

# Expresión conferida por tres versiones de la región reguladora 5' del gen *AtSpen2* en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (L)

Solís-Guzmán María Gloria<sup>1✉</sup>, Suárez-Rodríguez Luis María<sup>2</sup>, Martínez-Trujillo Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. CP 58000.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. CP 58000.

## Resumen

El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína de tipo Spen (Split ends), de función desconocida. Las proteínas de tipo Spen tienen al menos un dominio RRM, (RNA recognition motif) N-terminal, que permite la unión a ARN y otro dominio llamado SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal), que permite establecer una interacción con otras proteínas, por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética. El gen At4g12640 es nombrado *AtSpen2* en éste trabajo. La región reguladora 5' del gen *AtSpen2* fue analizada con herramientas bioinformáticas. Además, se generaron tres construcciones genéticas con 500, 1000 y 1500 bases de la región reguladora 5' fusionadas por separado al gen reportero *uidA::GFP*, usando la tecnología Gateway®. Se transformaron plantas de *A. thaliana*, obteniendo una eficiencia de entre el 1 y 1.2%. En las plantas transformadas de la generación T3, se observó una expresión similar en las tres versiones de la región promotora 5' del gen *AtSpen2* asociada al tejido vascular. Los resultados sugieren que no existen elementos *cis* a 1000 y 1500 pb río arriba del sitio de transcripción de *AtSpen2* que intervengan de manera importante en la regulación de la expresión del gen ya que la versión de 500 pb permite la regulación del gen *AtSpen2* asociada al tejido vascular y en células que dan lugar a este tejido.

**Palabras Clave:** gen *AtSpen2*, *Arabidopsis thaliana*, tejido vascular, elementos *cis*.

## Expression conferred by three versions of the 5' regulatory region of the *AtSpen2* gene in transformed plants of *Arabidopsis thaliana* (L)

### Abstract

The At4g12640 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes for a Spen-like protein (Split ends), of unknown function. Spen-type proteins have at least one N-terminal RRM domain (RNA recognition motif), which allows binding to RNA and another domain called SPOC (Spen paralog and C-terminal ortholog), which allows an interaction with other proteins, so that in general, these proteins participate in different genetic regulation processes. The At4g12640 gene, herein is named *AtSpen2*. The 5' region of the *AtSpen2* gene was analyzed using bioinformatic tools. In addition, three genetic constructs were generated with 1500, 1000 and 500 bases of *AtSpen2* regulatory region, fused separately into the *uidA::GFP* reporter, using Gateway® technology. *A. thaliana* plants were transformed, obtaining a transformation efficiency between 1 and 1.2%. In the T3 generation transformed plants, a similar expression associated with vascular tissue was observed in all three versions of the 5' promoter region. The results suggest that there are no *cis* elements at 1000 and 1500 bp upstream of the transcription site of *AtSpen2* that could play an important role in the regulation of the expression gene, since the 500 bp version allows the regulation of *AtSpen2* gene associated with vascular tissue and cells that shape this tissue.

**Key words:** *AtSpen2* gene, *Arabidopsis thaliana*, vascular tissue, *cis* elements.

## Introducción

Las regiones reguladoras o promotoras de los genes que codifican proteínas se encuentran corriente arriba de la región codificante, y contienen múltiples secuencias conservadas, conocidas como elementos reguladores en *cis*, que pueden ser generales y compartidos por numerosos promotores o bien ser específicos de unos pocos genes; estos elementos permiten la unión de factores de transcripción y finalmente el ensamblaje de la ARN polimerasa II y el inicio de la transcripción (Kumari y Ware 2013). Utilizando diferentes bases de datos, es posible determinar la presencia de elementos *cis* potenciales en los promotores de los genes en estudio y predecir de manera general si la transcripción es regulada por factores internos o externos específicos (Hernández-García y Finer 2014). Los promotores se definen de manera general como secuencias en el ADN que tienen la capacidad de conferir la transcripción en un sistema *in vivo* o *in vitro*. La organización de los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II consisten de un promotor núcleo.

