer” fue mucho más baja que la del promotor entero (tinción GUS o/n a 37°C de las construcciones “enhancer” frente a 3 h a 37°C del promotor entero). No obstante, mostraron una mayor actividad de GUS en respuesta de PAC en comparación al tratamiento con GA, tanto en dirección “forward” (Figura 15) como “reverse” (Figura 16). Estos resultados están de acuerdo con la idea de que esa región puede actuar como un “enhancer” de respuesta a DELLAs.



**Figura 15.** Tinción GUS de líneas homocigotas con la región "enhancer", en dirección "forward", del promotor del gen *GID1a*. Las plántulas fueron tratadas con 5  $\mu$ M PAC o con una combinación de 5  $\mu$ M PAC y 10  $\mu$ M GA3, más un control (mock). Estuvieron 5 días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS o/n a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.



**Figura 16.** Tinción GUS de líneas homocigotas con la región "enhancer", en dirección "reverse", del promotor del gen *GID1a*. Las plántulas fueron tratadas con 5  $\mu$ M PAC o con una combinación de 5  $\mu$ M PAC y 10  $\mu$ M GA3, más un control (mock). Estuvieron 5

días bajo tratamiento antes de realizarse la tinción. Se incubaron en la solución final de la tinción GUS o/n a 37°C en oscuridad. La escala es de 1 mm.

En resumen, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo indican que (i) la región donde se une RGA en el promotor de *GID1a* se comporta como un “enhancer” transcripcional; y que (ii) esta región está relacionada funcionalmente con el intrón de *GID1a*, ya que ambos son necesarios para mantener los niveles basales de expresión bajos. El papel represor se debe probablemente al reclutamiento a la misma zona de un represor transcripcional. Estos resultados están en línea con nuestra hipótesis. En la segunda parte de mi trabajo investigamos el mecanismo por el que las DELLA se reclutan al promotor de *GID1a*.

#### **4.2 Estudio de factores de transcripción que median la regulación de *GID1a* por DELLAs**

Las proteínas DELLA se unen a los promotores de los genes diana mediante la interacción con TFs (Marín-de la Rosa et al., 2014; Lantzouni et al., 2020). Por ejemplo, se unen al promotor del gen *GA20ox2* para activar su expresión vía interacción con el TF de la familia IDD GAF1/IDD2 (Fukazawa et al., 2014). Referente a los IDD, un análisis bioinformático de los elementos *cis* sobrerrepresentados en los sitios de unión de RGA que se identificaron por ChIP-seq en el laboratorio, mostró que la secuencia de unión de IDDs era la de mejor “score” (TFG de Eva Montoliu, 2022), indicando que este tipo de TF es importante para reclutar DELLAs a sus genes diana. Además, cabe destacar que un abordaje de DAP-seq mostró que el TF IDD7 se une en el mismo sitio que RGA en el promotor de *GID1a* (O'Malley et al., 2016). En esta parte del TFM hemos estudiado si IDD7 media la regulación de *GID1a* por DELLAs.

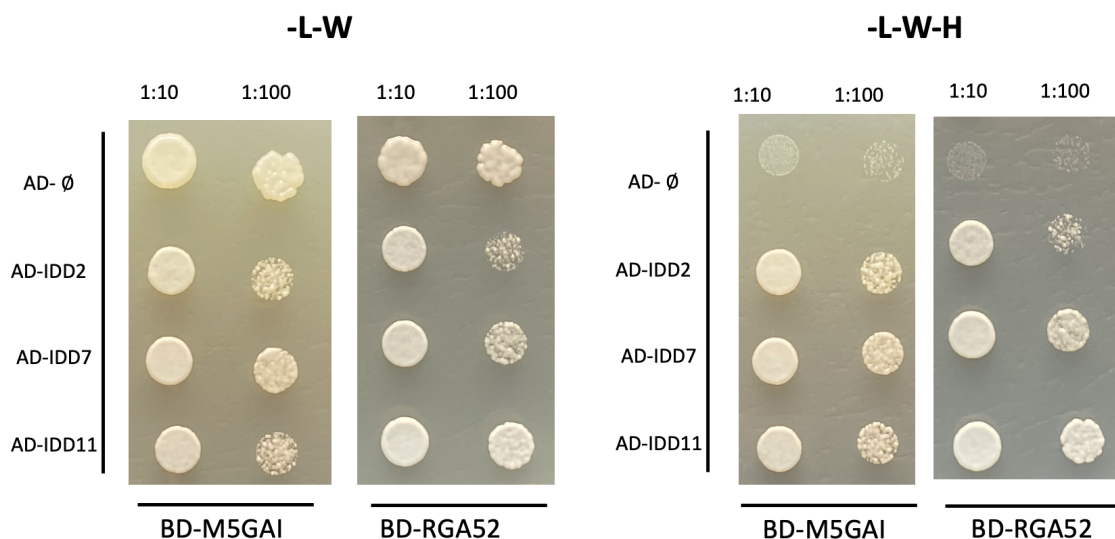
##### **4.2.1 Análisis de interacción proteína-proteína por Y2H**

