

TRABAJO FIN DE MÁSTER

EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS 'DELLA' EN EL PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE MENSAJEROS



Julián Calleja Cabrera

Curso 2016-2018

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

IBMCP UPV-CSIC

Directores: David Esteve Bruna

David Pablo Alabadí Diego

The role of ‘DELLA’ proteins in alternative splicing

DELLA proteins, the master repressors of the gibberellin (GA) signaling pathway, are thought to regulate gene expression by mechanisms other than their interaction with *bona fide* transcription factors. In particular, current work in our lab shows that DELLA and their atypical interactors prefoldins are able to interact with and regulate a number of proteins that are part of the basal transcriptional machinery, regulating the RNA polymerase II activity. Among the novel interactors being studied are proteins involved in mRNA splicing.

In this TFM, we have investigated the participation of DELLA and prefoldin in alternative splicing by analyzing protein-protein interaction between these proteins and Sm/LSm, which form heteroheptameric complexes and are an essential part of the spliceosome. We have also advanced in obtaining resources to test genetic interactions between della and sm/lsm mutants. In addition, some alternative splicing events affected by DELLA activity identified in a transcriptomic analysis by RNA-seq, have been validated by semiquantitative RT-PCR. Finally, it has been shown that GA signaling alters the Sm and LSm protein levels.

ABREVIATURAS

3AT	3-amino-1,2,4-triazol
ABA	ácido abscísico
ACT2	ACTIN2
Alt 3' ss	sitio de empalme alternativo 3'
Alt 5' ss	sitio de empalme alternativo 5'
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
Co-IP	co-inmunoprecipitación
Col-0	Columbia-0
ES	exclusión de exón
GA	giberelina/s
GAI	GIBBERELIC-ACID INSENSITIVE
GID1	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
GID2	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2
gDNA	ácido desoxirribonucleico genómico
GFP	proteína verde fluorescente
IP	inmunoprecipitación
IR	retención de intrón
JAZ	JASMONATE ZIM-DOMAIN
LB	Luria Bertani
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LSm	<i>like-sm</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	Murashige y Skoog
MT	microtúbulo

| A B R E V I A T U R A S

PAC	paclobutrazol
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PFD	prefoldina
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
RFP	proteína roja fluorescente
RGA	REPRESSOR OF GA1-3
RGL1	REPRESSOR OF GA1-3-LIKE1
RGL2	REPRESSOR OF GA1-3-LIKE2
RGL3	REPRESSOR OF GA1-3-LIKE3
RT	retrotranscripción
SD	medio mínimo sintético
SKP1	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1
SLY1	SLEEPY1
snRNA	ácido ribonucleico pequeño nuclear
snRNP	partícula ribonucleoproteica pequeña nuclear
ssDNA	ácido desoxirribonucleico de simple cadena
T-DNA	ácido desoxirribonucleico de transferencia
YPD	extracto de levadura-peptona-dextrosa

ÍNDICE

I. Introducción	1
I.1. Las giberelinas	1
I.1.1. Las proteínas DELLA y su papel en la señalización de las giberelinas	2
I.2. El complejo prefoldina	3
I.3. Los complejos Sm y LSm y el procesamiento alternativo de mensajeros	4
I.4. Antecedentes y planteamiento del trabajo	8
II. Materiales y métodos	11
II.1. Material biológico	11
II.1.1 Material vegetal	11
II.1.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .	11
II.1.1.1.1. Esterilización, siembra y cultivo	11
II.1.1.1.2. Tratamiento con paclobutrazol y/o giberelinas	12
II.1.1.1.3. Obtención de mutantes múltiples	12
II.1.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i> . Agroinfiltración.	12
II.1.1.3. Recogida y machacado del tejido	13
II.1.2. Material microbiológico	13
II.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> . Transformación, siembra y cultivo	13
II.1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Transformación, siembra y cultivo	14
II.1.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	14
II.1.2.3.1. Transformación, siembra y cultivo	14
II.1.2.3.2. Apareamientos de células haploides y selección de diploides	15
II.1.2.3.3. Ensayo de doble híbrido	15
II.2. Técnicas de Biología Molecular y Celular	16
II.2.1. Estudio de ácidos nucleicos	16
II.2.1.1. RNA. Extracción, retrotranscripción a cDNA y validación de dianas	16
II.2.1.2. DNA genómico. Extracción y genotipado	17
II.2.1.3. DNA plasmídico. Extracción y digestión	18
II.2.2. Estudio de proteínas	19
II.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas de tejido vegetal	19
II.2.2.2. Co-inmunoprecipitación	20
II.2.2.3. Western Blot	20
II.2.3. Microscopía confocal	22
II.2.3.1. Colocalización de proteínas en <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
III. Resultados y discusión	23
III.1. Las proteínas PFD y Sm interaccionan <i>in planta</i>	23
III.2. Las proteínas Sm y LSm interaccionan con las DELLA	24
III.2.1. Las proteínas Sm y LSm interaccionan <i>in vivo</i> con las DELLA	24

III.2.2. Las proteínas Sm y LSm interaccionan <i>in planta</i> con las DELLA	25
III.3. Mutantes múltiples de interés obtenidos	27
III.4. Las proteínas SmB y SmD1 colocalizan con GAI	28
III.5. Las DELLA regulan el procesamiento alternativo de mensajeros	30
III.6. La señalización de giberelinas altera la cantidad de proteínas Sm y LSm	34
IV. Conclusiones	41
V. Bibliografía	43

INTRODUCCIÓN

I.1. Las giberelinas

Las giberelinas (GA) son hormonas vegetales relacionadas con procesos promotores del crecimiento, como la división y elongación celular. De hecho, ambos procesos se ven muy disminuidos en mutantes deficientes en la hormona, siendo la causa de su fenotipo de enanismo. La GA se han relacionado históricamente con procesos de crecimiento y desarrollo (inducen el desarrollo floral y del fruto, la dominancia apical, la expansión foliar o la elongación de los internudos). Sin embargo, numerosos trabajos aparecidos en la última década han mostrado que estas hormonas juegan un papel clave en la respuesta de la planta a situaciones de estrés (Colebrook et al., 2014). En estas situaciones, los niveles de la hormona disminuyen y esto no tiene como consecuencia únicamente un freno en el crecimiento, sino también una activación de los mecanismos de defensa frente a la nueva situación en la que se encuentra la planta. Por tanto, el alcance de las GA en la vida de la planta es enorme.

Como ya se ha adelantado, los niveles de la hormona están muy relacionados con el medio ambiente. Por ejemplo, las GA inducen el proceso de escotomorfogénesis, que es el programa de desarrollo que siguen las plantas tras germinar las semillas en oscuridad, pero cuando la planta recibe luz este proceso se revierte hacia la fotomorfogénesis mediante la inhibición de los genes de síntesis de GA y el aumento de los niveles de enzimas degradadoras, que tiene como consecuencia, entre otras cosas, un freno en el crecimiento del hipocotilo. Con la temperatura ocurre lo contrario: cuando las temperaturas aumentan, dentro de un rango fisiológico, se incrementa la expresión de los genes de síntesis y disminuyen los de inactivación, provocando un aumento en la tasa de crecimiento del hipocotilo. Además, hay una regulación endógena de los niveles de hormona: cuando hay un exceso de GA, los niveles de enzimas de síntesis disminuyen y los de desactivación aumentan, y viceversa (Yamaguchi y Kamiya, 2000).

En muchos casos las GA interaccionan con otras hormonas para regular un proceso fisiológico particular. Por ejemplo, su papel como promotora del desarrollo vegetal la coloca como antagonista de otra hormona vegetal, el ácido abscísico (ABA). Por ejemplo, en el proceso de germinación, mientras que el ABA inhibe que la semilla salga de dormición, las GA promueven el proceso de germinación mediante la movilización de sustancias de reserva del endospermo (Koornneef y van der Veen, 1980; Groot y Karssen, 1987). Si las semillas se cultivan con paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la síntesis de GA, el proceso de germinación se ve bloqueado (Karssen et al., 1989; Nambara et al., 1991).

Las GA median las respuestas fisiológicas a través del cambio en la expresión de genes. El receptor de GA, descubierto en arroz, es la proteína GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), una proteína soluble que se encuentra en el citosol y en el núcleo. GID1 contiene un bolsillo de unión a GA y una extensión del extremo N terminal flexible (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). Así, cuando la GA bioactiva entra en el bolsillo de GID1 y se une a él, el extremo N terminal sufre un cambio conformacional que cubre el bolsillo. La superficie del extremo N terminal que cubre el bolsillo es capaz, a su vez, de unirse al principal represor de las respuestas a GA, la proteína DELLA (Ueguchi-Tanaka et al., 2007), que se describe a continuación.

1.1.1. Las proteínas DELLA y su papel en la señalización de las giberelinas

Las proteínas DELLA actúan como reguladores transcripcionales y se encargan de reprimir las respuestas a GA (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Chandler et al., 2002). Forman parte de la familia GRAS y, como el resto de miembros de la familia, sus dos tercios C-terminal se denomina dominio GRAS, que está conservado y que se encarga de la regulación transcripcional (Bolle, 2004). Lo que distingue a las proteínas DELLA del resto de proteínas de la familia GRAS es su extremo N terminal, que contiene dos motivos conservados: el DELLA (que da nombre a las proteínas) y el TVHYNP. El genoma de *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) codifica 5 proteínas DELLA (GIBBERELIC ACID INSENSITIVE [GAI], REPRESSOR OF *gal-3* [RGA], REPRESSOR OF *gal-3*-LIKE1 [RGL1], RGL2 y RGL3) que juegan tanto papeles específicos como redundantes en la represión de la respuesta a GA. En cualquier caso, la ausencia de actividad de las DELLA revierte los fenotipos de plantas deficientes en GA (Dill et al., 2001; King et al., 2001; Lee et al., 2002; Tyler, 2004; Yang et al., 2004).

Como se comentó anteriormente, el complejo GA-GID1 se une a las proteínas DELLA mediante el extremo N terminal de GID1. Esta unión se realiza con los motivos DELLA y TVHYNP (Ueguchi-Tanaka et al., 2007). Estos motivos son esenciales para poder formar el complejo, ya que su eliminación provoca que las proteínas DELLA son incapaces de unirse a GID1 en presencia de GA (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). En ausencia de GA las DELLA se acumulan y se reprimen las respuestas de la hormona. Cuando los niveles de GA aumentan, sin embargo, se estimula la degradación de las proteínas DELLA (Silverstone et al., 2001).

La formación del complejo GA-GID1-DELLA promueve la degradación de la propia DELLA mediante cambios conformacionales del dominio GRAS, lo que le permite ser reconocida y unirse a la proteína F-box SLY1/GID2 (SLEEPY1/GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2) (Hirano et al.,

2010). Esta proteína F-box forma parte del complejo E3 ligasa de ubiquitina SCF (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (SKP1), CULLIN1, F-BOX), complejo que se encarga de marcar a las proteínas diana con cadenas de poliubiquitina, señal que manda a esas proteínas a degradarse en el proteasoma 26S (Lechner et al., 2006). En consecuencia, cuando la proteína DELLA interacciona con el complejo SCF^{SLY1/GID2}, es marcada como proteína diana y se poliubiquitina para ser finalmente degradada por el proteasoma (McGinnis, 2003; Sasaki, 2003; Dill, 2004; Fu, 2004), permitiéndose las respuestas de GA.

Los mecanismos por los que las DELLA reprimen la respuesta a GA residen en su capacidad de interactuar con una gran diversidad de proteínas reguladoras. Mediante estas interacciones son capaces de eliminar la capacidad de unión a DNA de muchos factores de transcripción a través de su secuestro, como es el caso de algunos de la clase PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) (Feng et al., 2008; De Lucas et al., 2008), o inhibiendo directamente la actividad de reguladores transcripcionales, como pasa con los JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) (Hou et al., 2010). En otros casos las DELLA actúan en el contexto de los promotores, interactuando con los factores de transcripción unidos al ADN (las DELLA no parecen unir ADN directamente), como es el caso de ARR1 (Marín-de la Rosa et al., 2015). De hecho, análisis por ChIP-seq han mostrado que las DELLA aparecen asociadas a numerosas regiones genómicas (Marín-de la Rosa et al., 2015; Serrano-Mislata et al., 2017). Por tanto, las GA, a través de su capacidad de mandar a degradar a las proteínas DELLA, hacen posible que un gran número de factores de transcripción puedan llevar a cabo su función correctamente.

Hasta ahora hemos hablado únicamente de las respuestas de las proteínas DELLA a través de sus interacciones con factores de transcripción, pero en los últimos años se ha comprobado que también es capaz de tomar parte en procesos genómicos por diferentes vías. Esto se vio al identificar como interactores de las proteínas DELLA a las proteínas PREFOLDIN3 (PFD3) y PFD5 (Locascio et al., 2013).

1.2. El complejo prefoldina

El complejo prefoldina es un complejo heterohexamérico (PFD1-6), se encuentra conservado desde levaduras hasta humanos y actúa como cochaperona en el citosol donde se encarga de transportar polipéptidos crecientes de actinas y tubulinas a la chaperona molecular CCT (Vainberg et al., 1998). La actividad de este complejo controla la formación de los heterodímeros de α/β tubulina,

que son la unidad básica que componen los microtúbulos (MT). En *Arabidopsis*, la ausencia o disfunción de alguno de los componentes de complejo causa fallos en la organización de los MT (Gu et al., 2008; Rodríguez-Milla and Salinas, 2009).

La organización de MT en el citosol determina el crecimiento y elongación celular. Si se encuentran desorganizados o de manera longitudinal a la célula se inhibe el crecimiento anisotrópico, pero si se encuentran de manera transversal se da la elongación (Lloyd, 2011). Por otro lado, era sabido que las GA son capaces de inducir la organización transversal de los MT mediante un mecanismo desconocido (Wenzel et al., 2000). Este mecanismo se acabó dilucidando al descubrir que las DELLA interaccionan con el complejo PFD (Locascio et al., 2013). Así, las DELLA promueven la localización de PFD en el núcleo mediante su interacción física, donde no pueden llevar a cabo su función canónica en el citosol, y como consecuencia la cantidad de heterodímeros de α/β tubulina disminuye, causando una desorganización de los MT y frenando el crecimiento anisotrópico de la célula. Esta regulación de PFD por DELLA varía a lo largo del día, ya que las DELLA están reguladas por el reloj circadiano (Arana et al., 2011; Locascio et al., 2013).

En trabajos recientes con levaduras se observó que las PFD tienen un papel adicional cuando se encuentran en el núcleo, participan en la elongación de la transcripción de genes de gran longitud (Millán-Zambrano et al., 2013). Teniendo en cuenta la fuerte conservación del complejo PFD en diferentes organismos, cabe esperar que este complejo pudiese tener un papel similar en las plantas. En el laboratorio en el que se realizó este Trabajo Final de Máster (TFM) se está estudiando las posibles funciones nucleares del complejo en *Arabidopsis*. Se ha visto que varias subunidades del complejo PFD interaccionan con proteínas de los complejos Sm y LSm (Like-Sm), que son de gran importancia en el proceso de transcripción de RNA mensajeros (RNAm).