Antes del promotor núcleo, a pocas decenas de bases, se encuentran secuencias que varían de acuerdo al promotor, y a las cuales se unen proteínas activadoras para incrementar la eficiencia de transcripción (White 2001). Además de los factores generales de transcripción, la eficiencia de iniciación de transcripción es grandemente influenciada por factores de transcripción específicos para ciertos promotores, los cuales se unen a elementos de secuencia cortos o elementos en *cis*, que activan o reprimen los genes en una manera que es específica del tejido, del estadio de desarrollo o las condiciones ambientales (Mitsuda y Takagi 2009).

En *Arabidopsis thaliana* se ha caracterizado la función de una proteína de tipo Spen, FPA, la cual participa en la regulación de la vía autónoma de floración (Schomburg *et al.* 2001). FPA junto con otra proteína, FCA, actúan de manera complementaria en la regulación del gen represor de la floración, FLC, mediante la formación de un RNA antisentido del locus *FLC*, induciendo de esta manera el silenciamiento de este gen (Horniyk *et al.* 2010).

Con la secuenciación del genoma de *A. thaliana* (The Arabidopsis Initiative 2000) ha sido posible identificar numerosos genes putativos cuya función sigue siendo un enigma en ausencia de datos experimentales y análisis

✉ Gloria Solís Guzmán, [gloriasolisg@gmail.com](mailto:gloriasolisg@gmail.com)

Facultad de Biología, Edificio "R", Ciudad Universitaria, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica S/N, Colonia Felicitas del Río, C.P. 58030, Morelia, Michoacán. Tel. 443 199 4363.

bioinformáticos sistemáticos. En el presente trabajo se aporta información para conocer la función del gen At4g12640, denominado *AtSpen2* que codifica una proteína putativa de tipo Spen en *A. thaliana*.

El gen At4g12640 (*AtSpen2*) de *Arabidopsis thaliana* de función desconocida codifica para la proteína NP193001.2 perteneciente a la familia Spen (Split ends) caracterizada por un dominio RRM (RNA recognition motif) N-terminal, éste dominio RRM es conocido como RBD (ARN binding domain) o RNP (Ribonucleoprotein domain), y un dominio conservado C-terminal llamado SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal) que permite establecer una interacción con otras proteínas, por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética. Para entender la función de un gen es necesario conocer primeramente los órganos y tejidos de expresión, por lo que en este trabajo se realizó la caracterización de la expresión conferida por tres versiones de la región promotor 5' del gen *AtSpen2* en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (L).

## Materiales y métodos

### Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron en la página de IDT (Integrated DNA Technologies) <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>, además se agregó en el extremo 5' la secuencia para corte con la enzima *HindIII* (Invitrogen).

### Extracción de ADN de *A. thaliana* y amplificación de las tres versiones del promotor del gen *AtSpen2*

El ADN de planta se aisló usando el kit DNeasy Plant Mini (cat. 69104) siguiendo el protocolo del fabricante. Este ADN se utilizó como templado para realizar PCRs con los oligonucleótidos diseñados empleando el kit para PCR de la empresa Fermentas, utilizando la fórmula de reacción del fabricante. Los oligos diseñados son: SpocF1500: 5'-AAGCTTCAAACCTCCTCGCTTACTCTTCA-3', SpocF1000: 5'-AAGCTTACCTCACAGAATTGACAGATCCA-3', SpocF500 5'-AAGCTTACATGACGAGCAGATCTACGGAGA-3', y SpocR: 5'-AAGCTTTCTGCATTCTCAGATCTATCGCA-3'. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95 °C por 5 min, 30 ciclos con 95 °C un min, 55 °C un min, 68 °C dos min, un ciclo de 68 °C por 10 min, finalización a 4 °C.

### Clonación de las diferentes versiones del promotor del gen *AtSpen2* en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO

Los fragmentos de ADN del promotor del gen *AtSpen2* amplificados por PCR se clonaron en el vector de entrada Gateway pCR8®/GW/TOPO®, usando la mezcla de reacción sugerida por el fabricante (Invitrogen).

### Recombinación dirigida en el vector destino pKGWFS7

Los fragmentos de ADN con los tres tamaños del promotor de *AtSpen2* clonados en el vector de entrada PCR8®/GW/TOPO®, se amplificaron por PCR con los oligos M13, llevando dentro de los ADN amplificados los sitios de attL1 y attL2,

que se recombinan con los sitios attR1 y attR2 del vector destino binario pKGWFS7. La recombinación se hizo con el Kit de Invitrogen LR clonase II enzyme Mix del sistema Gateway.