Lo primero que hicimos para probar nuestra hipótesis fue estudiar si las proteínas DELLA GAI y RGA son capaces de interactuar físicamente con IDD7 mediante ensayos de Y2H. En este tipo de ensayos se ha observado interacción de proteínas DELLA con IDDs, por ejemplo, IDD2 o IDD4 (Fukazawa et al., 2014; Briones-Moreno



et al., 2023). Yoshida et al., (2014) identificaron IDD4 e IDD5 como interactores de RGA por Y2H. IDD7 se agrupa junto a IDD11 en un árbol filogenético que incluye los IDDs de *Arabidopsis*, arroz y maíz, indicando que ambos están muy relacionados filogenéticamente (Colasanti et al., 2006), por lo que también incluimos a IDD11 en nuestros ensayos. IDD7 e IDD11 están clasificados dentro del grupo D, junto a IDD4, IDD5, e IDD6 (Colasanti et al., 2006).

Las versiones de GAI y RGA utilizadas como cebo en el ensayo, M5GAI y RGA52, carecían del extremo N-terminal, ya que se ha descrito que el N-terminal de las DELLA posee una elevada capacidad de transactivación de la expresión génica (Hirano et al., 2012; Hernández-García et al., 2019). IDD7 e IDD11 se emplearon fusionadas al dominio de activación de Gal4 (Gal4-AD); como control positivo usamos IDD2, puesto que es un interactor confirmado de GAI y RGA (Fukazawa et al., 2014). La selección se hace en un medio sin histidina. Las levaduras sólo pueden crecer en este medio si hay interacción y como consecuencia se activa la expresión del gen *HIS3*, que permite que se sintetice este aminoácido. En el medio de selección sin histidina se observa como las levaduras que expresan IDD2, IDD7 o IDD11 junto con RGA52 o M5GAI son capaces de crecer, mientras que no ocurre lo mismo con el control negativo en el que el dominio Gal4-AD no está fusionado a nada. Estos resultados indican que GAI y RGA son capaces de interactuar con IDD7 e IDD11 y están en línea con nuestra hipótesis, pudiendo mediar estos TFs en la regulación de *GID1a* por DELLAs. A continuación, probamos si esto podía ser así mediante ensayos de transactivación.

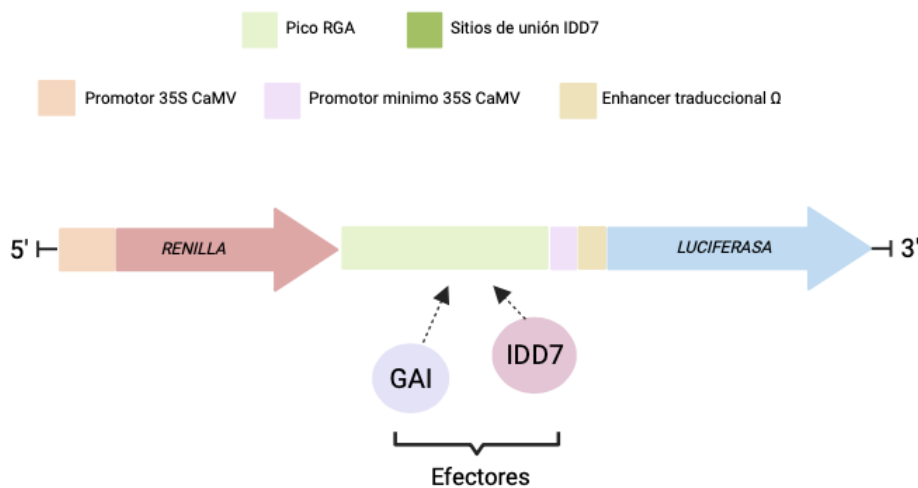


**Figura 17.** Ensayo de interacción proteína-proteína por Y2H. En este ensayo hemos probado la interacción de M5GAI y RGA52 con los factores de transcripción IDD2, IDD7

e IDD11 en medio selectivo sin histidina. Diluciones de levaduras en medio sin leucina (L) ni triptófano (W), y medio sin leucina (L), triptófano (W) ni histidina (H) incubadas 28°C durante 2 días. AD corresponde a fusiones a Gal4-AD expresadas en el vector pGADT7 y BD a fusiones Gal4-DNA BD, expresadas desde el vector pGBKT7.

