



*Miguel Hernández*

Universidad Miguel Hernández de Elche

# **Análisis de la regulación de la expresión del gen *DEAL1* de Arabidopsis**

**Sergio Navarro Cartagena**

Tutores:

José Luis Micol Molina

David Wilson Sánchez

Unidad de Genética

Instituto de Bioingeniería

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Curso académico 2015-2016

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

DAVID WILSON SÁNCHEZ, contratado predoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Graduado Sergio Navarro Cartagena como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

David Wilson Sánchez

José Luis Micol Molina

Elche, 31 de agosto de 2016

## I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En el laboratorio de J.L. Micol se llevó a cabo una búsqueda de mutantes foliares de *Arabidopsis*, en la que se encontraron 706, solo uno de los cuales presentaba hojas vegetativas asimétricas: *desigual1-1* (*deal1-1*). La expresión del gen *DEAL1* se restringe a las células en división activa. En este Trabajo de Fin de Máster hemos iniciado el análisis de su regulación transcripcional mediante un escrutinio de factores de transcripción basado en el ensayo de un híbrido de la levadura. Hemos comparado el promotor de *DEAL1* con los de sus ortólogos en otras brassicáceas, e identificado sus regiones más conservadas. Hemos diseñado y construido a continuación varios cebos que contienen dichas regiones conservadas, con los que hemos sometido a escrutinio una genoteca de presas en la que están representados 1.200 factores de transcripción de *Arabidopsis*. Hemos detectado solo una interacción, con ACTIVATOR OF SPOMIN::LUC2 (ASML2), un factor de transcripción poco estudiado, cuya sobreexpresión incrementa la actividad de genes inducibles por azúcares metabolizables. ASML2 contiene un dominio CCT, como los factores de transcripción CONSTANS, CONSTANS-LIKE y TIMING OF CAB EXPRESSION1, que participan en el control del momento de la floración y el reloj circadiano.

**Palabras clave:** *Arabidopsis*; *DESIGUAL1*; promotor; factor de transcripción; ensayo de un híbrido de la levadura.

In a screen for *Arabidopsis* leaf mutants, conducted in the laboratory of J.L. Micol, 706 insertional lines were identified, only one of which exhibited asymmetric vegetative leaves: *desigual1-1* (*deal1-1*). Expression of the *DEAL1* gene was found restricted to actively dividing cells. In this Master's Thesis we have started the analysis of the transcriptional regulation of *DEAL1* through a screen for transcription factors based on the yeast-one-hybrid assay. We first compared the promoter of *DEAL1* with those of their orthologs in other brassicaceae, and identified their most conserved regions. We then designed and constructed several baits containing these conserved regions, with which a prey library representing 1,200 *Arabidopsis* transcription factors was screened. We detected only one interactor: ACTIVATOR OF SPOMIN::LUC2 (ASML2), a poorly studied transcription factor, whose overexpression increases the activity of genes inducible by metabolizable sugars. ASML2 contains a CCT domain, as the CONSTANS, CONSTANS-LIKE and TIMING OF CAB EXPRESSION1 transcription factors, which participate in the control of flowering time and the circadian clock.

**Keywords:** *Arabidopsis*; *DESIGUAL1*; promoter; transcription factors; yeast-one-hybrid assay.

## VI.- CONCLUSIONES

Se desconoce la base genética de la simetría bilateral, una propiedad fundamental de muchos seres vivos. En este Trabajo de Fin de Máster hemos iniciado el estudio de la regulación de la transcripción del gen *DEAL1* de *Arabidopsis*, cuyos alelos mutantes causan asimetría bilateral en las hojas. Hemos intentado identificar los factores de transcripción que se unen al promotor de *DEAL1*.