I.3. Los complejos Sm y LSm y el procesamiento alternativo de mensajeros

Las proteínas Sm y LSm son miembros de una familia de factores encargados principalmente del metabolismo del RNA. Actúan como chaperonas permitiendo una gran variedad de interacciones proteína-RNA y RNA-RNA. Su importancia biológica queda demostrada al haber sido observadas en eucariotas, procariotas y arqueas (Salgado-Garrido et al., 1999; Moller et al., 2002). El nombre Sm proviene del apellido de Stephanie Smith, paciente de lupus en la que se describió a las proteínas Sm como precipitina y antígeno de la enfermedad (Reeves et al., 2003).

En *Arabidopsis* se han identificado 7 proteínas Sm (B, D1, D2, D3, E, F y G), cada una de ellas codificada por dos genes. Como en todos los eucariotas, las 7 proteínas forman heteroheptámeros en el núcleo, que se pueden unir a 4 RNA pequeños nucleares (snRNA) diferentes: U1, U2, U4 y U5. De esta forma, dan lugar a 4 partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNP) encargadas del procesamiento de mensajeros que se define más adelante (Kambach et al., 1999). Este complejo heptamérico, con forma de anillo o donut (Figura 1; Pruijn, 2005), se forma a partir del ensamblaje de 3 subcomplejos (D1-D2, D3-B y E-F-G) en presencia de los snRNA (Nagai y Muto, 2001). Todas las proteínas Sm comparten 2 motivos conservados en sus secuencias, los motivos Sm1 y Sm2. El primero se encuentra cerca del extremo N terminal y cuenta con 32 aminoácidos, mientras que el segundo está próximo al C terminal y comprende solo 14 aminoácidos (Lührmann et al., 1990). Aunque no se ha reconocido ningún motivo de unión a RNA, algunos estudios sugieren que el motivo Sm1 es el encargado de la interacción de las proteínas Sm con los RNA, mientras que el motivo Sm2 es el responsable de las interacciones proteína-proteína (Raker et al., 1999).

Por su parte, las proteínas LSm cuentan con 8 miembros (1-8) codificados por 11 genes, ya que LSm1, LSm3 y LSm6 se encuentran duplicados (Perea-Resa et al., 2012). Del mismo modo que las proteínas Sm, contienen los motivos específicos Sm1 y Sm2 que les permiten interaccionar con RNA y con proteínas. A diferencia de las Sm, las LSm son capaces de formar dos complejos heteroheptaméricos diferentes, el complejo LSm1-7 y el complejo LSm2-8 (Figura 1). El primero se localiza en el citosol donde participa en el proceso del decaimiento del RNA mensajero (mRNA). El complejo LSm2-8 se localiza en el núcleo y, como los complejos Sm, se une a un snRNA (U6) para formar un snRNP que participa en el procesamiento de mensajeros (Mayes et al., 1999; Lopez y Séraphin, 2000; Olivas y Parker, 2000). Otra diferencia con respecto al complejo Sm es que ambos complejos LSm no forman subcomplejos en ausencia de snRNA y se ensamblan desde un principio como heteroheptámeros con forma de donut.

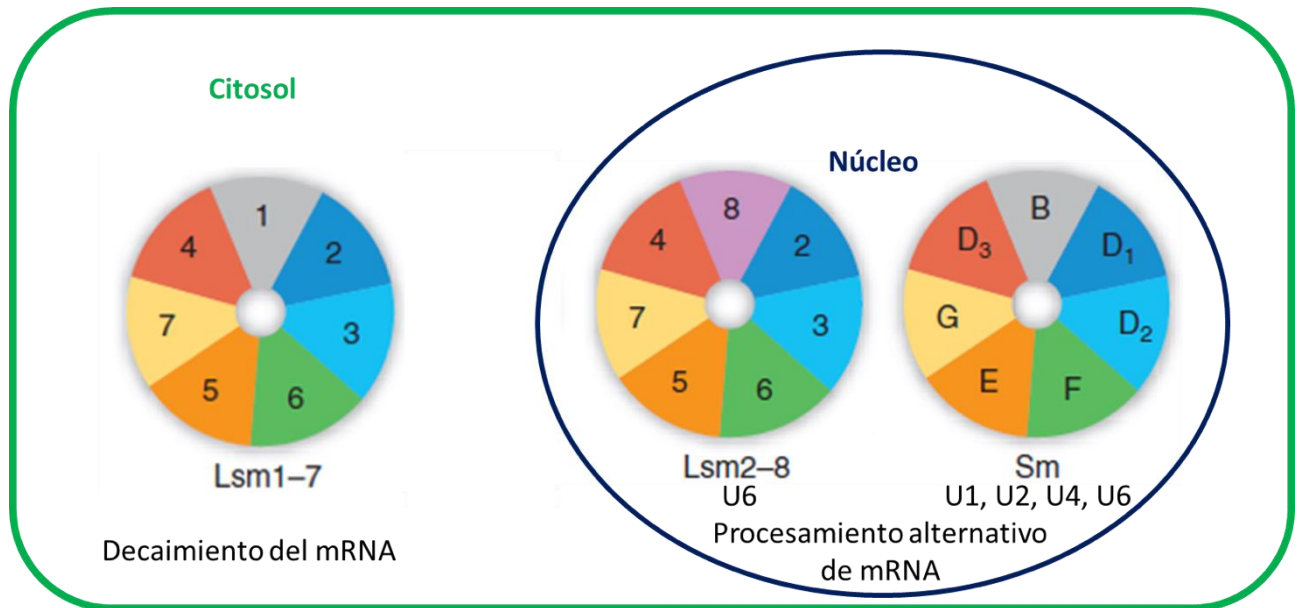


Figura 1. Esquema de la estructura, localización y función de los complejos heteroheptaméricos Sm y LSM. Los colores representan homología de secuencia entre las subunidades Sm y LSM. Tomado, con modificaciones de Wilusz y Wilusz (2005).

En eucariotas la gran mayoría de los genes se transcriben a pre-mRNA (mRNA transcritos primarios). Los pre-mRNA no se traducen directamente por la maquinaria ribosómica, sino que deben ser procesados previamente para dar lugar a los mRNA maduros. Los pre-mRNA pueden contener, además de regiones que no se traducen en los extremos (5'UTR y 3'UTR), dos tipos de secuencias, las que se acaban expresando (exones) y las secuencias intermedias que no se traducen (intrones). Para formar el mRNA maduro los intrones son eliminados de la secuencia, uniendo los exones, en un proceso conocido como *splicing* o corte y empalme (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Este procesamiento de los pre-mRNA está catalizado por una maquinaria dinámica de ribonucleoproteínas llamada espliceosoma (Lerner et al., 1980), que está compuesta por las 5 snRNP previamente mencionadas (Jurica y Moore, 2003; Will y Lührmann, 2011).

Tal y como ocurre en el ensamblaje de los ribosomas, la formación del espliceosoma es un proceso que cuenta de varios pasos que suceden en diferentes compartimentos celulares. Los snRNP se ensamblan de manera estable pero inactiva en el citosol. Posteriormente pasan por un proceso de maduración que les permite llegar a su localización final, el núcleo, donde se ensambla el espliceosoma funcional que requiere de la hidrólisis de gran cantidad de ATP para procesar el pre-mRNA (Will y Lührmann, 2011).

Durante el procesamiento de los pre-mRNA, los intrones y los exones no siempre están determinados. A partir de un mismo gen se pueden producir varios mRNA diferentes mediante la selección variable de las zonas de corte y empalme, a este proceso de formación de mRNA maduros diferentes se le conoce como procesamiento alternativo de mensajeros o *splicing* alternativo (Black, 2003). El procesamiento alternativo tiene un papel clave en la expresión génica durante el desarrollo y en respuesta a señales ambientales. Así, su regulación en diferentes tipos celulares y bajo diferentes condiciones depende de la secuencia de los pre-mRNA y de la concentración y actividad de las proteínas de unión a RNA (Graveley, 2001; Lareau et al., 2004; Kelemen et al., 2013). El procesamiento alternativo no solo contribuye en incrementar la diversidad del proteoma ante señales endógenas y exógenas, sino que también forma parte de la regulación de la expresión génica mediante la generación de isoformas de mRNA que acaban siendo degradadas, principalmente por decaimiento.

En plantas, se ha desvelado la frecuencia con la que ocurre el procesamiento alternativo de mensajeros en algunas especies, además de la frecuencia relativa de los cuatro tipos de eventos alternativos (Figura 2) que pueden darse (Wang y Brendel, 2006; Filichkin et al., 2010):

- Sitio de empalme alternativo 5' (Alt 5' ss): se usa una zona de empalme diferente para el inicio del intrón (sitio 5').
- Sitio de empalme alternativo 3' (Alt 3' ss): se usa una zona de empalme diferente para el final del intrón (sitio 3').
- Retención de intrón (IR): un intrón no es eliminado del pre-mRNA. Es el tipo de evento más frecuente en plantas (Barbazuk et al., 2008).
- Exclusión de exón (ES): un exón es eliminado en el proceso de corte y empalme.

En los 4 tipos de procesamiento alternativo la consecuencia es que el mRNA maduro tiene una secuencia añadida o eliminada con respecto al estándar. A nivel de la proteína, podrá tener más o menos aminoácidos si no se cambia la fase (la pauta de lectura). Si se cambia la fase, además del cambio de algunos aminoácidos, la consecuencia más frecuente es la generación de un codón de terminación prematuro.

En los últimos años, gracias al análisis por RNA-seq, ha aumentado el número de eventos alternativos descritos en Arabidopsis. Hasta un 61% de los genes con intrones son susceptibles de sufrir procesamiento alternativo (Marquez et al., 2012; Syed et al., 2012). Se debe tener en cuenta que esta estimación se basa, tan solo, en los análisis de plantas cultivadas en condiciones estándar. Es muy posible que el número de genes que sufren procesamiento alternativo aumente aún más si se

mira en diferentes fases del desarrollo vegetal, en distintos tejidos o ante diferentes condiciones de crecimiento y/o estrés.

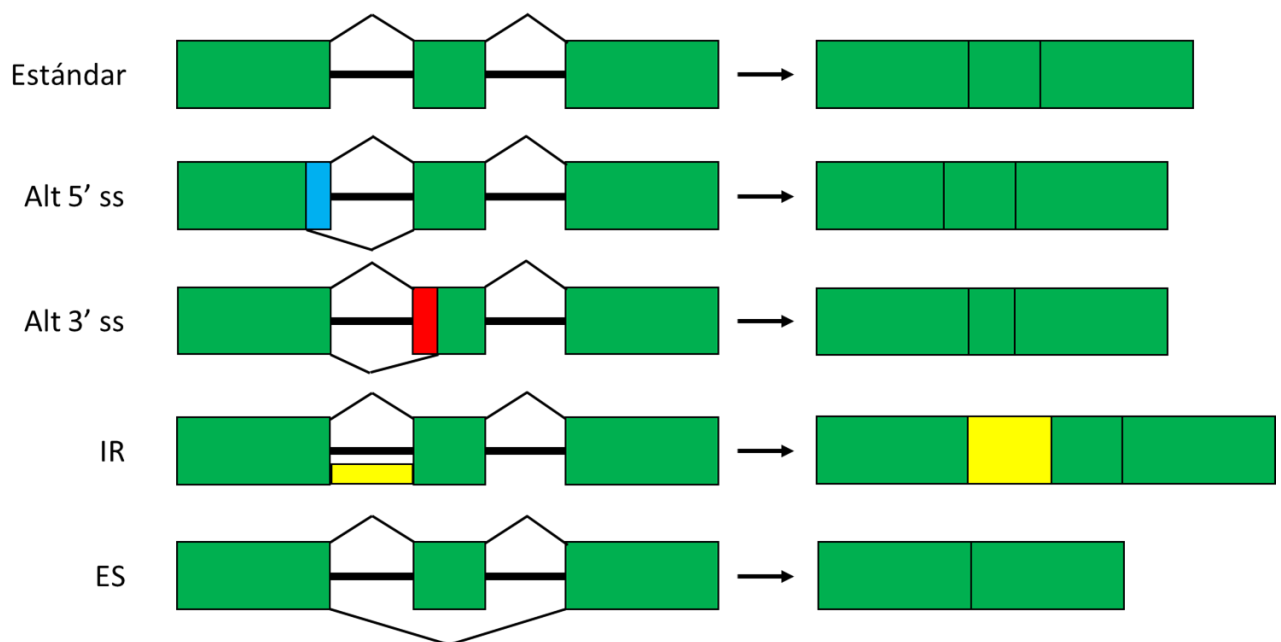


Figura 2. Esquema de los diferentes tipos de procesamiento alternativo. Alt 5' ss: sitio de empalme alternativo 5'. Alt 3' ss: sitio de empalme alternativo 3'. IR: retención de intrón. ES: exclusión de exón. Tomado, con ligeras modificaciones, de Syed et al. (2012).

I.4. Antecedentes y planteamiento del trabajo

Como se ha indicado anteriormente, en el laboratorio se observó que las proteínas PFD interaccionan con las proteínas LSm y Sm. Si bien se confirmó mediante ensayos de doble híbrido y coimmunoprecipitación (Co-IP) la interacción entre PFD y LSm, las interacciones entre PFD y Sm solo se comprobaron mediante el primer tipo de ensayo. Además, en los meses previos al inicio de este TFM, se obtuvieron plantas dobles mutantes de pérdida de función de *PFD* y *LSm* o *Sm*. Los dobles mutantes muestran fenotipos sinérgicos con respecto a los parentales mutantes simples, lo que sugiere una relación funcional entre *PFD* y los genes que codifican las proteínas de los snRNP del espliceosoma. Estudios más intensivos en plantas con niveles de PFD disminuidos mostraron que los niveles del snRNA U6 se veían alterados (Esteve-Bruna, Blanco-Touriñán, Blázquez y Alabadí; sin publicar).

La relación entre las PFD y el procesamiento alternativo de mensajeros se confirmó al realizarse un RNA-seq de alta cobertura con el mutante de pérdida de función *pdf4*, empleando el paquete de R ASpli para su análisis (Mancini et al., 2016). Se observó que estos mutantes exhibían eventos de

procesamiento alternativo tras un tratamiento en frío. Esto, junto con el conocimiento de que las proteínas PFD interactúan con las proteínas DELLA (Locascio et al., 2013), sugirió la posibilidad de que las proteínas DELLA pudiesen regular de manera directa el procesamiento alternativo de mensajeros.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este TFM se planteó en torno al objetivo principal de que, como ya se ha dicho, las proteínas DELLA puedan regular de manera directa el procesamiento alternativo de mensajeros. Por lo tanto, y en base a lo expuesto, los objetivos concretos planteados en este TFM son los siguientes:

- Confirmar las interacciones entre PFD y Sm.
- Encontrar y confirmar las interacciones entre DELLA y Sm/LSm.
- Estudiar las interacciones genéticas entre los mutantes *della* y *sm/lsm*.
- Validar dianas de procesamiento alternativo obtenidas por RNA-seq.
- Estudiar si la señalización por GA altera los niveles de los complejos Sm y LSm.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Material biológico

II.1.1. Material vegetal

II.1.1.1. *Arabidopsis thaliana*.

En este trabajo se utilizó, como modelo experimental, la planta *Arabidopsis*, en concreto el ecotipo Columbia-0 (Col-0). Todas las líneas mutantes y transgénicas utilizadas en este estudio se encuentran en este fondo genético.