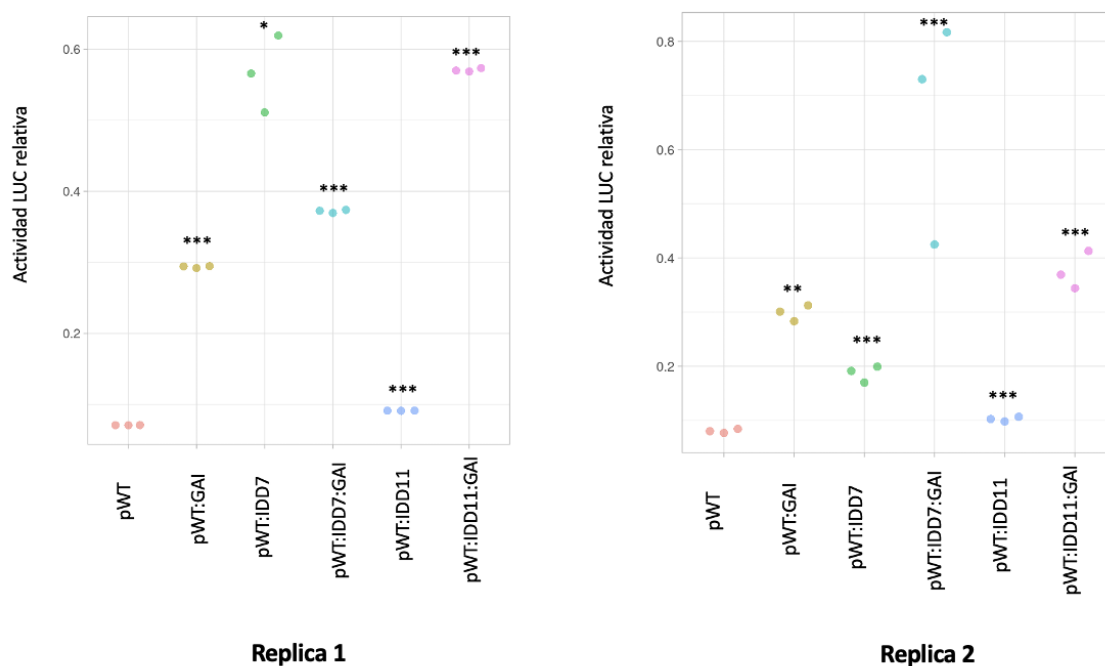
#### 4.2.2 Ensayo de transactivación

Para determinar si las proteínas DELLA son capaces de activar la expresión del gen *GID1a* vía interacción con IDD7/IDD11, realizamos experimentos de transactivación en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello, en primer lugar, preparamos una construcción mediante GoldenBraid (ver detalles en apartado 3.2.2) en la que el gen *LUCIFERASA* (*LUC*) se controlaba por el “enhancer forward”, más un promotor mínimo 35S y un potenciador de la traducción (Figura 18). Esta construcción contaba además con el gen *RENILLA* (*REN*) controlado por el promotor completo 35S. De esta manera, podíamos normalizar la actividad LUC con la de REN (LUC/REN) y comparar ensayos realizados en hojas o plantas diferentes, en las que la eficiencia de la infiltración podía variar. Como efectores empleamos YFP-IDD7/IDD1 e YFP-GAI.