### Método de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 y *Arabidopsis thaliana*

La cepa de *A. tumefaciens* pGV2260 (McBride y Summerfelt 1990) fue transformada de acuerdo a Sambrook y Russel (2001) con el vector binario con las regiones de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpen2*. La selección de colonias transformadas se hizo en medio LB con carbenicilina (100 µl/ml), rifampicina (50 µl/ml), espectinomicina (100 µl/ml) y estreptomycin (300 µl/ml). La transformación de *A. thaliana* Col-0 se realizó por el método de floral dip modificado (Martínez-Trujillo *et al.* 2004).

### Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Las plantas transgénicas con el gen reportero *uidA* (Jefferson *et al.* 1987) se tiñeron con 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-glucurónido en buffer de fosfatos (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1M, pH 7), con 2 mM de ferrocianuro de potasio y ferricianuro de potasio, por 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron de acuerdo a Malamy y Benfey (1997).

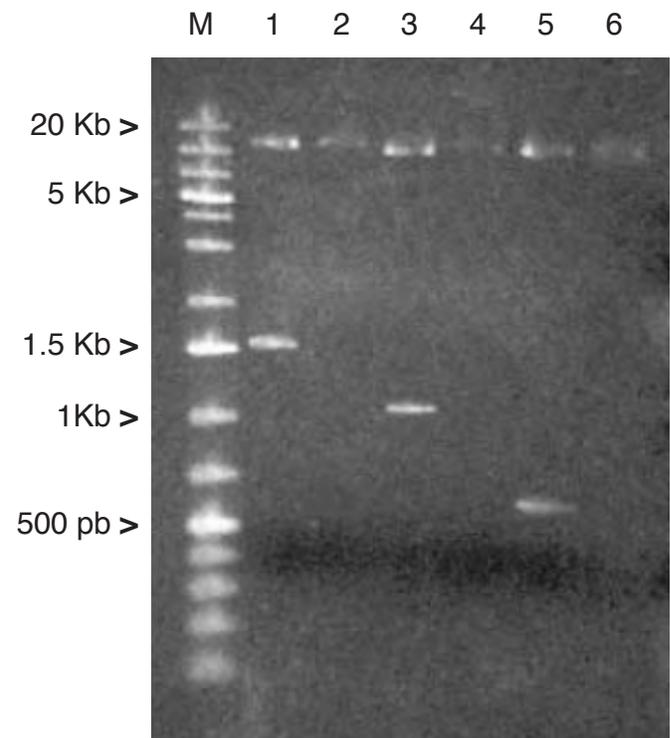


Figura 1. Versiones del promotor de *AtSpen2* de 500, 1000 y 1500 pb clonadas en el vector de expresión pKGWFS7. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los plásmidos sin digerir y los carriles 1, 3 y 5 presentan la digestión de los vectores con *HindIII*, que liberan fragmentos de ADN con las diferentes versiones del promotor.

### Análisis de elementos *cis* a 500, 1000 y 1500 pb de la región 5' de la región promotora del gen *AtSpn2*

Los elementos *cis* en el ADN de los promotores se analizaron utilizando la base de datos Plant Care, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html> y AGRIS <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu>