Las líneas mutantes usadas son *gai-td1 rga-29* (cedida por el laboratorio de Stephen G. Thomas; sin publicar), *smd3b* (Swaraz et al., 2011), *lsm8-1* (Perea-Resa et al., 2012), *dellaP (gai-t6 rga-28 rgl1-SK62 rgl2-SK54 rgl3-3*; Park et al., 2013) y *gai-1D* (Park et al., 2013). Tanto *gai-1D* (Peng et al., 1997) como *gai-t6* (Oh et al., 2007) son líneas originalmente generadas en el ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) que posteriormente se introgresaron en el ecotipo Col-0.

Las líneas transgénicas son pLSm1A::LSm1A-GFP y pLSm8::LSm8-GFP (Perea-Resa et al., 2012) y p35S::LSm4-GFP, p35S::SmB-YFP, p35S::SmD1-CFP y p35S::SmD3-GFP (cedidas por el laboratorio de Marcelo J. Yanovsky; sin publicar).

II.1.1.1.1. Esterilización, siembra y cultivo

Previo a la siembra de las semillas, éstas se esterilizaron mediante uno de los siguientes métodos, en ambos encontrándose las semillas en tubos de microcentrífugas:

- a) Esterilización con etanol: Se añadió 1 ml de etanol 70% con Triton X-100 al 0,01% a cada tubo y se dejó en agitación suave durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el etanol 70% y se añadió 1 ml de etanol 96%, dejando en agitación suave durante 5 minutos. Finalmente se depositó el mililitro de etanol junto con las semillas en un papel de filtro estéril, se dejaron secar y se procedió con la siembra.
- b) Esterilización con lejía: Se colocaron los tubos abiertos con las semillas en una campana de cierre hermético. Para generar la atmósfera apropiada se añadió en un vaso de precipitados 100 ml de lejía y 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) 37% y se cerró la campana inmediatamente. Se dejaron las semillas en este ambiente durante 6-14 horas.

Para la siembra de las semillas, se prepararon placas con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa 1% y se sembraron las semillas de manera uniforme. Las placas se cerraron con Micropore, para permitir la transpiración evitando posibles contaminaciones, y se

estratificaron las semillas guardando las placas a 4 °C en oscuridad durante 3-7 días. Pasado el tiempo de estratificación, se sacaron a germinar en cámaras de cultivo en condiciones de día largo o luz continua ($50-60 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \text{ s}}$), a 22-24 °C durante 7-15 días.

II.1.1.1.2. Tratamiento con paclobutrazol y/o giberelinas

El tratamiento con PAC se realizó en placas con MS sólido. Las semillas se dejaron germinar y las plántulas crecieron durante 3 días en medio MS estándar. Posteriormente se traspasaron a placas con MS suplementadas con 10 μM PAC y se cultivaron en condiciones similares a las explicadas en el apartado anterior durante 4 días.

El tratamiento con GA se realizó en placas multipocillo con medio MS líquido suplementado con 50 μM GA₃. El tratamiento se dio durante 4 horas en agitación suave y a 22-24 °C. Las plántulas usadas como control recibieron el mismo tratamiento pero sustituyendo la giberelina por etanol, el disolvente usado para el preparado líquido de la hormona.

II.1.1.1.3. Obtención de mutantes múltiples

En el laboratorio se han realizado cruzamientos dirigidos entre mutantes de pérdida de función en genes que codifican proteínas del espliceosoma (*lsm8-1* y *smd3b*) y mutantes en genes *DELLA* (el mutante de ganancia de función *gai-1D* introgresado en fondo Col-0 y el doble mutante de pérdida de función *gai-td1 rga-29*).

Las semillas F₁ se sembraron y cultivaron *in vitro* como se indica arriba. Dos plántulas F₁ independientes se trasplantaron en macetas con turba:vermiculita:perlita en proporción 1:1:1 tras 7-14 días de cultivo *in vitro*. Una vez producido el alzado (*bolting*), las plantas se tutoraron y se dejaron autofecundar. Las semillas F₂ resultantes se sembraron de la misma manera. Se trasplantaron 22-44 plantas de cada familia F₂ y a los días se recogió tejido foliar para la extracción de DNA y posterior genotipado (véase apartado II.2.1.2.) empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3.

II.1.1.2. *Nicotiana benthamiana*. Agroinfiltración

Para la expresión transitoria de proteínas, por infiltración de *Agrobacterium thumefaciens*, se usó la planta *Nicotiana benthamiana*. Esta planta se usa por tener su sistema de RNA de interferencia alterado permitiendo así la sobreexpresión de las proteínas deseadas (Yang et al., 2004). Tres días antes de la infiltración de hojas de *N. benthamiana*, se prepararon cultivos líquidos de *A. thumefaciens* con las construcciones deseadas en LB suplementado con los antibióticos apropiados para la correcta selección. El día previo a la infiltración cada cultivo se refrescó nuevamente en 5 ml de LB

suplementado con los antibióticos oportunos (preinóculo). El día de la infiltración el preinóculo se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm, las bacterias sedimentadas se resuspendieron en el medio de infiltración (1 mM MES, 0,1 mM MgCl₂ y 200 μM acetosiringona) y se incubaron durante 2-3 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se prepararon los cultivos con las combinaciones de interés y, con ayuda de jeringuillas de 1 ml, se infiltraron las hojas de *N. benthamiana* (Li, 2013; protocolo modificado). Las plantas infiltradas se cultivaron en cámaras de cultivo durante 3 días y posteriormente el tejido infiltrado se recogió y congeló o se visualizó en el microscopio confocal.

II.1.1.3. Recogida y machacado del tejido

Para la recogida del tejido vegetal (tanto de *Arabidopsis* como de *N. benthamiana*), el material (las plántulas o las hojas infiltradas, respectivamente) se recogió y se guardó en bolsitas de papel de aluminio que inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso. El triturado del tejido se hizo durante todo momento con material e instrumentos enfriados con nitrógeno líquido, limitando así toda posibilidad de acción de proteasas. El material se machacó en un mortero y el tejido pulverizado se recogió en tubos de microcentrífuga de 2 ml. Si el tejido no se usó al momento se almacenó a -80 °C.

II.1.2. Material microbiológico

II.1.2.1. *Escherichia coli*. Transformación, siembra y cultivo

Las cepas de *E. coli* usadas en este trabajo son DH5α y DB3.1. Usamos *E. coli* como medio de producción y almacenamiento de plásmidos. La clonación de los insertos de interés se realizó con los sistemas Gateway (empleando la recombinasa LR II; Katzen, 2007; Invitrogen) y Goldenbraid 2.0 (Sarrion-Perdigones et al., 2013). Para transformar *E. coli* con nuestros plásmidos de interés recurrimos al protocolo de transformación por electroporación. Brevemente, en este protocolo añadimos a una alícuota de células electrocompetentes el DNA de interés. Las células se mantuvieron a 4°C y se introdujeron en cubetas de electroporación estériles. La electroporación consistió en una corriente eléctrica de 1500 V durante 5 ms. Tras el pulso se añadió 180 μl de medio LB líquido por cada transformación y se recuperaron las bacterias en tubos de microcentrífuga. Se dejaron incubar durante 1 hora a 37 °C en agitación. Pasado este tiempo se vertió el contenido de cada tubo sobre una placa con LB sólido suplementada con el antibiótico correspondiente, ayudándonos de esferas de vidrio previamente esterilizadas para sembrar de manera uniforme las bacterias. Los cultivos en placa se realizaron a 37 °C durante 12-24 horas.

II.1.2.2. *Agrobacterium thumefaciens*. Transformación, siembra y cultivo

La cepa utilizada de *A. thumefaciens* es C58. Utilizamos esta bacteria para realizar la infiltración en hojas de *N. benthamiana*. El protocolo de transformación de esta bacteria fue similar al utilizado en el caso de *E. coli*, pero la corriente aplicada fue de 1440 V y la incubación posterior se dio durante 2 horas a 28 °C. La siembra en placa es equivalente a la de *E. coli*, aunque el medio contenía más antibióticos (rifampicina y gentamicina, a los que la cepa utilizada es resistente) necesarios para la selección, y finalmente los cultivos en placa se realizaron durante 2 días y a 28 °C.

II.1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de levadura que usamos para los experimentos de doble híbrido son en un principio haploides y con doble auxotrofia para leucina y triptófano, por lo que estas levaduras no podrían crecer por si solas en un medio sin suplemento de estos dos aminoácidos. Las cepas son:

- a) Y187, que se transformó con plásmidos pGADT7, que confieren a la levadura la enzima capaz de sintetizar leucina. Así, tras la transformación, se cultivó en medio SD sin leucina para su selección por auxotrofia. En estos plásmidos hemos introducido las regiones codificantes de genes *LSm* y *Sm* fusionadas al dominio de activación (AD) de GAL4 (Tabla 1).
- b) Y2HGold, esta cepa fue transformada con plásmidos pGBKT7, que confieren a la levadura la enzima necesaria para sintetizar triptófano, por lo que se cultivó en medio SD sin triptófano para su selección. A su vez, tenemos dos versiones del plásmido, una que contiene una versión truncada de RGA (RGA52) y otra que contiene una de GAI (M5GAI), que están fusionadas al sitio de unión (BD) a DNA de GAL4 (Tabla 1).

II.1.2.3.1. Transformación, siembra y cultivo

Para realizar la transformación de levaduras utilizamos un protocolo que combina el choque térmico junto a un tratamiento con polietilenglicol (PEG) (Schiestl y Gietz, 1989; protocolo modificado). Es una combinación de tratamientos con Acetato de Litio (LiAc), DNA de simple cadena (ssDNA), choque térmico y PEG.

Tabla 1. Cepas de levaduras y construcciones con los que han sido transformadas.

Cepa	Vector	Genes	Dominio GAL4
Y187	pGADT7	Familia <i>LSm</i>	AD
Y187	pGADT7	Familia <i>Sm</i>	AD
Y2HGold	pGBKT7	<i>DELLA (M5GAI y RGA52)</i>	BD

La siembra de las levaduras transformadas se realizó en medio SD sólido suplementado con glucosa, uracilo, histidina y otro aminoácido que permita la selección mediante auxotrofia. Es decir, aquellas levaduras transformadas con los plásmidos que confieren la capacidad de sintetizar leucina se sembraron en placas suplementadas con triptófano, y viceversa. Del mismo modo que en la siembra de bacterias, nos ayudamos de esferas de vidrio para distribuir las células de manera uniforme en la placa. El cultivo se realizó durante 2-3 días a 28 °C.

II.1.2.3.2. Apareamientos de células haploides y selección de diploides

Tras el cultivo de las levaduras haploides de interés se realizó su apareamiento para generar diploides (*mating*) (Fields y Song, 1989). Para el apareamiento se inocularon una colonia de cada cepa haploide en 0,5 ml de medio YPD. Este medio, escaso en nitrógeno, induce la diploidización de las levaduras. El tubo de microcentrífuga de cultivo permaneció durante 16 horas a 28 °C en agitación. Pasado este tiempo se sembró el cultivo en una placa de medio SD sólido suplementado con glucosa, histidina y uracilo, pero sin ninguno de los otros dos aminoácidos, para seleccionar solo las células diploides que hayan incorporado ambos tipos de plásmidos y por lo tanto sean capaces de sintetizar la leucina y el triptófano. Las placas se cultivaron durante 2-3 días a 28 °C.

II.1.2.3.3. Ensayo de doble híbrido y goteo

El ensayo de doble híbrido comenzó sembrando las nuevas cepas diploides en medio SD, éstas se cultivaron durante 2 días a 28 °C. Tras este tiempo, se tomaron muestras de los cultivos con puntas de micropipeta y se resuspendieron en agua estéril. Se realizaron tres diluciones seriadas de las levaduras resuspendidas en agua (1/10, 1/100 y 1/1000) y se depositaron 2,5 µl de cada dilución y cada combinación en 4 placas diferentes. La primera corresponde al control de crecimiento, es una placa de SD suplementada con glucosa, uracilo e histidina. La segunda es similar a la primera pero sin histidina, si hay interacción entre las proteínas la enzima producto del gen *HIS3* se reconstituye y es capaz de sintetizar histidina. La tercera y la cuarta son similares a la segunda pero con concentraciones crecientes de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT; 5 mM y 10 mM). El 3AT es un inhibidor competitivo de la enzima codificada por el gen *HIS3* y se usa para evitar falsos positivos debido a la

autoactivación del gen *HIS3*. Una vez realizado el goteo, las placas se dejaron crecer durante unos 3-10 días siendo revisadas a diario para monitorizar el crecimiento de las levaduras.

II.2. Técnicas de Biología Molecular y Celular

II.2.1. Estudio de ácidos nucleicos

II.2.1.1. RNA. Extracción, retrotranscripción a cDNA y validación de dianas

Partiendo de aproximadamente 100 mg de material vegetal pulverizado por muestra, se utilizó el kit Nucleospin® RNA Plant (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del proveedor. Como los pasos posteriores a la extracción del RNA implican análisis por retrotranscripción (RT) seguida de PCR, se trataron las muestras con DNasas incluidas en el kit. El RNA precipitado en cada columna se eluyó en 60 µl de agua y se midió la concentración obtenida con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Si no se realizó la RT inmediatamente después de la extracción del RNA, las muestras se guardaron a -80 °C.

En orden de obtener DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, se llevó a cabo la RT con el kit PrimeScript™ RT Reagent (Takara Bio Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron oligonucleótidos dT (2,5 µM) y 1 µg de RNA de cada muestra. Una vez obtenido el cDNA, se hizo una dilución 1/5 del mismo y, si no se usó inmediatamente, se conservó a -20 °C.

El cDNA obtenido fue usado para su amplificación por PCR con los oligonucleótidos que se recogen en la Tabla 3. En un volumen final de 20 µl se empleó: 1 µl de muestra, tampón de reacción 1X, 1 unidad de polimerasa (MyRedTaq, Bioline) y 0,4 µM de oligonucleótidos. Las condiciones de PCR se resumen en la Tabla 2. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa del 1,5-2% para poder diferenciar fragmentos con pequeñas diferencias de tamaño.

Tabla 2. Condiciones generales de tiempos y temperaturas de los diferentes ciclos de reacción de PCR.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo	Función
1x	95	1 minuto	Desnaturalización
30-50x	95	15 segundos	Desnaturalización
	55	20 segundos	Anillamiento
	72	30 segundos	Elongación
1x	72	7 minutos	Elongación
1x	4	∞	Conservación

II.2.1.2. DNA genómico. Extracción y genotipado

Para extraer DNA genómico (gDNA) de *Arabidopsis* partimos de hojas retiradas de plantas en desarrollo, que fueron congeladas en tubos de microcentrífuga, siguiendo el protocolo modificado de (Edwards et al., 1991). Empleamos esferas de vidrio de 3 mm de diámetro desechables para facilitar el triturado del tejido. El tejido se maceró durante dos repeticiones de 90 segundos en el molino de muestras (Mixer Mill 400; Retsch). Inmediatamente después se añadieron 400 µl de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0,5% SDS) por muestra y se sometió a agitación breve en vórtex. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto, se recogieron 300 µl de cada sobrenadante y se mezclaron con otros 300 µl de isopropanol en nuevos tubos de microcentrífuga. Se dejaron dichos tubos 2 minutos a temperatura ambiente para que el DNA precipitara. A continuación, se sometieron a una nueva centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos y se retiraron los sobrenadantes. Se dejaron secar los tubos, y finalmente el DNA se resuspendió con 100 µl de agua destilada por tubo. Los DNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Para genotipar las mutaciones de DNA de transferencia (T-DNA) se llevaron a cabo dos reacciones de PCR, ambas en las mismas condiciones (Tabla 2), con la única diferencia de los oligonucleótidos utilizados. En una de las reacciones ambos oligonucleótidos (LP y RP) flanquean el lugar del gen donde se encuentra el T-DNA. En la otra, uno de los cebadores flanquea la zona de inserción mientras que el otro se encuentra dentro del T-DNA (LBb1.3 o LB1_SAIL). Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa del 1% y se realizaron electroforesis para analizar mediante las bandas observables en exposición con ultravioleta si las plantas son silvestres o mutantes, y en el segundo caso si la mutación se encuentra en homocigosis o heterocigosis.