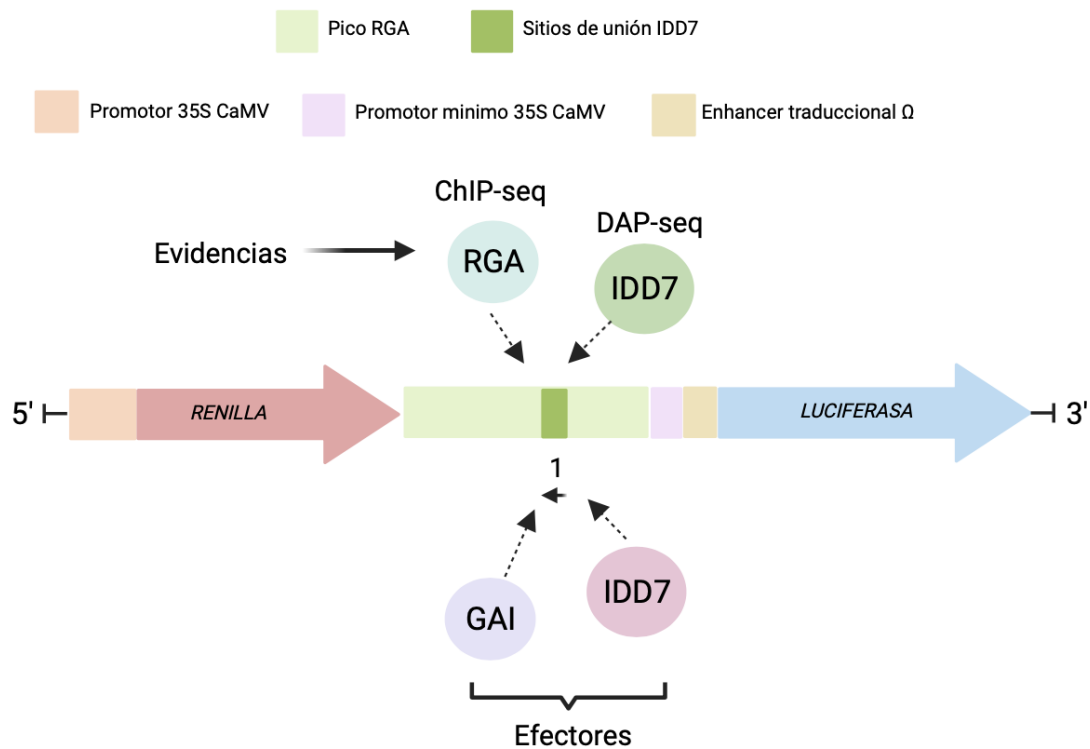
**Figura 18.** Construcción empleada en los ensayos de transactivación con el “enhancer” en orientación “forward”.

Los resultados obtenidos en el ensayo de transactivación muestran que la expresión del “enhancer” silvestre (pWT) es muy baja en comparación con la expresión en combinación de la proteína YFP-GAI (Figura 19). Estos resultados indican que GAI es capaz de activar la expresión del gen *LUC* desde el “enhancer”, probablemente gracias a TF endógenos de *N. benthamiana*. Cuando expresamos el “enhancer” con YFP-IDD7 también se observa un incremento de la actividad LUC si lo comparamos con el promotor silvestre solo. Es de destacar que la actividad del promotor debido a la coexpresión de YFP-GAI + YFP-IDD7 fue mayor que con YFP-GAI solo. La expresión de YFP-IDD11 no causó cambios significativos en la actividad del promotor. No obstante, su coexpresión con YFP-GAI supuso una actividad mayor que la obtenida con ninguno de los dos por separado. Estos resultados se pueden interpretar en clave de nuestra hipótesis. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que tanto GAI como los IDD actúen sobre el “enhancer” de manera independiente.