Mediante un abordaje basado en el sombreado filogenético, hemos identificado aguas arriba del extremo 5' de la unidad de transcripción de *DEAL1* dos segmentos de su promotor que están muy conservados en distintas brasicáceas. El gen inmediatamente anterior a *DEAL1* es distinto del de *Arabidopsis* en todas las brasicáceas estudiadas; en todos los casos dicho gen adyacente se transcribe en el mismo sentido que *DEAL1*. En consecuencia, hemos considerado a los segmentos conservados del promotor de *DEAL1* candidatos a contener secuencias reguladoras implicadas en el control de la transcripción de este gen.

Hemos elegido tres segmentos del promotor de *DEAL1* para usarlos como cebos —a los que hemos denominado *DEAL1<sub>pro</sub>#1*, *DEAL1<sub>pro</sub>#2* y *DEAL1<sub>pro</sub>#3*— en un escrutinio basado en el ensayo de un híbrido de la levadura. Estos cebos fueron sucesivamente amplificados por PCR, clonados mediante recombinación específica de sitio en el vector *Gateway* de entrada pGEM-T Easy221 y subclonados mediante restricción y ligación en pTUY1H, en ambos casos en células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Las construcciones así obtenidas se transfirieron a células de *Saccharomyces cerevisiae* Y187 $\alpha$ , que se usaron para aparearlas con las YM4271 de una genoteca de 1.200 presas distintas, cada una de las cuales corresponde a un factor de transcripción de *Arabidopsis*.

Solo uno de los apareamientos evidenció una interacción positiva, entre el cebo *DEAL1<sub>pro</sub>#1* y la presa codificada por el gen At3g12890: ACTIVATOR OF SPOMIN::LUC2 (ASML2). Se trata de un factor de transcripción poco estudiado, cuya sobreexpresión incrementa la actividad de genes inducibles por azúcares metabolizables. ASML2 contiene un dominio CCT, como los factores de transcripción CONSTANS, CONSTANS-LIKE y TIMING OF CAB EXPRESSION1, que participan en el control del momento de la floración y el reloj circadiano.

Los resultados de un escrutinio basado en el ensayo de un híbrido de la levadura deben validarse mediante otros métodos: la interacción física ADN-proteína puede confirmarse mediante retraso en gel, y la interacción genética, mediante el estudio del fenotipo de dobles mutantes. Estos ensayos adicionales, que se realizarán más adelante,

son especialmente pertinentes en nuestro caso, dado que ASML2, que se une a *DEAL1<sub>pro</sub>#1*, también debería haberse unido a *DEAL1<sub>pro</sub>#3*, que incluye íntegramente a *DEAL1<sub>pro</sub>#1*.

En estudios anteriormente realizados en el laboratorio de J.L. Micol se concluyó que *DEAL1* está implicado en la regulación de la proliferación celular mediada por los VLCFA y las citoquininas. Hemos obtenido resultados que apoyan esta hipótesis, ya que la penetrancia del fenotipo del mutante *deal1-1* se incrementa en presencia de 6-BAP, una citoquinina sintética. También estamos obteniendo combinaciones mutantes dobles y cuádruples de *deal1-1* y alelos de los genes cuyos productos proteicos interaccionaron físicamente con la proteína DEAL1 en un escrutinio basado en el método del doble híbrido, realizado antes del comienzo de este Trabajo de Fin de Máster. Algunos de estos genes codifican componentes del complejo elongador de los VLCFA, y otros, enzimas de la biosíntesis de citoquininas. Estos mutantes múltiples se estudiarán más adelante.

Creemos que nuestra búsqueda de interactores del promotor de *DEAL1* contribuirá a la comprensión de la regulación de este gen y de su papel en el establecimiento y/o el mantenimiento de la simetría bilateral durante el desarrollo foliar. También contribuirá a la comprensión de la función del factor de transcripción ASML2, del que se sabe muy poco. Esperamos que nuestros análisis del mutante *deal1-1* al respecto de su respuesta a la 6-BAP y sus interacciones genéticas permitirán conocer mejor el papel de *DEAL1* en el control del desarrollo que ejercen las citoquininas.