En el caso de *gai-1D*, que es un mutante delecional, sólo se hizo una PCR con oligonucleótidos que flanquean la zona delecionada. Los productos de la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% para poder diferenciar el tamaño de las bandas de las plantas silvestres y las mutantes, presentando las heterocigotas ambas bandas.

Los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los mutantes utilizados en este trabajo se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores diseñados para la amplificación por PCR. Secuencia: secuencia nucleotídica en dirección 5'→3'. Tm: temperatura de anillamiento del cebador. F, cebador forward; R, cebador reverse. LP, *left primer*. RP, *right primer*. LB, *left border*.

	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	
Genotipado	gai-td1-LP	CGGTAACGGCATGGATGAG	60	
	gai-td1-RP	AGCTTCGGCGAAGTAAGTAGC	61	
	rga-29-LP	ATGAATGATGATTGAAGTGG	52	
	rga-29-RP	TGGATTGCTTCTGCACAAGCC	61	
	lsm8-1-LP	GGCCTTGTCCTACAGTTCTTTG	62	
	lsm8-1-RP	AAATACGGCCATTTGTTGATG	55	
	gai-1D-F	CTAGATCCGACATTGAAGGA	56	
	gai-1D-R	TCAAGCTGCTCGAGTTTCTG	58	
	SmD3B-LP	AAACCCTAGAATGCGTGATCC	60	
	SmD3B-RP	ATGACAGAACCAAGAAAGGCG	60	
	LB1_SAIL	TGGATAAATAGCCTTGCTTCC	57	
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	53	
	Validación de dianas	ACT2-F	AGTGGTCGTACAACCGGTATT	60
		ACT2-R	GAGGATAGCATGTGGAAGTGA	60
At1g09530-Alt5'ss-F		AGTTACAGACGATTTGGTCCCCT	63	
At1g09530-Alt5'ss-R		GGTGTGCGTTTTACAGAAACAAT	60	
At1g15280-IR-F		GCATGGTGGGGTTCCGACT	62	
At1g15280-IR-R		CCTAAAGCTCCTGGACCAGC	63	
At1g52820-IR-F		AGTGAAGCCAACACAAGACTCT	60	
At1g52820-IR-R		GACACGGTGATAAGGAGAGTG	61	
At4g02430-ES-F		AGAACGATTTACGTCGGGAACC	62	
At4g02430-ES-R		AGTCATAACCATCACGGCCATA	60	
At5g11330-IR-F		TCCGAGTTCTCATTCCCTGAG	61	
At5g11330-IR-R		ACTTTCTTGCTGACTTTAAACTG	60	

II.2.1.3. DNA plasmídico. Extracción y digestión

Para extraer el DNA plasmídico de *E. coli* partimos de 4 ml de cultivo líquido de cada colonia de interés. 3 ml se usaron para realizar la extracción de plásmidos y 1 ml se guardó para realizar el glicerinado de la bacteria si el plásmido que contenía era el deseado. Se utilizó el kit Plasmid Mini

Kit I (E.Z.N.A.) siguiendo las indicaciones marcadas por el proveedor para finalmente resuspender los plásmidos en 30 μ l de tampón TE. Se midió la concentración obtenida mediante un espectrofotómetro Nanodrop. Los plásmidos se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Para comprobar que las bacterias han sido transformadas con el plásmido deseado se realizaron digestiones con varias enzimas de restricción. Las digestiones normalmente se realizaron a partir de unos 500 μ g de plásmido (en un volumen de 8,5 μ l) a los que se le añadieron 1 μ l de tampón 10X y 0,5 μ l de enzima. Se dejaron reaccionar durante 4-16 horas a 37 °C. Pasado el tiempo se cargaron los productos de las digestiones en geles de agarosa del 1%, comprobándose así los fragmentos generados y sus tamaños de banda.

II.2.2. Estudio de proteínas

II.2.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas de tejido vegetal

Hemos utilizado dos protocolos para la extracción de proteínas a partir del tejido vegetal pulverizado (tanto de *Arabidopsis* como de *N. benthamiana*), obtenido como se indica en el apartado II.1.1.4:

- a) Extracción en condiciones desnaturizantes por Laemli: en cada tubo de microcentrífuga se incorporaron aproximadamente 150 μ g del tejido pulverizado y se le añadieron otros 150 μ l de tampón Laemli 2X (0,0675 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 25 % glicerol, 0,015 % azul de bromofenol) con 1 M ditioneitol (DTT). La mezcla se sometió a agitación con vórtex y se hirvió durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se descartó el precipitado, conservando el sobrenadante.

Para la cuantificación de proteínas extraídas por este método se añadieron 5 μ l de cada muestra a 20 μ l de Laemli 1X. Para la realización de la curva de calibrado usamos 5 tubos con diferentes concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA; 0, 0,2, 0,5, 1,1 y 1,5 μ g/ μ l). 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 en Excel la recta de calibrado. Del mismo modo, se midió la absorbancia de las muestras y, con ayuda de la función resultante de la recta, se calculó la concentración total de proteínas.

- b) Extracción en condiciones no desnaturizantes: con este método normalmente partimos de unos 700 μ g de tejido triturado a los que se le añadió 1500 μ l de tampón de extracción (50

mM Tris-HCl pH=7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100 o NP40, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de proteasas) y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas 1X (Roche)). Las mezclas se sometieron a agitación con vórtex y se dejaron durante 15 minutos a 4 °C. Pasado el tiempo, se sometieron a dos centrifugaciones consecutivas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, descartando los precipitados tras cada centrifugación y quedándonos con los sobrenadantes finales.

Para la cuantificación, preparamos tubos con 1 ml de Bradford 1X (Bio-Rad) para cada muestra, añadimos 5 µl de cada muestra de proteínas a los tubos con Bradford y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado el tiempo de espera se midió la absorbancia a 595 nm y se calculó la concentración total de proteínas de cada una de nuestras muestras a partir de una recta de calibrado estándar (Bradford, 1976).

II.2.2.2. Co-inmunoprecipitación

Para el ensayo de Co-IP partimos de extractos de proteínas en condiciones no desnaturalizantes de *N. benthamiana* infiltrada con los *Agrobacterium* que contienen los transgenes que sobreexpresan las proteínas de fusión de interés que queremos confirmar si interaccionan, juntos y por separado. A partir de los extractos de proteína se procedió con el protocolo de la IP:

- a) Por un lado, preparamos los *input*, con 20 µg de proteína total y el volumen necesario de Laemli 4X con DTT, y se hirvieron durante 5 minutos.
- b) Por otro lado, preparamos la IP. Al resto de cada extracto se le añadió 50 µl de una solución que contiene pequeñas bolitas magnéticas que tienen adheridas a su superficie el anticuerpo específico de la proteína que queremos precipitar (α -GFP). Las mezclas se dejaron en agitación suave durante 2 horas a 4 °C. Pasado este tiempo se pasaron las mezclas por las columnas del kit de Miltenyi (μ MACS™), adheridas a un soporte magnético para retener a las bolitas magnéticas, tras cuatro lavados con 200 µL de tampón de extracción se eluyeron las proteínas inmunoprecipitadas en 70 µL de tampón de elución (proporcionado por el fabricante).

En ambos casos, si las muestras de proteínas obtenidas no se usaron inmediatamente después, se conservaron a -80 °C.

II.2.2.3. Western Blot

Los *western blot* se realizaron con los extractos proteicos, obtenidos por cualquiera de los 2 métodos explicados con anterioridad o las muestras resultantes de las IP. El primer paso del

experimento es la separación de las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel está compuesto por dos fases distintas, la superior es la fase de concentración (de menor concentración de acrilamida/bisacrilamida) y la inferior es la de separación (en este trabajo, siempre del 12,5% de acrilamida/bisacrilamida). Las electroforesis fueron siempre a voltaje constante (140 V) durante aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente

Tras la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare Life Sciences) previamente activadas con metanol. Las transferencias se realizaron en condiciones húmedas (la membrana y el gel permanecen sumergidos en tampón de transferencia que está continuamente circulando gracias a un agitador magnético), a 4 °C con un voltaje de 100 V durante 1 hora. Terminada la transferencia se realizó la tinción con Ponceau S (0,1% Ponceau S en 5% ácido acético), que tiñe de manera inespecífica proteínas y permite observar las más abundantes en la membrana. Este proceso consistió en sumergir durante un breve período de tiempo (5-10 minutos) las membranas en solución Ponceau S y posteriormente realizar lavados con agua.

El siguiente paso del experimento consistió en el bloqueo de la membrana con una solución (TBS con 0,1% Tween 20 (TBS-T) + 5% leche en polvo) durante una hora en agitación suave. Tras retirar la solución de bloqueo se añadió una solución con el anticuerpo primario y se dejó hibridar el anticuerpo en dos condiciones equivalentes, 1 hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios que hemos utilizado en este trabajo son dos: uno monoclonal α -GFP (JL8; Clontech Laboratories) y otro dirigido ante el epítipo HA que lleva la peroxidasa de rábano (HRP) conjugada (HA-HRP; Roche Applied Science). En ambos casos las soluciones preparadas fueron de 1:5000. Al retirar el anticuerpo primario se procedió a realizar 4 lavados consecutivos (de 15, 5, 5 y 5 minutos respectivamente) con TBS-T. Si es necesario, se hibridó el anticuerpo secundario en las mismas condiciones. El anticuerpo secundario que hemos utilizado, siempre que usamos como primario JL8 (obtenido en ratón), es el α -Mouse IgG-HRP (GE Healthcare; se obtiene en oveja y lleva conjugada la HRP) en solución 1:10000. Tras los lavados de anticuerpos se realizó la detección de las proteínas mediante el sistema de quimioluminiscencia “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity” (Thermo Scientific), asociado a la reacción catalizada por la enzima HRP, siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras 5 minutos de reacción observamos la presencia de proteínas directamente sobre la membrana con ayuda del aparato LAS-3000 (FujiFilm).

II.2.3. Microscopía confocal

II.2.3.1. Colocalización de proteínas en *Nicotiana benthamiana*

En orden de comprobar que las proteínas Sm (SmB y SmD1) colocalizan en el núcleo celular con las proteínas DELLA (M5GAI), se llevaron a cabo infiltraciones de hojas de *N. benthamiana* con diferentes construcciones conteniendo las proteínas Sm fusionadas a RFP y/o una construcción que contiene M5GAI fusionada a YFP.

Pasados los 3 días tras la infiltración, el tejido se observó bajo el microscopio confocal Leica TCS SL (Leica). Para ello, con la ayuda de un sacabocados, extrajimos muestras circulares de hojas infiltradas, evitando en la medida de lo posible el tejido dañado y la zona sobre la que se aplicó directamente la jeringa. Las muestras del tejido se observaron directamente al microscopio en portaobjetos con agua con el objetivo 40X (también con agua). Para excitar la GFP se empleó un láser de 488 nm, y para excitar la RFP uno de 561 nm. La emisión generada por cada fluoróforo fue recogida entre 509-553 nm y 593-643 nm, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Las proteínas PFD y Sm interaccionan *in planta*

Para confirmar que las proteínas PFD y Sm interaccionan, se llevó a cabo una repetición del ensayo de doble híbrido previamente realizado en el laboratorio. Se usaron levaduras diploides, obtenidas tras transformar cepas haploides con las proteínas de fusión BD-PFD (Y2HGold) y AD-Sm (Y187). Tras el goteo en placas con y sin histidina, y en concentraciones crecientes de 3AT, se confirmó que PFD3 es capaz de interaccionar con SmD1A y SmD2A, mientras que PFD6 interacciona con SmD1A (Figura 3A). No se observó crecimiento del resto de diploides en ausencia de histidina, coincidiendo con el trabajo previo realizado en el laboratorio, por lo que dichas imágenes no se incluyen en esta memoria.

Teniendo en cuenta los resultados del doble híbrido, se llevaron a cabo dos ensayos de Co-IP para confirmar que las interacciones se daban también *in planta*. Se extrajeron proteínas de tejido de *N. benthamiana* infiltrado con proteínas de fusión de PFD (YFP-PFD3 y PFD6-YFP) y/o SmD1A (HA-SmD1A), se llevaron a cabo las IP y los *western blot*. En ambos casos la interacción entre las proteínas fue positiva (Figuras 3B y 3C), concluyéndose que PFD3 y PFD6 interaccionan *in planta* con SmD1A.

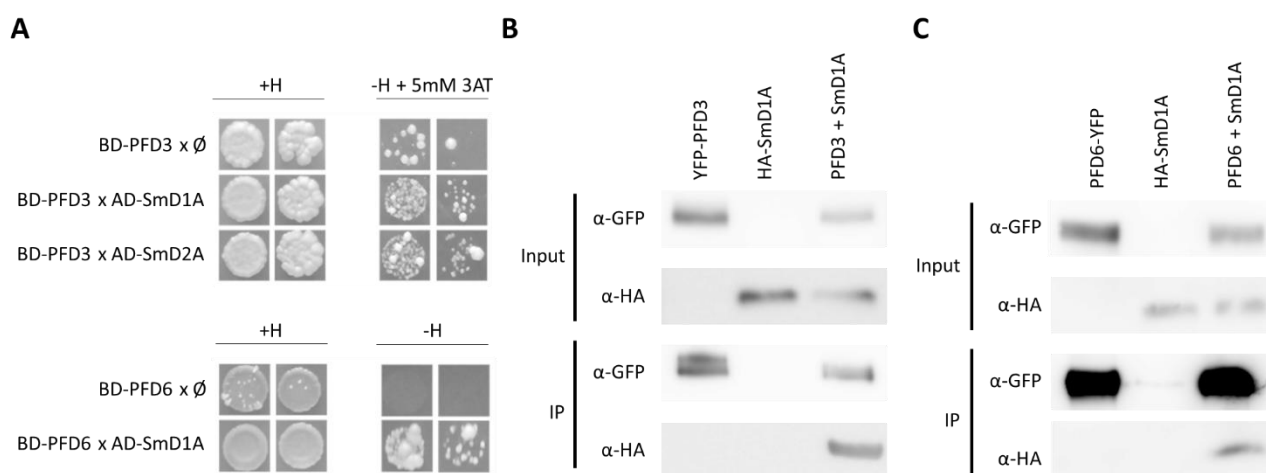


Figura 3. Confirmación de la interacción entre las proteínas PFD y Sm. (A) Resultado de las interacciones positivas por doble híbrido. \emptyset : pGADT7 vacío. +/- H: con/sin histidina. (B-C) Ensayos de Co-IP entre HA-SmD1A y (B) YFP-PFD3 o (C) PFD6-YFP.