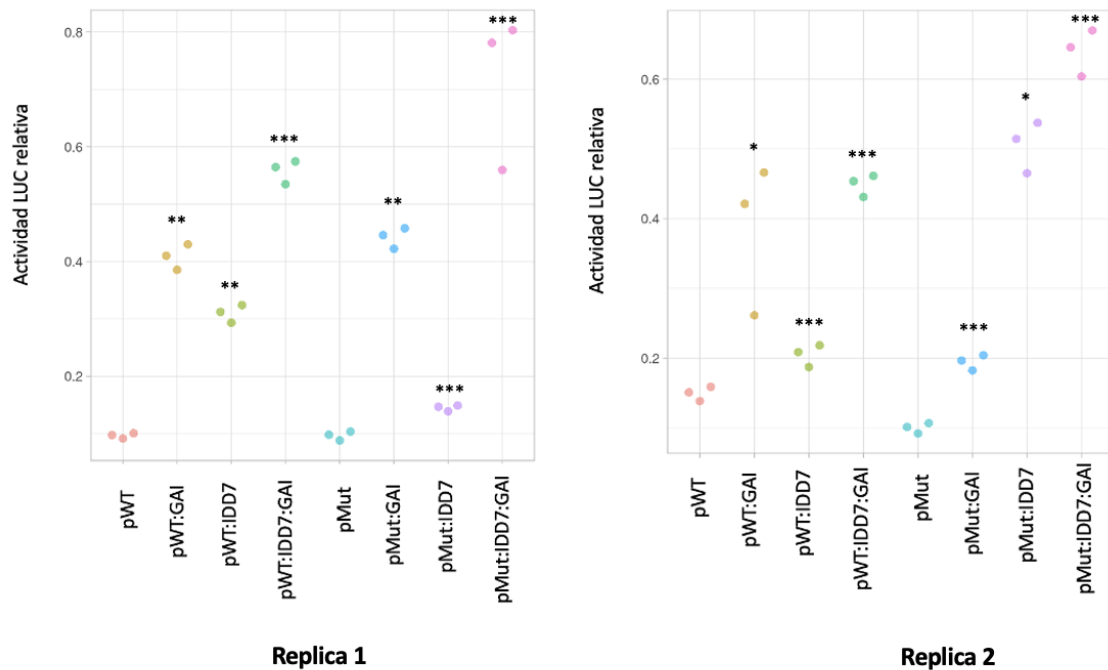
**Figura 19.** Ensayo de transactivación en hojas de *N. benthamiana*. Las muestras fueron normalizadas obteniendo la actividad LUC relativa (LUC/REN). Se presentan 6 combinaciones: “enhancer” silvestre (pWT), con GAI (pWT:GAI), con diferentes IDD (pWT:IDD7; pWT:IDD11), y con IDD7 u 11 + GAI (pWT:IDD7:GAI; pWT:IDD11:GAI). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  comparado con el promotor (pWT), Student’s t-test.

Para probar si la activación ejercida por GAI en el “enhancer” estaba mediada por los IDD7s, se generó una versión del “enhancer” en la que se mutó el sitio 1 de unión de IDD7s, que está alineado con el máximo del pico de CHIP de RGA, que es donde debe estar unida esta proteína DELLA, y donde se une un IDD7 por DAP-seq (Figura 20). Pensamos que este sitio debería ser el principal sitio de regulación por parte de los IDD7s y por tanto de las DELLA.



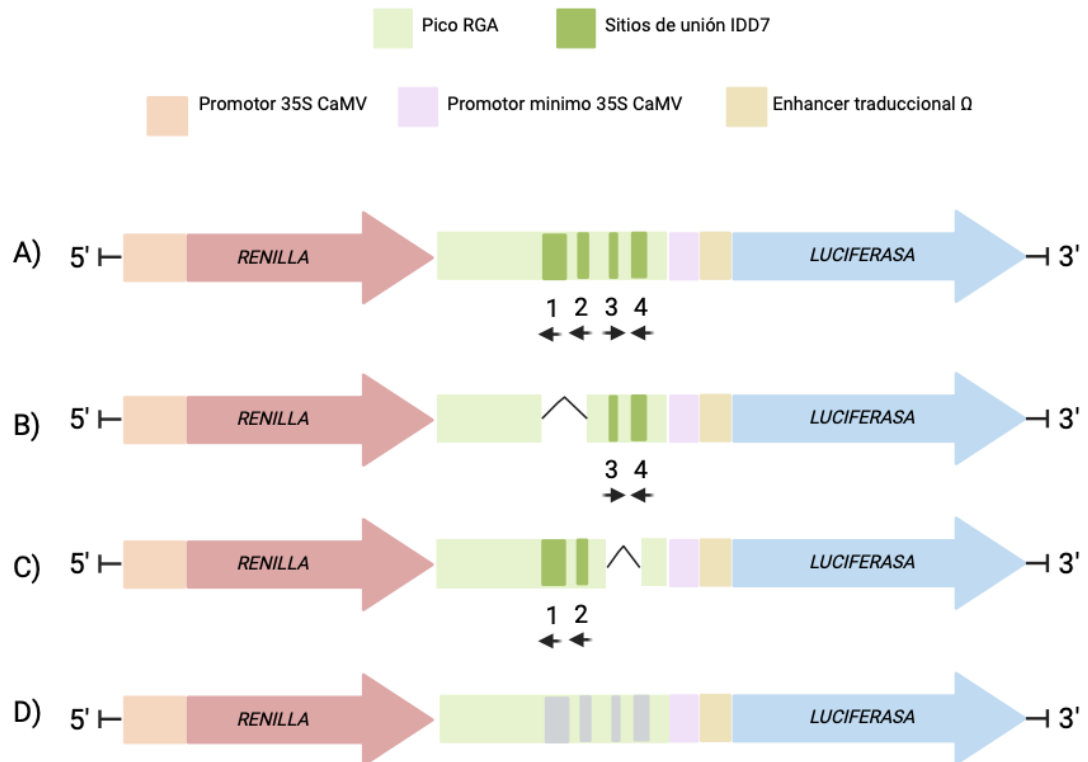
**Figura 20.** Construcción de la región donde se une un RGA (“enhancer”) en orientación “forward” mutado.