### Resultados y discusión

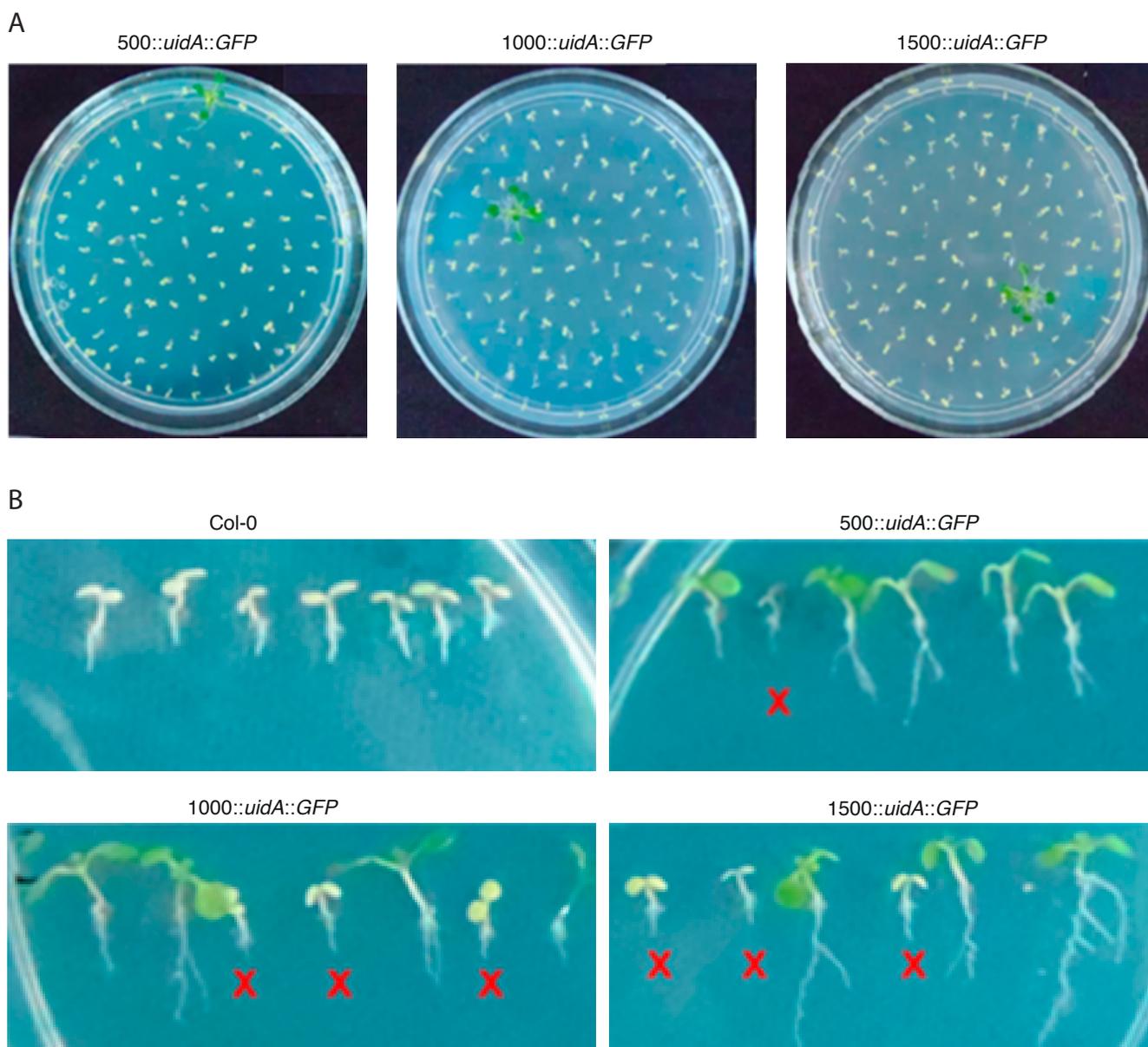
En este trabajo se generaron construcciones genéticas de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2* fusionadas al gen reportero *uidA::GFP* y se transformaron plantas de *A. thaliana* para analizar la expresión conferida por estas regiones. Se analizaron los elementos *cis* de las tres versiones de la región promotora del gen *AtSpn2*.

### Amplificación de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2*

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar las regiones de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2* fueron diseñados adicionando un sitio de reconocimiento para la enzima *HindIII* (AAGCTT), lo cual permitió seleccionar los candidatos positivos. Las amplificaciones obtenidas se presentan en la **Figura 1**.

### Transformación genética de *A. thaliana*

Los plásmidos recombinados conteniendo las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*, se utilizaron para transformar *A. tumefaciens*. Posteriormente, se realizó la inoculación de plantas de *A. thaliana* Col-0 con la suspensión



**Figura 2. Plantas de *A. thaliana* transformadas.** A) Las semillas generadas por plantas de la generación To de la línea 500::uidA::GFP, 10000::uidA::GFP y 1500::uidA::GFP fueron sembradas en medios MS con kanamicina 65 µg/ml. B) Selección de las plantas transformadas de la generación T1, por resistencia a la kanamicina 65 µg/ml, Col-0 (no transformada), 500::uidA::GFP, 10000::uidA::GFP y 1500::uidA::GFP.