III.2. Las proteínas Sm y LSm interaccionan con las DELLA

III.2.1. Las proteínas Sm y LSm interaccionan *in vivo* con las DELLA

El primer paso para cumplir el objetivo de este trabajo fue comprobar si las proteínas Sm y LSm son capaces de interaccionar con las proteínas DELLA. Antes de analizar si las proteínas interaccionan *in planta*, recurrimos al empleo de un modelo experimental más simple. De igual manera a lo contado en el punto III.1., se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido usando levaduras diploides, obtenidas tras aparear cepas haploides con fusiones traduccionales del BD y versiones delecionadas de las proteínas GAI y RGA (M5GAI y RGA52) (Y2HGold) y cepas con las fusiones AD-Sm o AD-LSm (Y187), tal como se indica en el apartado II.1.2.3.2. Estas versiones de las DELLA tienen delecionado el dominio N-terminal, que es el causante de que las versiones enteras activen la transcripción por sí solas en levadura, inhabilitándolas para ensayos por doble híbrido.

En primer lugar, en cuanto a las interacciones directas entre las DELLA y las proteínas Sm, se observó que RGA es capaz de interaccionar con SmD1A, SmEA, SmEB y SmGB; siendo estas interacciones débiles. Con GAI se observaron resultados muy similares pero además aparecieron nuevas interacciones con SmD2A y SmF (Figura 4). Cabe recalcar, sin embargo, que algunas de estas interacciones son débiles ya que el crecimiento en ausencia de histidina no es mucho mayor del que presenta el control negativo (\emptyset /BD-M5GAI), con cierta autoactivación.

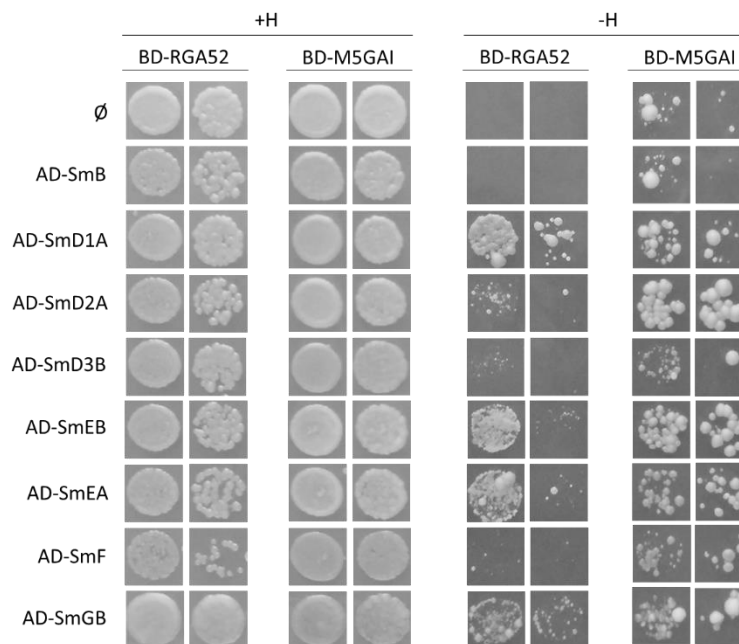


Figura 4. Resultado de los goteos realizados con levaduras diploides que contienen BD-DELLA y AD-Sm. \emptyset : pGADT7 vacío. +/- H: con/sin histidina.

En cuanto a las proteínas LSm, el resultado obtenido tanto con RGA como con GAI es el mismo, tan solo LSm2 daba una señal positiva en el ensayo, por lo que parece ser la única LSm que interacciona directamente con las DELLA (Figura 5). No obstante, esta interacción fue mucho más fuerte que las anteriores ya que, a diferencia de las levaduras diploides BD-DELLA/AD-Sm, las levaduras diploides BD-DELLA/AD-LSm2 fueron capaces de crecer en placas sin histidina y 2,5 mM de 3AT.

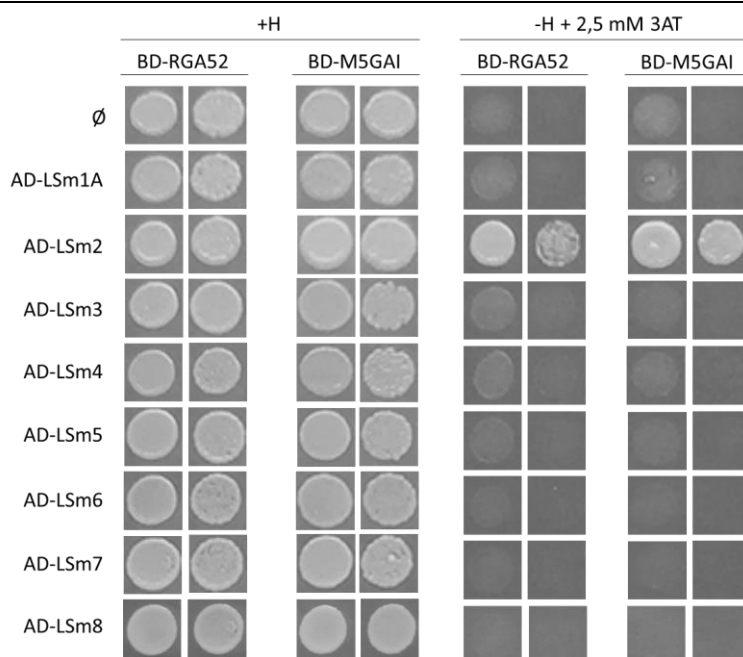


Figura 5. Resultado de los goteos realizados con levaduras diploides que contienen BD-DELLA y AD-LSm. Ø: pGADT7 vacío. +/- H: con/sin histidina.

III.2.2. Las proteínas Sm y LSm interaccionan *in planta* con las DELLA

Tras observar que las proteínas DELLA son capaces de interaccionar *in vivo* de manera directa con las proteínas del espliceosoma, se planteó confirmar estos resultados mediante co-IP para demostrar que las proteínas interaccionan *in planta*. Así, decidimos comprobar mediante dicho sistema las interacciones entre M5GAI y las proteínas SmD1A y LSm2. Como LSm2 puede formar parte de los dos tipos de complejos LSm existentes (LSm1-7 y LSm2-8), también llevamos a cabo el ensayo con las proteínas LSm1A y LSm8, para comprobar si las proteínas DELLA son capaces de interaccionar *in planta* con los factores definitorios de los dos complejos LSm.

Las hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con construcciones que sobreexpresan proteínas de fusión de DELLA (YFP-M5GAI), Sm (HA-SmD1A) y/o LSm (LSm1-HA, LSm2-3xHA y LSm8-HA). De este tejido infiltrado se extrajeron las proteínas con las que posteriormente se realizaron las

IP y los *western blot*. En el caso de la interacción entre M5GAI y SmD1A, podemos observar que la interacción da un resultado positivo (Figura 6).

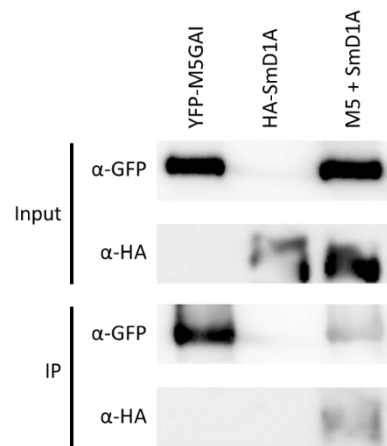


Figura 6. Ensayo de Co-IP entre HA-SmD1A e YFP-M5GAI.

De igual manera, también se obtuvo un resultado positivo de la interacción entre M5GAI y LSm2 (Figura 7A), confirmándose dicha interacción. Los patrones y tamaños de banda (50 kDa para YFP-M5GAI y 14,2 kDa para LSm2-3xHA) son los esperados en *Input* e *IP*. Además, se observó que M5GAI también podía interactuar con LSm1A y LSm8 (Figuras 7B y 7C, respectivamente). Igualmente, las bandas indican que M5GAI y LSm1A y LSm8 interactúan ya que en la *IP* estas proteínas dan señal en los carriles de las plantas infiltrada con ambas construcciones cuando la membrana se hibrida con el anticuerpo anti-HA. Los tamaños de las bandas son los esperados, de 16 y 17 kDa para LSm1A-HA y LSm8-HA, respectivamente.

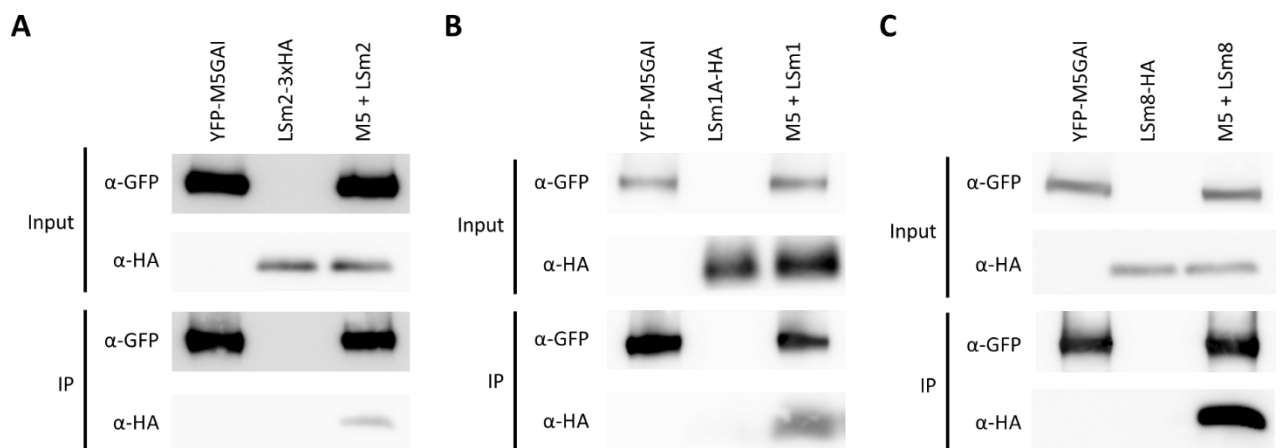


Figura 7. Ensayos de Co-IP entre YFP-M5GAI y (A) LSm2-3xHA, (B) LSm1A-HA o (C) LSm8-HA.

Con estos resultados podemos confirmar lo obtenido en el apartado III.2.1., concluyendo que las DELLA interaccionan *in planta* con las proteínas SmD1A y LSm2. Además, las DELLA son capaces de interaccionar con LSm1A y LSm8, elementos definitorios de cada uno de los dos complejos LSm existentes (Figura 1). El hecho de que GAI interaccione con LSm1 y LSm8 *in planta* y no en levadura puede deberse a que la interacción requiera de alguna modificación post-traducciona en alguna de las dos proteínas que no ocurra en la levadura, o que se requiera de alguna proteína adicional que favorezca la interacción y que esté presente únicamente en la hoja de *N. benthamiana*.

M5GAI es capaz de interaccionar no solo con LSm2, sino que también con LSm8 que forma parte exclusivamente del complejo LSm nuclear que se une al snRNA U6 para formar una de las snRNP del espliceosoma (Mayes et al., 1999). Esto sugiere que las DELLA podrían tener un papel regulatorio sobre el procesamiento alternativo en el núcleo. Pero, además, las DELLA también podrían tener un papel sobre el decaimiento de mRNA en el citosol, al interaccionar con la proteína LSm1, definitoria del complejo LSm citosólico encargada de este proceso (Olivas y Parker, 2000).

III.3. Mutantes múltiples de interés obtenidos

Aunque uno de los objetivos concretos propuestos a la hora de la realización de este TFM era estudiar las interacciones genéticas entre mutantes *della* y *sm/lsm*, la dificultad para la obtención de los mutantes múltiples y la falta de tiempo nos impidió cumplir el objetivo. No obstante, hemos avanzado considerablemente en la obtención del material genético necesario para cumplir el objetivo en un futuro.

Tal y como se indica en el apartado II.1.1.1.3., las plantas F₁ derivadas de los cruzamientos entre los mutantes de interés se cultivaron y se dejaron autofecundar. En las siguientes generaciones (F₂ y F₃), se genotiparon centenares de plantas para intentar obtener los genotipos deseados.

En cuanto a las combinaciones con el mutante *smd3b*, hemos podido obtener únicamente plantas homocigotas para el mutante *gai-1D* y heterocigotas para *smd3b* (*gai-1D/gai-1D;SmD3B/smd3b*) así como plantas con el siguiente genotipo que incluyen mutaciones nulas (*gai-td1*) o hipomorfias (*rga-29*) de DELLA: *GAI/gai-td1;rga-29/rga-29;SmD3B/smd3b*.

Con respecto a las combinaciones con *lsm8-1*, por un lado, no hemos podido obtener los dobles mutantes con el mutante de ganancia de función *gai-1D*, aunque sí obtuvimos plantas de dos genotipos (*gai-1D/gai-1D;LSm8/lsm8-1* y *gai-1D/GAI;lsm8-1/lsm8-1*) en cuya descendencia segregará el doble mutante en proporción ¼. Por otro lado, sí hemos podido obtener un individuo

triple mutante de pérdida de función (*gai-td1/gai-td1;rga-29/rga-29;lsm8-1/lsm8-1*) aunque no hemos tenido tiempo para analizar sus fenotipos morfológicos y moleculares.

Una vez se obtengan todos los múltiples mutantes deseados en homocigosis, se estudiarán fenotipos morfológicos y moleculares (por ejemplo, comprobación de dianas de procesamiento alternativo, véase más adelante). Dichos fenotipos podrán ser muy interesantes para discriminar las interacciones genéticas entre los genes *GAI* y *RGA* y los genes *SmD3B* y *LSm8*.

III.4. Las proteínas SmB y SmD1 colocalizan con GAI

Para reforzar la hipótesis de que las proteínas DELLA tienen un papel en el procesamiento de mensajeros, se llevó a cabo un ensayo de colocalización de proteínas de fusión. Tras introducir estos vectores en *A. tumefaciens* se realizó la agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* y se obtuvieron las imágenes con el microscopio confocal.

Para ambos casos se usaron plantas control infiltradas solo con una de las líneas bacterianas usadas. Las imágenes de dichas plantas no se incluyen en esta memoria ya que se comprobó que YFP-M5GAI mostraba un patrón similar a lo observable en la Figura 8A u 8D. Del mismo modo, tampoco cambió la localización de RFP-SmB ni RFP-SmD1 cuando se infiltraron sin YFP-M5GAI y era equivalente a lo que se observa en las Figuras 8B y 8E, respectivamente.

En las plantas coinfiltradas con las construcciones de M5GAI y SmB se puede observar que ambas proteínas colocalizan en el núcleo (Figura 8C). Aunque se puede ver que M5GAI se localiza también en el citosol (probablemente como consecuencia de elevados niveles de expresión; Figura 8A), la proteína SmB se localiza mayoritariamente en el núcleo, mostrando además pequeños agregados, o *nuclear bodies* (Figura 8B). Esta particularidad pudo observarse también en muchas otras células en las que se expresaba RFP-SmB.

Por su parte, en las plantas infiltradas con M5GAI y SmD1 también se observa que ambas proteínas colocalizan en el núcleo (Figura 8F). De igual manera que en los casos anteriores, M5GAI muestra también localización en el citosol (Figura 8D) y SmD1 se localiza principalmente en el núcleo presentando uno o varios *nuclear bodies* (Figura 8E).