El ensayo de transactivación mostró que el promotor mutado se comportó como el silvestre (Figura 21). A la vista de los resultados podemos determinar que la ausencia del sitio 1 de unión IDD7 en el promotor no es suficiente para impedir la interacción con IDD7, probablemente porque existen otros sitios de unión secundarios que adquieren relevancia si el sitio 1 no está operativo. De hecho identificamos tres sitios más que no estaban alineados con el centro del pico de unión de RGA ni de IDD7 (Figura 22). Para probar esta posibilidad generamos tres nuevas versiones mutantes del “enhancer”, eliminando los sitios 1+2, los sitios 3+4 y los cuatro simultáneamente.



**Figura 21.** Ensayo de transactivación en hojas de *N. benthamiana*. Las muestras fueron normalizadas obteniendo la actividad LUC relativa (LUC/REN). Se presentan 8 combinaciones: “enhancer” silvestre (pWT), con GAI (pWT:GAI), con IDD7 (pWT:IDD7), y con IDD7 y GAI (pWT:IDD7:GAI); y “enhancer” mutado (pMUT), con GAI (pMUT:GAI), con IDD7 (pMUT:IDD7) y con IDD7 y GAI (pMUT:IDD7:GAI). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  comparado con el promotor (pWT; pMut), Student’s t-test.

Las deleciones 1+2 y 3+4 del “enhancer” se realizaron por PCR, aprovechando que la región “enhancer” estaba insertada en un vector pUPD2. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar el vector dejando fuera la región que incluía cada pareja de sitios. Los cebadores tenían 20 nucleótidos idénticos en su porción 5', de manera que el producto de PCR resultante tenía extremos solapantes. Tras digerir la reacción de PCR con DpnI (solo digiere ADN metilado, en este caso el molde silvestre), se empleó para transformar *E. coli*, que es capaz de recombinar los extremos del producto de PCR y reconstituir el “enhancer”, pero con la deleción. A continuación, reconstituimos la fusión a *LUC* y posteriormente incorporamos *35S:REN* mediante GoldenBraid. El “enhancer” con la secuencia de los sitios silvestres (TTGTC) cambiada a GGGGG se sintetizó por la empresa IDT. A continuación, se clonó en un pUPD2 y se ensambló con *LUC* y *35S:REN* por GoldenBraid. Las construcciones las dejé listas para su ensayo y debido a falta de tiempo no las he podido utilizar en ensayos de transactivación.



**Figura 22.** Versiones mutantes del “enhancer”. Construcción con el “enhancer” WT (A) y aquellas en las que se han eliminado los sitios 1+2 (B), los sitios 3+4 (C) y los cuatro (D).

## 5. CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos y en relación con nuestros objetivos iniciales, podemos concluir que la región donde se une RGA en el promotor de *GID1a* actúa como un "enhancer" transcripcional y está relacionada funcionalmente con el intrón de *GID1a*. El papel represor de ambas zonas podría ser consecuencia del reclutamiento de un represor transcripcional en las mismas.

En cuanto al estudio del mecanismo por el que las DELLA se reclutan al promotor de *GID1a*, nuestros ensayos revelaron varios puntos clave: I) Las proteínas GAI y RGA pueden interactuar con IDD7 e IDD11. II) GAI e IDD7 son capaces de actuar sobre el "enhancer" activando la transcripción. III) La ausencia del sitio 1 de unión IDD en el promotor no es suficiente para impedir la interacción con IDD7 porque existen sitios de unión secundarios.

¿IDD7 media la regulación de *GID1a* por DELLAs? La respuesta va a requerir el uso de las nuevas versiones del "enhancer" en las que se han eliminado los sitios de unión de secundarios en ensayos de transactivación.

## Perspectivas futuras

Se plantea explorar la respuesta *GID1a* en diferentes contextos mutantes, específicamente en los mutantes *idd7*, *idd11* y el doble mutante. Esto permitirá comprender mejor su impacto en la respuesta de *GID1a* a DELLAs, ofreciendo una visión más completa de la función de estos genes en el proceso. Además, se podría llevar a cabo ensayos ChIP de RGA en el fondo mutante *idd7/11*, permitiendo investigar cómo la ausencia de IDD7 e IDD11 influye en la unión de RGA a la cromatina. Además, se podría usar la tecnología CRISPR-Cas9 para eliminar la región específica del promotor identificada como sitio de unión con IDD7.

Estas acciones representan un camino interesante para entender la relevancia de las proteínas DELLA en la actividad de “enhancers” transcripcionales.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>

Briones-Moreno, A., Hernández-García, J., Vargas-Chávez, C., Blanco-Touriñán, N., Phokas, A., Úrbez, C., Cerdán, P. D., Coates, J. C., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2023). DELLA functions evolved by rewiring of associated transcriptional networks. *Nature plants*, 9(4), 535–543. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01372-6>

Colasanti, J., Tremblay, R., Wong, A. Y., Coneva, V., Kozaki, A., & Mable, B. K. (2006). The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *BMC genomics*, 7, 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-158>

Crocco, C. D., Locascio, A., Escudero, C. M., Alabadí, D., Blázquez, M. A., & Botto, J. F. (2015). The transcriptional regulator BBX24 impairs DELLA activity to promote shade avoidance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature communications*, 6, 6202. <https://doi.org/10.1038/ncomms7202>

Davière, J.-M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development (Cambridge, England)*, 140(6), 1147–1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>

de Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., & Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>

Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., & Sun, T.-P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell*, 16(6), 1392–1405. <https://doi.org/10.1105/tpc.020958>

Eijkelenboom, A., Mokry, M., de Wit, E., Smits, L. M., Polderman, P. E., van Triest, M. H., van Boxtel, R., Schulze, A., de Laat, W., Cuppen, E., & Burgering, B. M. (2013). Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Molecular systems biology*, 9, 638. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.74>

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L. M., & Deng, X. W. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, *451*(7177), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature06448>

Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., & Takahashi, Y. (2014). DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, *26*(7), 2920–2938. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125690>

Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(33), 13446–13451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119992109>

Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. A., Prat, S., Blázquez, M. A., & Alabadí, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Molecular biology and evolution*, *27*(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq012>

Gallego-Giraldo, C., Hu, J., Urbez, C., Gomez, M. D., Sun, T.-P., & Perez-Amador, M. A. (2014). Role of the gibberellin receptors GID1 during fruit-set in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *79*(6), 1020–1032. <https://doi.org/10.1111/tpj.12603>

Gao, X., Zhang, Y., He, Z., Fu, X., 2017. 4 - Gibberellins. In: Li, J., Li, C., Smith, S.M. (Eds.), *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811562-6.00004-9>

Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T. P., & Thomas, S. G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, *18*(12), 3399–3414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047415>

Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>

Hedden, P., & Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in plant science*, 5(12), 523–530. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01790-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01790-8)

Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., & Blázquez, M. A. (2021). Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 109, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.009>

Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., Dumas, R., & Blázquez, M. A. (2019). Origin of gibberellin-dependent transcriptional regulation by molecular exploitation of a transactivation domain in DELLA proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 36(5), 908–918. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz009>

Huang, X., Tian, H., Park, J., Oh, D. H., Hu, J., Zentella, R., Qiao, H., Dassanayake, M., & Sun, T. P. (2023). The master growth regulator DELLA binding to histone H2A is essential for DELLA-mediated global transcription regulation. *Nature plants*, 9(8), 1291–1305. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01477-y>

Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., & Coupland, G. (2016). Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental cell*, 37(3), 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.001>

Lantzouni, O., Alkofer, A., Falter-Braun, P., & Schwechheimer, C. (2020). GROWTH-REGULATING FACTORS Interact with DELLAs and Regulate Growth in Cold Stress. *The Plant cell*, 32(4), 1018–1034. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00784>

Li, J., Li, Q., Wang, W., Zhang, X., Chu, C., Tang, X., Zhu, B., Xiong, L., Zhao, Y., & Zhou, D.-X. (2023). DELLA-mediated gene repression is maintained by chromatin modification in rice. *The EMBO Journal*, 42(21), e114220. <https://doi.org/10.15252/embj.2023114220>