Aunque nuestros resultados de doble híbrido sugieren que SmB no interacciona directamente con las DELLA, forma parte del complejo nuclear Sm, y la colocalización observada con M5GAI es compatible con una interacción, aunque este resultado no es definitivo. La colocalización entre

M5GAI y SmD1 es consecuente con la interacción física observada *in planta* por co-IP, siendo una prueba más a favor de que las proteínas DELLA interaccionan directamente con el complejo Sm, al menos con SmD1. De igual manera a lo que ocurre con SmB, la formación de agregados nucleares de SmD1 ya había sido descrita con anterioridad (Elvira-Matelot et al., 2016). Es de resaltar que M5GAI esté excluido de esos *nuclear bodies* (Figura 8D y E), lo que sugiere que esta localización particular responde a alguna función de SmD1 que no implica interacción con DELLA.

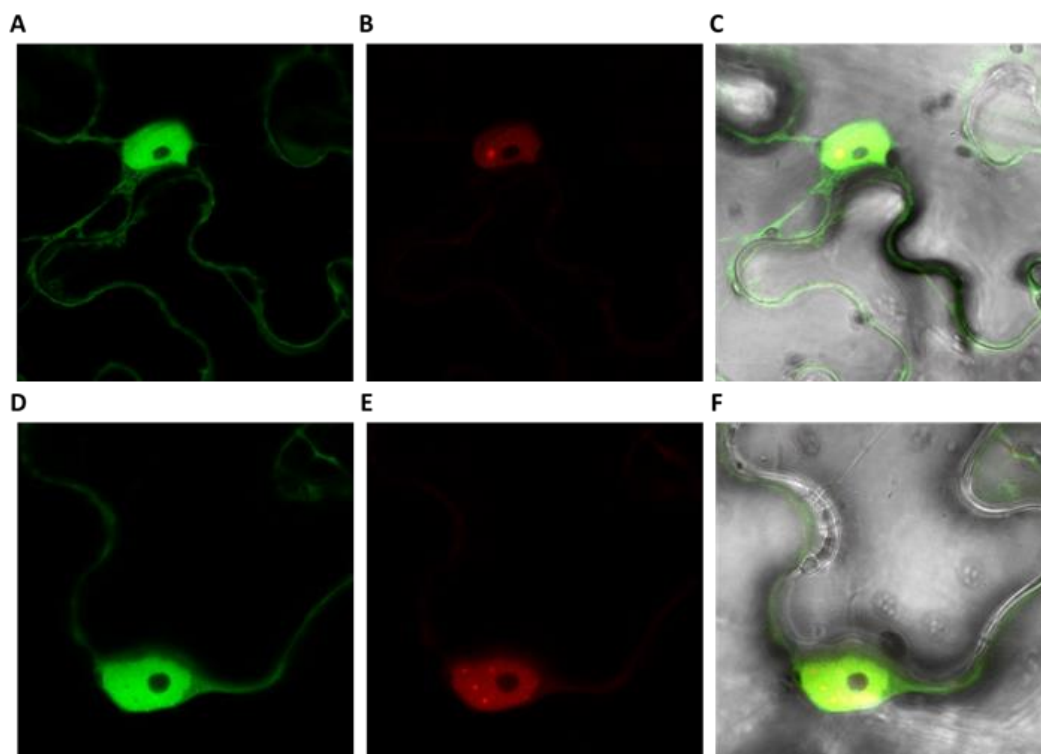


Figura 8. Imágenes de microscopía confocal de células de la epidermis abaxial de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. (A, B y C) Hoja infiltrada con YFP-M5GAI y RFP-SmB; (A) localización de YFP-M5GAI, (B) localización de RFP-SmB y (C) colocalización de YFP-M5GAI y RFP-SmB. (D, E y F) Hoja infiltrada con YFP-M5GAI y RFP-SmD1; (D) localización de YFP-M5GAI, (E) localización de RFP-SmD1 y (F) colocalización de YFP-M5GAI y RFP-SmD1.

Un experimento muy interesante para este trabajo, pero que no se realizó debido a la falta de tiempo, es un ensayo similar que involucrase a las proteínas LSm. En particular a LSm1 que presenta localización principalmente citosólica mientras que las DELLA son nucleares. Así pues, la interacción abre la posibilidad de que en presencia de DELLA, LSm1 pudiera acumularse también en el núcleo y que esto pudiera tener consecuencias en su actividad. De hecho, se ha descrito reclutamiento de LSm1 a la cromatina y su participación en elongación transcripcional en levaduras (Haimovich et al., 2013). Aunque nuestros resultados de doble híbrido sugieren que las DELLA no

interaccionen directamente ni con LSm1 ni con LSm8, sí lo hacen con LSm2, común a los dos complejos. Estos ensayos se tendrán en cuenta para el trabajo posterior a este TFM.

III.5. Las DELLA regulan el procesamiento alternativo de mensajeros

Durante la realización de este TFM, en el laboratorio se llevó a cabo un RNA-seq de alta cobertura y *pair-end* del silvestre (Col-0) y el quintuple mutante *dellaP* tratados con PAC y sin tratar (*mock*). Para encontrar eventos de procesamiento alternativo se usó el paquete ASpli. De esta manera, se encontraron 193 eventos susceptibles a estar controlados por las DELLA. De esos 193, se seleccionaron las dianas (eventos de procesamiento alternativo) más claras para poder validarlas por PCR semicuantitativa.

Con este fin se extrajo RNA de diferentes mutantes de interés de Arabidopsis y se sintetizó cDNA a partir del mismo. Después se realizaron las PCR usando los oligonucleótidos diseñados para cada gen de interés, y además para el gen de control endógeno o *housekeeping ACTIN2 (ACT2)*. Los genes *housekeeping* son genes cuya expresión no varía en las diferentes fases del desarrollo o en diferentes situaciones ambientales y, por lo tanto, son ideales para usarlos como controles endógenos de expresión génica. Tras realizar la electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR analizamos los tamaños de banda y la cantidad relativa de DNA en cada una.

Primero se realizó la PCR de *ACT2* para confirmar que la concentración de cDNA en las diferentes muestras es equivalente de una manera indirecta, comprobando que la cantidad de transcritos de este gen es similar (Figura 9D). El primer gen validado fue *At1g09530* (Figura 9A), cuyo evento de procesamiento alternativo que queríamos comprobar era un Alt 5' ss. Como se puede observar en la Figura 9B, en el RNA-seq se vio que las plantas Col-0 expresan en mayor cantidad la versión alternativa de mayor tamaño cuando se ven sometidas a un tratamiento con PAC. Además, en el mutante *dellaP* se ve aumentado aún más esta variante. Todos estos resultados se vieron reflejados en la validación (Figura 9C), al mostrar el Col-0 una mayor proporción de mensajeros de versión corta que el resto. A pesar de que el mutante dominante *gai-1D*, que es insensible a GA (debe comportarse como el Col-0 tratado con PAC), muestra una mayor acumulación de la versión larga, la proporción sigue siendo favorable a la corta, igual que en el Col-0. Por el contrario, el cDNA amplificado del mutante *dellaP* corresponde principalmente a la versión larga, apuntando a que el procesamiento correcto de este intrón requiere la actividad DELLA.

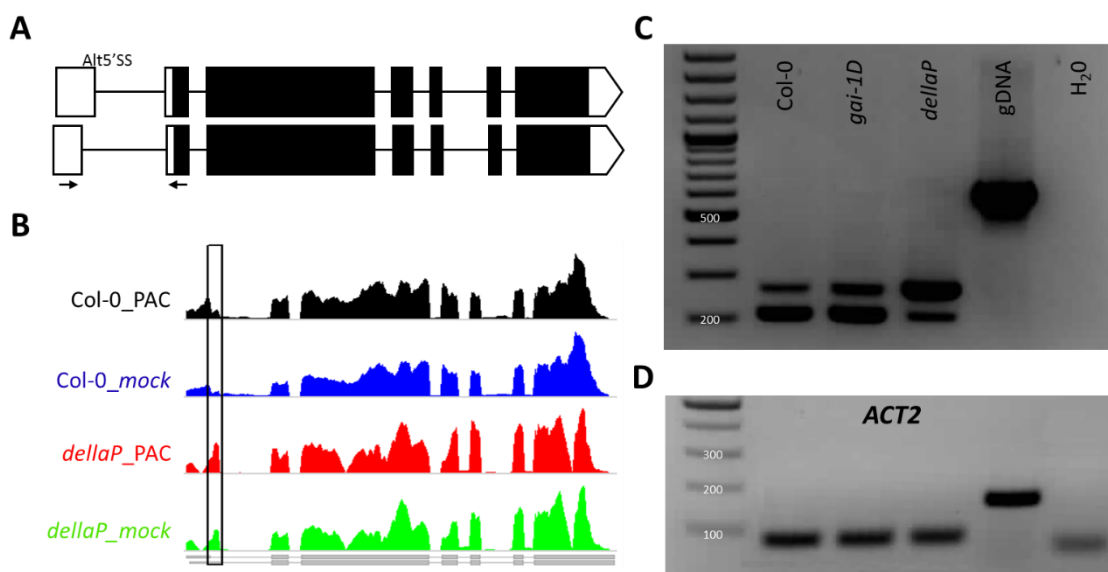


Figura 9. Validación de un Alt 5' SS en *At1g09530*. (A) Dos variantes del modelo del gen, en las que se observa la diferencia de tamaño del primer intrón que da lugar al Alt 5' SS. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. (B) *Secuencing coverage* del gen de las muestras incluidas en el RNA-seq. (C) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR del gen de interés con las muestras de cDNA indicadas y gDNA. (D) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de *ACT2* en las mismas muestras que en C. Los números blancos indican el tamaño del marcador en pares de bases.

La siguiente diana fue un IR en el gen *At1g52580* (Figura 10A). En la Figura 10B se ve como Col-0 sin tratar y *dellaP* apenas retienen el intrón. Sin embargo, Col-0 tratado con PAC retiene en mayor medida el intrón. Como se observa en la Figura 10C, la validación vuelve a coincidir con los datos obtenidos del RNA-seq, teniendo el mutante *gai-1D* una mayor proporción de transcritos con IR, mientras que Col-0 y *dellaP* tienen en mayor medida la versión pequeña del transcrito. En este caso, el correcto procesamiento requiere niveles bajos de DELLA.

Encontramos otra diana interesante en el gen *At4g02430* (Figura 11A), en el que se observa un evento de ES. En la Figura 11B se muestra que las plantas Col-0, tanto sin tratamiento como las tratadas, tienen solo transcritos sin exclusión del exón. El mutante *dellaP*, sin embargo, muestra una mayor cantidad de este evento alternativo. Tal y como se muestra en la Figura 11C, tanto Col-0 como el mutante *gai-1D* muestran un perfil similar, siendo el mutante *dellaP* quien muestra transcritos de menor tamaño resultado de la exclusión del exón a estudio. Estos resultados nos indican que las DELLA son necesarias para que este exón no sea excluido del mensajero maduro, pero no son limitantes, puesto que aumentando su cantidad con PAC o usando una DELLA hiperestable (*gai-1D*) no se observa ningún efecto.

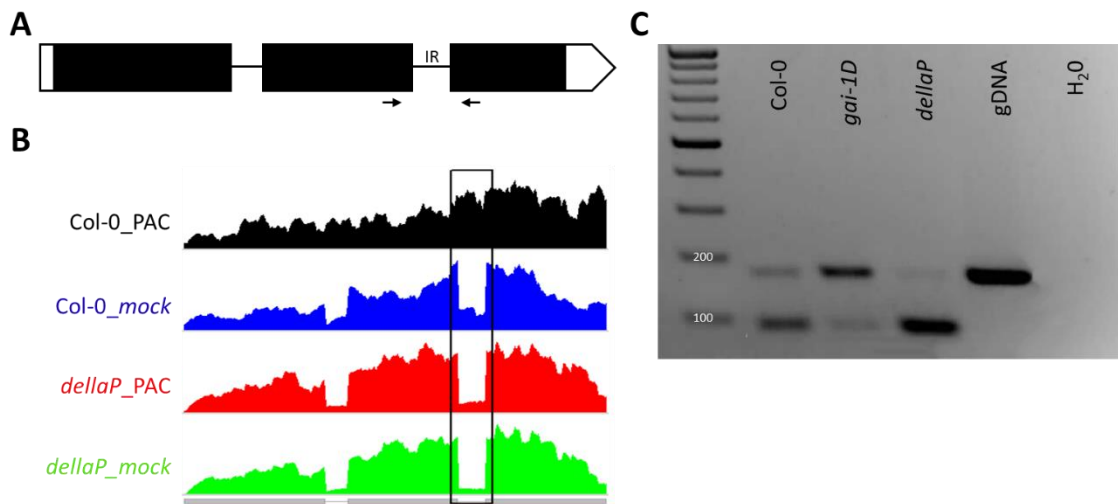


Figura 10. Validación de un IR en *At1g52580*. (A) Modelo del gen, en el que se indica el intrón a veces retenido. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. (B) *Secuencing coverage* del gen de las muestras incluidas en el RNA-seq. (C) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR del gen de interés con las muestras de cDNA indicadas y gDNA. Los números blancos indican el tamaño del marcador en pares de bases.

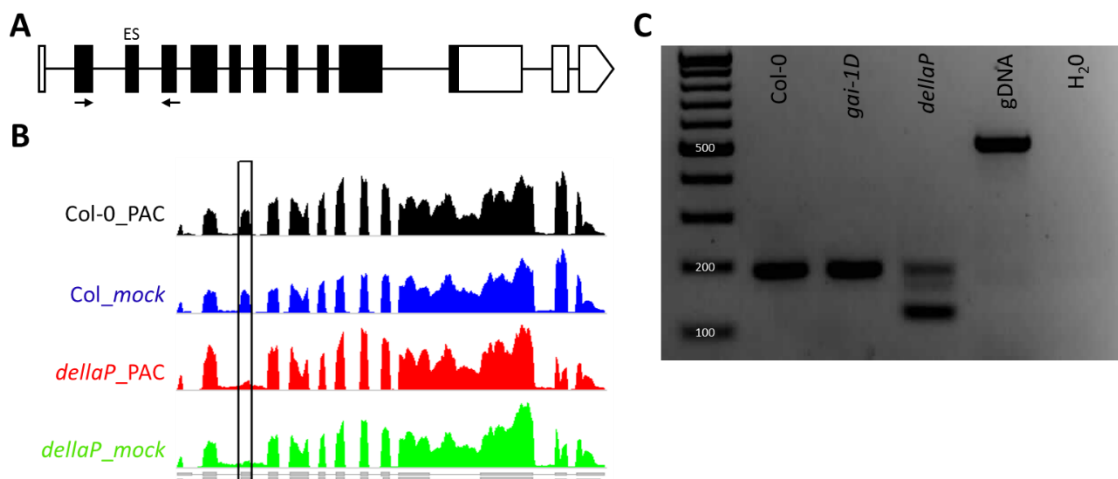


Figura 11. Validación de un ES en *At4g02430*. (A) Modelo del gen, en el que se indica el exón a veces excluido. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. (B) *Secuencing coverage* del gen de las muestras incluidas en el RNA-seq. (C) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR del gen de interés con las muestras de cDNA indicadas y gDNA. Los números blancos indican el tamaño del marcador en pares de bases.

En el RNA-seq se encontraron además una serie de dianas de procesamiento alternativo comunes al mutante *lsm8-1* en otros RNA-seq hechos en el laboratorio. Este mutante es de gran interés por carecer de la proteína definitoria del complejo LSm nuclear. Se repitió la PCR del gen *ACT2* para confirmar que el nivel de expresión del gen de control endógeno era también similar al del resto de muestras (Figura 12D). De los genes con eventos comunes destacaba *At1g15280* (Figura 12A), que

mostraba una IR. Las plantas Col-0 tratadas con PAC y sin tratar mostraban poca proporción de transcritos con el intrón retenido, el mutante *dellaP* parecía mostrar una total ausencia de IR y *lsm8* una cantidad muy superior comparado con Col-0 (Figura 12B). Tanto el *dellaP* como *lsm8-1* muestran un fenotipo molecular similar al obtenido por RNA-seq, y aunque en el primero sí se observa cierto IR, es menor que el de Col-0 (Figura 12C). Se observó que el mutante *gai-1D* no muestra apenas IR a diferencia de Col-0, cuando se esperaría un fenotipo opuesto similar al de *lsm8*, por lo que no podemos sacar conclusiones claras acerca de la implicación de las DELLA en el procesamiento de este gen.

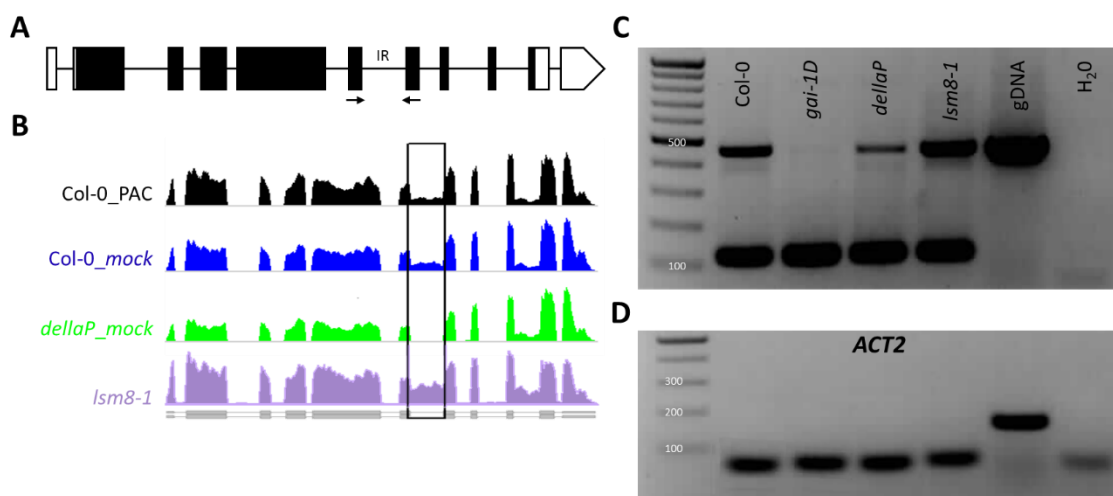


Figura 12. Validación de un IR en *At1g15280*. (A) Modelo del gen, en el que se indica el intrón a veces retenido. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. (B) *Secuencing coverage* del gen de las muestras incluidas en el RNA-seq. (C) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR del gen de interés con las muestras de cDNA indicadas y gDNA. (D) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR de *ACT2* en las mismas muestras que en C. Los números blancos indican el tamaño del marcador en pares de bases.

Otro gen con un evento común a *lsm8-1* es *At5g11330* (Figura 13A), tratándose también de un IR. Tras visualizar las lecturas obtenidas en este gen en los RNA-seq (Figura 13B), observamos que Col-0 muestra una baja proporción de transcritos con el evento. En el silvestre tratado con PAC la proporción de transcritos alternativos disminuye ligeramente. En cambio, en *dellaP* y *lsm8-1* la cantidad relativa de estos transcritos aumenta notablemente. Cuando validamos la diana (Figura 13C), observamos que la banda que define al transcrito con IR es más intensa en *dellaP* y *lsm8-1*, y que esta banda es ligeramente más tenue en *gai-1D* que en Col-0. De los resultados obtenidos en la validación de este evento se concluye que, al menos en este caso, la pérdida de función de las DELLA y LSM8 supone un fenotipo molecular semejante (mayor retención de este intrón), lo que sugiere que las

DELLA podrían estar ayudando al espliceosoma a través de LSM8 a ejercer correctamente su función en el contexto de la transcripción de este gen.

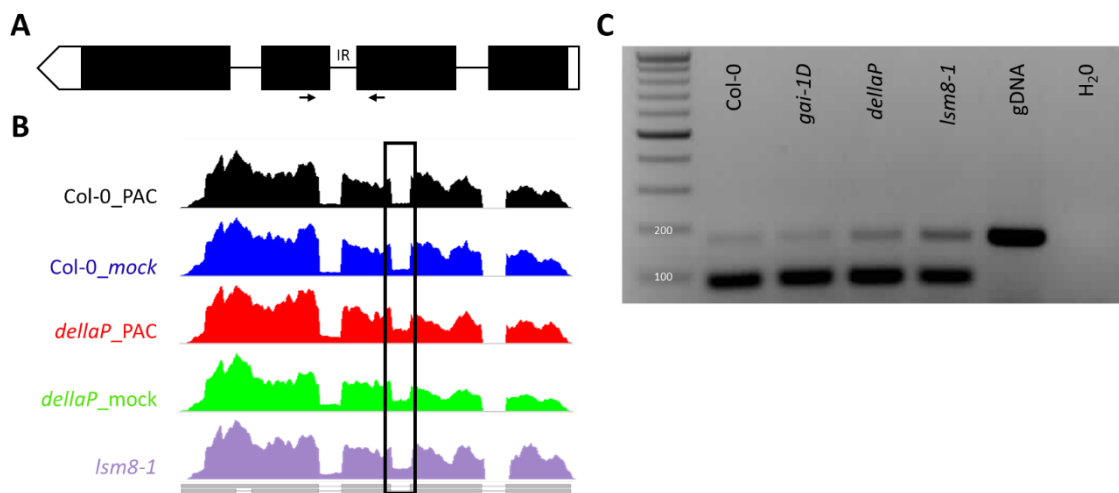


Figura 13. Validación de un IR en At5g11330. (A) Modelo del gen, en el que se indica el intrón a veces retenido. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. (B) *Secuenciación coverage* del gen de las muestras incluidas en el RNA-seq. (C) Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR del gen de interés con las muestras de cDNA indicadas y gDNA. Los números blancos indican el tamaño del marcador en pares de bases.

La validación de las dianas de procesamiento alternativo es un resultado clave para cumplir el objetivo del TFM. Hemos visto que tanto las plantas tratadas con PAC como los mutantes de los genes *DELLA* sufren eventos alternativos de *splicing*. Un paso más de este trabajo, que se realizará de manera posterior al TFM, será la búsqueda de nuevas dianas comunes a diferentes mutantes del espliceosoma y su posterior validación. Esta validación se podrá realizar mediante RT-PCR cuantitativa, lo que nos permitirá validar de una manera más precisa y fiable otras dianas menos claras que de ninguna manera se verían por PCR semicuantitativa.

III.6. La señalización de giberelinas altera la cantidad de proteínas Sm y LSM

Habiendo comprobado que las DELLA interactúan con proteínas del espliceosoma (apartado III.2) y que cambios en la abundancia de DELLA, ya sea por aumento (*gai-1D* o el silvestre tratado con PAC) o disminución de éstas (*dellaP*), provocan alteraciones en el procesamiento alternativo de algunos genes (apartado III.5.), nos preguntamos a continuación cuál podría ser la consecuencia para los complejos Sm y LSM de su interacción con las DELLA. Una hipótesis sencilla de probar es que la interacción con las DELLA estabiliza los complejos, y una predicción sería que un mayor nivel de

GA en las plantas (o lo que es lo mismo, niveles más bajos de DELLA) provocaría una disminución en la cantidad de proteínas Sm y/o LSm. Por su parte, si se bloquease la síntesis de GA, permitiéndose la acumulación de las DELLA, encontraríamos un efecto contrario en el que aumentase la cantidad de estas proteínas.

Para facilitar la realización del experimento, el mismo se dividió en dos ensayos diferentes. En el primer ensayo se utilizaron las plantas transgénicas que disponíamos y que expresan proteínas de fusión de diversas variantes de la GFP y proteínas Sm y LSm. Como se indica en el apartado II.1.1.1., SmB-YFP, SmD1-CFP, SmD3-GFP y LSm4-GFP se encuentran bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que LSm1A-GFP y LSm8-GFP están bajo el control de su promotor endógeno. Las plantas se cultivaron en dos condiciones diferentes, una condición control en MS estándar y otra condición en el que las plantas crecieron los últimos días en MS suplementado con PAC (véase apartado II.1.1.1.2.). Se extrajeron proteínas de estas plantas y se realizó un *western blot*, efectuando la tinción de las membranas con Ponceau como control de que la cantidad de proteína cargada era similar entre las diferentes muestras. Tras el revelado con quimioluminiscencia de las membranas incubadas con el anticuerpo específico (α -GFP), se comprobó que las bandas correspondientes a las proteínas de fusión eran de los tamaños esperados; por su parte, el marcador se detectó con epiluminación.

En el caso de las proteínas expresadas bajo control del promotor 35S, se puede observar en la Figura 14A que el tratamiento con PAC causa una mayor acumulación de las proteínas de fusión. Aunque en algunos casos las diferencias con sus respectivos controles (cultivados en MS estándar) no son muy grandes, la diferencia es muy clara para SmD1-CFP. No observamos cambios claros ni en LSm1A-GFP ni el LSm8-GFP. Además en la Figura 14B se puede comparar la cantidad neta de RbcL, la subunidad grande de la enzima RuBisCO, como control de que se ha cargado aproximadamente la misma cantidad de proteína total en cada carril. En general se puede observar que la intensidad de la banda correspondiente a la RbcL es más o menos similar en todos los carriles. No obstante, en la línea p35S::SmD1-CFP se observa que en el carril correspondiente a las plantas sin tratar con PAC se cargó mucha más cantidad de proteína total que en el de las plantas tratadas, pese a que no se observó señal de SmD1-CFP cuando se realizó el revelado. Esto indica que el tratamiento con PAC claramente provoca una mayor abundancia de esta proteína en las células.

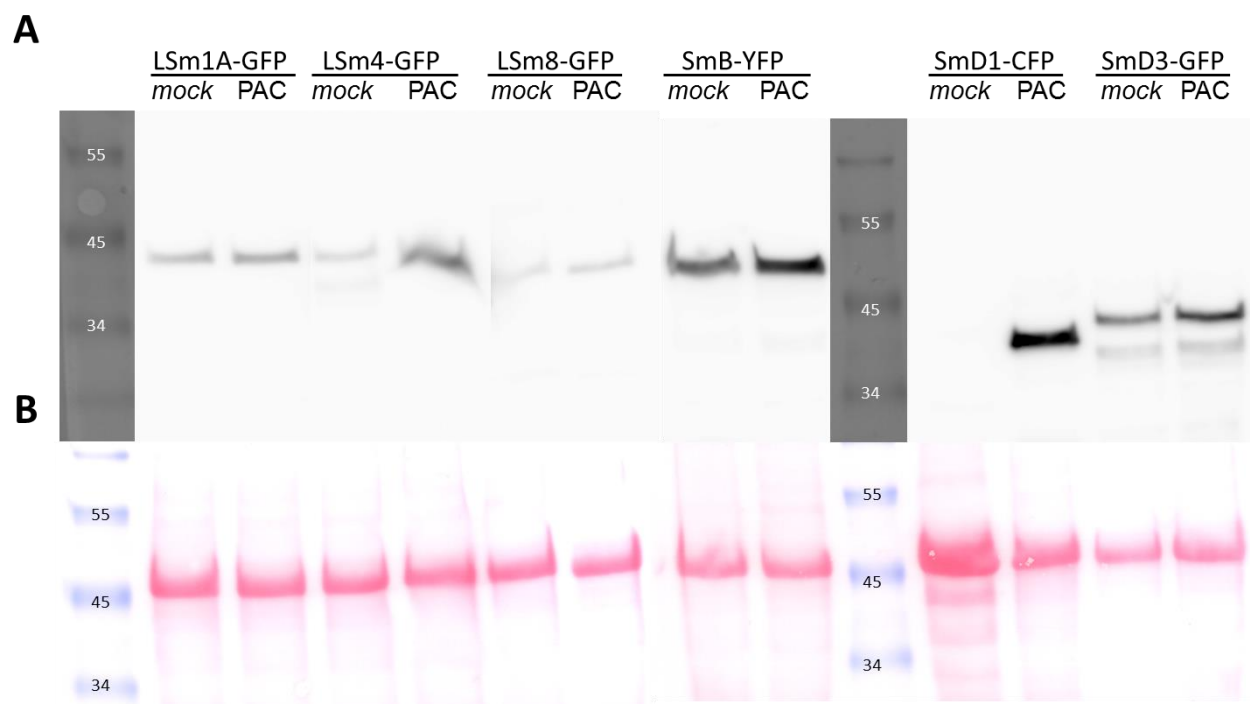


Figura 14. *Western blot* con α -GFP de líneas transgénicas de LSm y Sm tratadas y sin tratar con PAC. (A) Revelado de las membranas por quimioluminiscencia. (B) Escaneado de las membranas tras la tinción Ponceau. *mock*: sin tratamiento. *pac*: tratamiento con PAC. Los números blancos indican el tamaño del marcador en kDa.

En el segundo ensayo se utilizaron solo las líneas de sobreexpresión (SmB-YFP, SmD1-CFP, SmD3-GFP y LSm4-GFP), las cuales nos dieron los resultados más prometedores en el primer ensayo. Cabe destacar, además, que el hecho de que las líneas de sobreexpresión empleen un promotor constitutivo no regulado por GA indica que la acumulación de las DELLA (tratamientos con PAC) causa cambios a nivel post-transcripcional, lo que sugiere que la interacción entre las DELLA y estas proteínas (apartado III.2.) podría estabilizar los complejos Sm y LSm.

En este caso las plantas se cultivaron en 4 condiciones diferentes: cultivo en MS estándar control, cultivo en MS estándar con tratamiento con GA₃ (véase apartado II.1.1.1.2.), y dos condiciones similares a las anteriores (sin y con GA₃) pero con plantas que habían crecido antes en MS suplementado con PAC. De igual manera que en el ensayo anterior, tras los tratamientos se extrajeron las proteínas y se realizó el *western blot*, tiñendo las membranas con Ponceau como control de proteína cargada y comprobando en el revelado que los tamaños de las bandas correspondían a las proteínas de fusión.

Como se observa en la Figura 15A, el tratamiento con PAC, independientemente del posterior tratamiento con GA, causa una mayor acumulación de las proteínas de fusión de SmD1 y SmD3. Sin

embargo, no se repitieron los resultados para SmB-YFP y LSm4-GFP (véase Figura 14). Las diferencias pueden deberse, al menos parcialmente, al método de extracción de proteínas. En el primer caso se extrajeron en condiciones desnaturalizantes, mientras que en este caso se hizo en condiciones nativas (el tampón es menos agresivo y puede que la extracción de las proteínas no sea tan eficiente como en el caso del tampón desnaturalizante).

En cuanto al tratamiento con GA en plantas cultivadas en MS estándar, tan solo observamos el resultado esperado de manera clara en SmD3-GFP, mientras que en SmB-YFP la diferencia es muy pequeña y en SmD1-CFP y LSm4-GFP parece no variar o ir en sentido contrario. En estos dos últimos casos, comparando la cantidad neta de RbcL en la Figura 15B, se ve que la cantidad neta de proteína cargada en el carril correspondiente a las plantas tratadas con GA es superior al resto de carriles de la misma línea, por lo que no se puede asegurar que el tratamiento con GA provoque un aumento de la cantidad de estas proteínas.