Marín-de la Rosa, N., Pfeiffer, A., Hill, K., Locascio, A., Bhalerao, R. P., Miskolczi, P., Grønlund, A. L., Wanchoo-Kohli, A., Thomas, S. G., Bennett, M. J., Lohmann, J. U., Blázquez, M. A., & Alabadí, D. (2015). Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLoS genetics*, *11*(7), e1005337. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005337>

Marín-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D. J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M. J., Bhalerao, R., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant physiology*, *166*(2), 1022–1032. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244723>

McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T.-P., & Steber, C. M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell*, *15*(5), 1120–1130. <https://doi.org/10.1105/tpc.010827>

O'Malley, R. C., Huang, S. C., Song, L., Lewsey, M. G., Bartlett, A., Nery, J. R., Galli, M., Gallavotti, A., & Ecker, J. R. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell*, *165*(5), 1280–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.038>

Oh, E., Zhu, J. Y., Bai, M. Y., Arenhart, R. A., Sun, Y., & Wang, Z. Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *eLife*, *3*, e03031. <https://doi.org/10.7554/eLife.03031>

Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., & Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & development*, *11*(23), 3194–3205. <https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3194>

Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., & Harberd, N. P. (1999). “Green revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, *400*(6741), 256–261. <https://doi.org/10.1038/22307>

Phokas, A., & Coates, J. C. (2021). Evolution of DELLA function and signaling in land plants. *Evolution & Development*, 23(3), 137–154. <https://doi.org/10.1111/ede.12365>

Richards, D. E., King, K. E., Ait-Ali, T., & Harberd, N. P. (2001). HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 67–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.67>

Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., & Matsuoka, M. (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology*, 134(4), 1642–1653. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033696>

Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-Y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>

Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PloS One*, 6(7), e21622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>

Serrano-Mislata, A., Bencivenga, S., Bush, M., Schiessl, K., Boden, S., & Sablowski, R. (2017). DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height. *Nature plants*, 3(9), 749–754. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0003-y>

Shi, B., Felipe-Benavent, A., Cerutti, G., Galvan-Ampudia, C., Jilli, L., Brunoud, G., Mutterer, J., Vallet, E., Sakvarelidze-Achard, L., Davière, J.-M., Navarro-Galiano, A., Walia, A., Lazary, S., Legrand, J., Weinstain, R., Jones, A. M., Prat, S., Achard, P., & Vernoux, T. (2021). A quantitative gibberellin signalling biosensor reveals a role for gibberellins in internode specification at the shoot apical meristem. En *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.11.448154>

Sukiran, N. A., Pollastri, S., Steel, P. G., & Knight, M. R. (2022). Plant growth promotion by the interaction of a novel synthetic small molecule with GA-DELLA function. *Plant Direct*, 6(4), e398. <https://doi.org/10.1002/pld3.398>

Sun, T.-P. (2008). Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 6, e0103. <https://doi.org/10.1199/tab.0103>

Thomas, S. G., Blázquez, M. A., & Alabadí, D. (2016). DELLA proteins: Master regulators of gibberellin-responsive growth and development. En *Annual Plant Reviews, Volume 49*(pp. 189–228). John Wiley & Sons, Ltd.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-Y., Hsing, Y.-I. C., Kitano, H., Yamaguchi, I., & Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693–698. <https://doi.org/10.1038/nature04028>

Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C. J., Noel, J. P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., & Pichersky, E. (2007). Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell*, 19(1), 32–45. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044602>

Vera-Sirera, F., Gomez, M. D., & Perez-Amador, M. A. (2016). DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. En *Plant Transcription Factors* (pp. 313–328). Elsevier.

Weber, B., Zicola, J., Oka, R., & Stam, M. (2016). Plant Enhancers: A Call for Discovery. *Trends in plant science*, 21(11), 974–987. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.013>

Wilson, R. N., Heckman, J. W., & Somerville, C. R. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. *Plant physiology*, 100(1), 403–408. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.403>

Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>

Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012).

Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), E1192–E1200. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201616109>

Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., Koketsu, E., Mitani, R., Kawamura, M., Ishiguro, S., Tada, Y., Ohme-Takagi, M., Matsuoka, M., & Ueguchi-Tanaka, M. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7861–7866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321669111>