Por último, en cuanto al tratamiento con GA tras el tratamiento con PAC, apenas se observa en algunos de los casos una ligera disminución en la acumulación de las proteínas de fusión, siendo los casos más visibles SmD1-CFP y LSm4-GFP. En el caso de SmD3-GFP se puede ver que, aunque en la Figura 15A no haya diferencia de intensidad de banda, en la Figura 15B sí que se ve que la cantidad neta de proteína neta cargada es muy superior en el caso del tratamiento con GA. Concluimos que, en estos casos, el tratamiento con GA de manera posterior al tratamiento con PAC parece provocar una ligera disminución en los niveles de acumulación de la proteína de fusión.

Cabe destacar que la señalización de GA oscila durante el día (Arana et al., 2011) y los experimentos se realizaron con plantas cultivadas en día largo, sin tener en cuenta la hora del tratamiento con GA. Las plantas son menos sensibles a las GA durante el día, por lo que es probable que los tratamientos no hayan sido lo efectivos que se esperaba. En el futuro se repetirán los experimentos en plantas cultivadas en luz continua, donde la regulación por el reloj circadiano está atenuada.

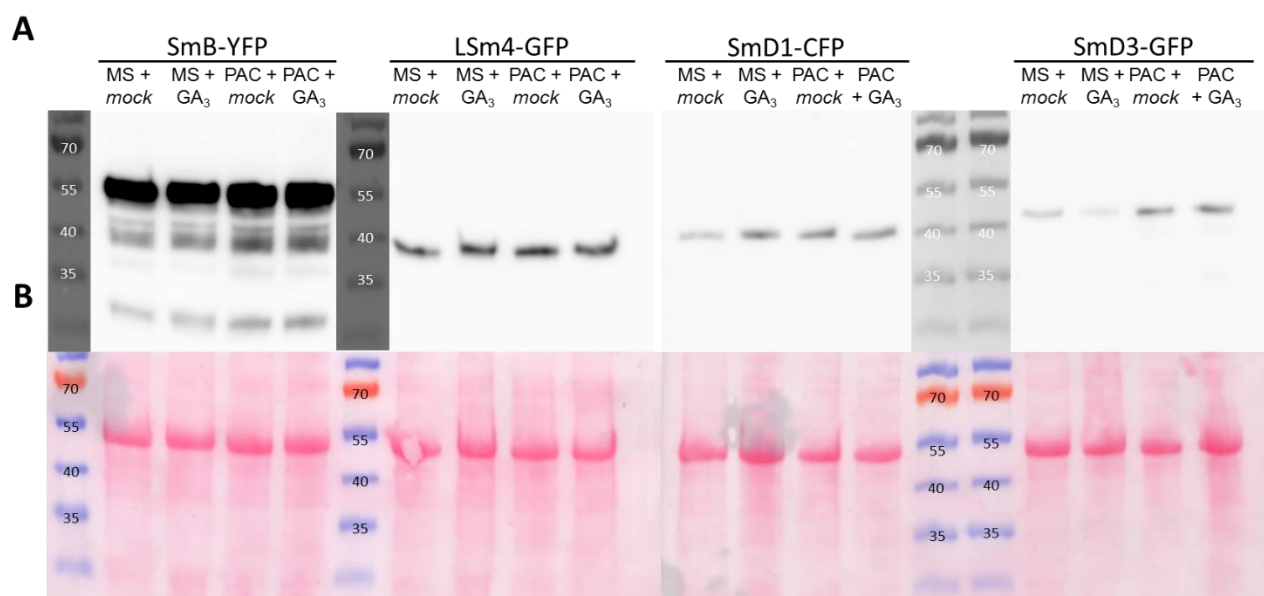


Figura 15. Western blot con α -GFP de líneas transgénicas de LSm y Sm tratadas y sin tratar con PAC y/o GA₃. (A) Revelado de las membranas por quimioluminiscencia. (B) Escaneado de las membranas tras la tinción Ponceau. *mock*: sin tratamiento. *pac*: tratamiento con PAC. MS + *mock*: cultivo en MS estándar y sin tratamiento con GA₃. MS + GA₃: cultivo en MS estándar y tratamiento con GA₃. PAC + *mock*: cultivo en MS suplementado con PAC y sin tratamiento con GA₃. PAC + GA₃: cultivo en MS suplementado con PAC y sin tratamiento con GA₃. Los números blancos indican el tamaño del marcador en kDa.

Con este último experimento observamos que la señalización de GA altera, en mayor o menor medida, los niveles de proteínas Sm y LSm. En general la ausencia de esta hormona y, como consecuencia, la acumulación de proteínas DELLA conlleva un aumento de los niveles de estas proteínas. Si la hormona está presente, y por lo tanto las DELLA se degradan, los niveles de estas proteínas disminuyen.

Con el fin de confirmar estos resultados, habría que repetir el experimento realizando una serie de cambios. Por un lado, como ya hemos dicho, habría que cultivar las plantas en luz continua. Además, podríamos aumentar la dosis de GA₃ (concentración y/o tiempo) para obtener unos resultados más robustos. Finalmente, se deberían analizar las imágenes de manera cuantitativa comparando las intensidades de las bandas de las proteínas de fusión y compararlas con las de la RbcL.

Adicionalmente, sería interesante comprobar si la señalización por GA afecta a la localización subcelular de los complejos. Para ello, las mismas líneas transgénicas se podrían cultivar mediante los 4 tratamientos que hemos utilizado. Tras los tratamientos, observaríamos mediante microscopía confocal la localización subcelular de las proteínas de fusión en cada tratamiento.

En cualquier caso, los resultados de este apartado, junto con los del apartado anterior (III.5.), sugieren que las proteínas DELLA tienen un papel directo en el procesamiento alternativo. Así, las DELLA podrían estabilizar a las proteínas Sm y LSm, lo que afectaría a la formación y función del espliceosoma. Cuando los niveles de las DELLA no son los fisiológicos, al alterarse los niveles de proteínas Sm y LSm, el espliceosoma no se formaría correctamente y se podrían producir eventos de procesamiento alternativo.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas PFD3 y PFD6 interactúan directamente con SmD1A. Estas dos interacciones las hemos confirmado *in planta*. Además, PFD3 interactúa directamente con SmD2A.
2. Las proteínas DELLA interactúan directamente con las proteínas SmD1A, SmEA, SmEB, SmGB, SmD2A y SmF en ensayos de doble híbrido en levadura. Además, se ha observado que la DELLA M5GAI interactúa *in planta* con SmD1A y que dicha interacción ocurre en el núcleo.
3. Las proteínas DELLA interactúan directamente con la proteína LSm2. Además, la DELLA M5GAI interactúa *in planta* con esta proteína, y también con las proteínas definitorias de los dos complejos LSm, LSm1 y LSm8.
4. Las proteínas DELLA parecen estabilizar algunas proteínas Sm y LSm y esto tiene consecuencias en el procesamiento alternativo de algunos mensajeros.

BIBLIOGRAFÍA

- Arana M V., Marin-de la Rosa N, Maloof JN, Blazquez MA, Alabadi D** (2011) Circadian oscillation of gibberellin signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 9292–9297
- Barbazuk WB, Fu Y, McGinnis KM** (2008) Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: Opportunities and challenges. *Genome Res* **18**: 1381–1392
- Berget SM, Moore C, Sharp PA** (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 3171–3175
- Black DL** (2003) Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu Rev Biochem* **72**: 291–336
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683–692
- Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F** (2002) Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol* **129**: 181–190
- Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ** (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1–8
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol* **217**: 67–75
- Dill A** (2004) The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation. *PLANT CELL ONLINE* **16**: 1392–1405
- 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**: 14162–14167
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Elvira-Matelot E, Bardou F, Ariel F, Jauvion V, Bouteiller N, Le Masson I, Cao J, Crespi MD, Vaucheret H** (2016) The Nuclear Ribonucleoprotein SmD1 Interplays with Splicing, RNA Quality Control, and Posttranscriptional Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 426–438
- 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**: 475–479

- Fields S, Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* **340**: 245–246
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC** (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* **20**: 45–58
- Fu X** (2004) The *Arabidopsis* Mutant *sleepy1gar2-1* Protein Promotes Plant Growth by Increasing the Affinity of the SCFSLY1 E3 Ubiquitin Ligase for DELLA Protein Substrates. *PLANT CELL ONLINE* **16**: 1406–1418
- Graveley BR** (2001) Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* **17**: 100–107
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun T -p., et al** (2006) Genetic Characterization and Functional Analysis of the *GID1* Gibberellin Receptors in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE* **18**: 3399–3414
- Groot SPC, Karssen CM** (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* **171**: 525–531
- Gu Y, Deng Z, Paredez AR, DeBolt S, Wang Z-Y, Somerville C** (2008) Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18064–18069
- Haimovich G, Medina DA, Causse SZ, Garber M, Millán-Zambrano G, Barkai O, Chávez S, Pérez-Ortín JE, Darzacq X, Choder M** (2013) XGene expression is circular: Factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.012
- Hirano K, Asano K, Tsuji H, Kawamura M, Mori H, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M** (2010) Characterization of the Molecular Mechanism Underlying Gibberellin Perception Complex Formation in Rice. *Plant Cell* **22**: 2680–2696
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H** (2010) DELLA Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Dev Cell* **19**: 884–894
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J** (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* **13**: 999–1010

- Jurica MS, Moore MJ** (2003) Pre-mRNA splicing: Awash in a sea of proteins. *Mol Cell* **12**: 5–14
- Kambach C, Walke S, Nagai K** (1999) Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 222–230
- Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, Groot SPC** (1989) Key Role for Endogenous Gibberellins in the Control of Seed Germination. *Ann Bot* **63**: 71–80
- Katzen F** (2007) Gateway recombinatorial cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov* **2**: 571–589
- Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, Falaleeva M, Stamm S** (2013) Function of alternative splicing. *Gene* **514**: 1–30
- King KE, Moritz T, Harberd NP** (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767–776
- Koornneef M, van der Veen JH** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor Appl Genet* **58**: 257–263
- Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE** (2004) The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 273–282
- Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P** (2006) F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 631–638
- 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
- Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA** (1980) Are snRNPs involved in splicing? [26]. *Nature* **283**: 220–224
- Li X** (2013) Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*. *Bio-Protocol* **53**: 1689–1699
- Lloyd C** (2011) Dynamic Microtubules and the Texture of Plant Cell Walls. *Int Rev Cell Mol Biol* **287**: 287–329
- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D** (2013) Genomic analysis of della protein activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 1229–1237

- Lopez PJ, Séraphin B** (2000) Uncoupling yeast intron recognition from transcription with recursive splicing. *EMBO Rep* **1**: 334–9
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275
- De Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480–484
- Lührmann R, Kastner B, Bach M** (1990) Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *BBA - Gene Struct Expr* **1087**: 265–292
- Mancini E, Sanchez SE, Romanowski A, Schlaen RG, Sanchez-Lamas M, Cerdán PD, Yanovsky MJ** (2016) Acute Effects of Light on Alternative Splicing in Light-Grown Plants. *Photochem. Photobiol.* pp 126–133
- 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
- Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M** (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Res* **22**: 1184–1195
- Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD** (1999) Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J* **18**: 4321–4331
- McGinnis KM** (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase. *PLANT CELL ONLINE* **15**: 1120–1130
- Millán-Zambrano G, Rodríguez-Gil A, Peñate X, de Miguel-Jiménez L, Morillo-Huesca M, Krogan N, Chávez S** (2013) The Prefoldin Complex Regulates Chromatin Dynamics during Transcription Elongation. *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1003776
- Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bächinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P** (2002) Hfq: A Bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**: 23–30

- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459–463
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nagai K, Muto Y** (2001) Structure and assembly of the spliceosomal snRNPs. *Biochem Soc Trans* **29**: 15–26
- Nambara E, Akazawa T, McCourt P** (1991) Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* **97**: 736–738
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, Sano H** (2000) Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* **245**: 21–29
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H-S, Sun T -p., Kamiya Y, Choi G** (2007) PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds. *PLANT CELL ONLINE* **19**: 1192–1208
- Olivas W, Parker R** (2000) The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J* **19** VN-r: 6602–6611
- Park J, Nguyen KT, Park E, Jeon J-S, Choi G** (2013) DELLA Proteins and Their Interacting RING Finger Proteins Repress Gibberellin Responses by Binding to the Promoters of a Subset of Gibberellin-Responsive Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 927–943
- 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
- Perea-Resa C, Hernandez-Verdeja T, Lopez-Cobollo R, Castellano M d. M, Salinas J** (2012) LSm Proteins Provide Accurate Splicing and Decay of Selected Transcripts to Ensure Normal Arabidopsis Development. *Plant Cell* **24**: 4930–4947
- Pruijn GJM** (2005) Doughnuts dealing with RNA. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 562–564
- Raker VA, Hartmuth K, Kastner B, Lührmann R** (1999) Spliceosomal U snRNP Core Assembly: Sm Proteins Assemble onto an Sm Site RNA Nonanucleotide in a Specific and

- Thermodynamically Stable Manner. *Mol Cell Biol* **19**: 6554–6565
- Reeves WH, Narain S, Satoh M** (2003) Henry Kunkel, Stephanie Smith, clinical immunology, and split genes. *Lupus* **12**: 213–217
- Rodríguez-Milla MA, Salinas J** (2009) Prefoldins 3 and 5 play an essential role in Arabidopsis tolerance to salt stress. *Mol Plant* **2**: 526–534
- Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Séraphin B** (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J* **18**: 3451–3462
- Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palaci J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D** (2013) GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *PLANT Physiol* **162**: 1618–1631
- Sasaki A** (2003) Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. *Science* (80-) **299**: 1896–1898
- Schiestl RHR, Gietz RDR** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339–346
- Serrano-Mislata A, Bencivenga S, Bush M, Schiessl K, Boden S, Sablowski R** (2017) DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height. *Nat Plants* **3**: 749–754
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M** (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1*. *Nature* **456**: 520–523
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T** (1998) The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155–169
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the *RGA* protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555–66
- Swaraz AM, Park YD, Hur Y** (2011) Knock-out mutations of Arabidopsis *SmD3-b* induce pleiotropic phenotypes through altered transcript splicing. *Plant Sci* **180**: 661–671

- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JWS** (2012) Alternative splicing in plants – coming of age. *Trends Plant Sci* **17**: 616–623
- Tyler L** (2004) DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **135**: 1008–1019
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YIC, Kitano H, Yamaguchi I, et al** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693–698
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M** (2007) Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 183–198
- Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, Cowan NJ** (1998) Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**: 863–873
- Wang B-B, Brendel V** (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Pnas* **103**: 602039103
- Wenzel CL, Williamson RE, Wasteneys GO** (2000) Gibberellin-induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. *Plant Physiol* **124**: 813–822
- Will CL, Lührmann R** (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: 1–2
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EMN, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **19**: 1209–1220
- Wilusz CJ, Wilusz J** (2005) Eukaryotic Lsm proteins : lessons from bacteria. **12**: 1031–1036
- Yamaguchi S, Kamiya Y** (2000) Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* **41**: 251–257
- Yang S, Carter SA, Cole AB, Cheng N, Nelson RS** (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by Nicotiana

benthamiana. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 6297–302