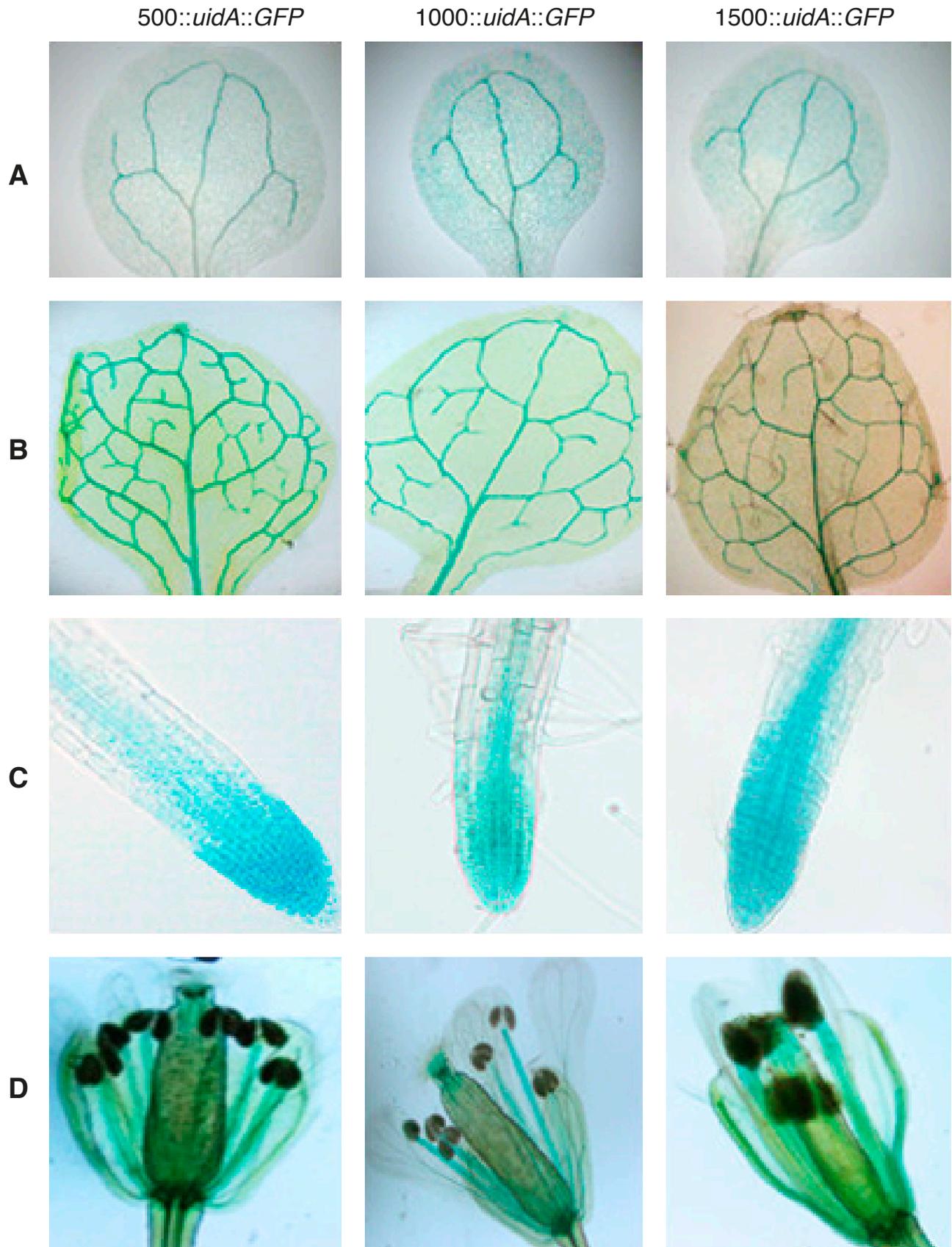
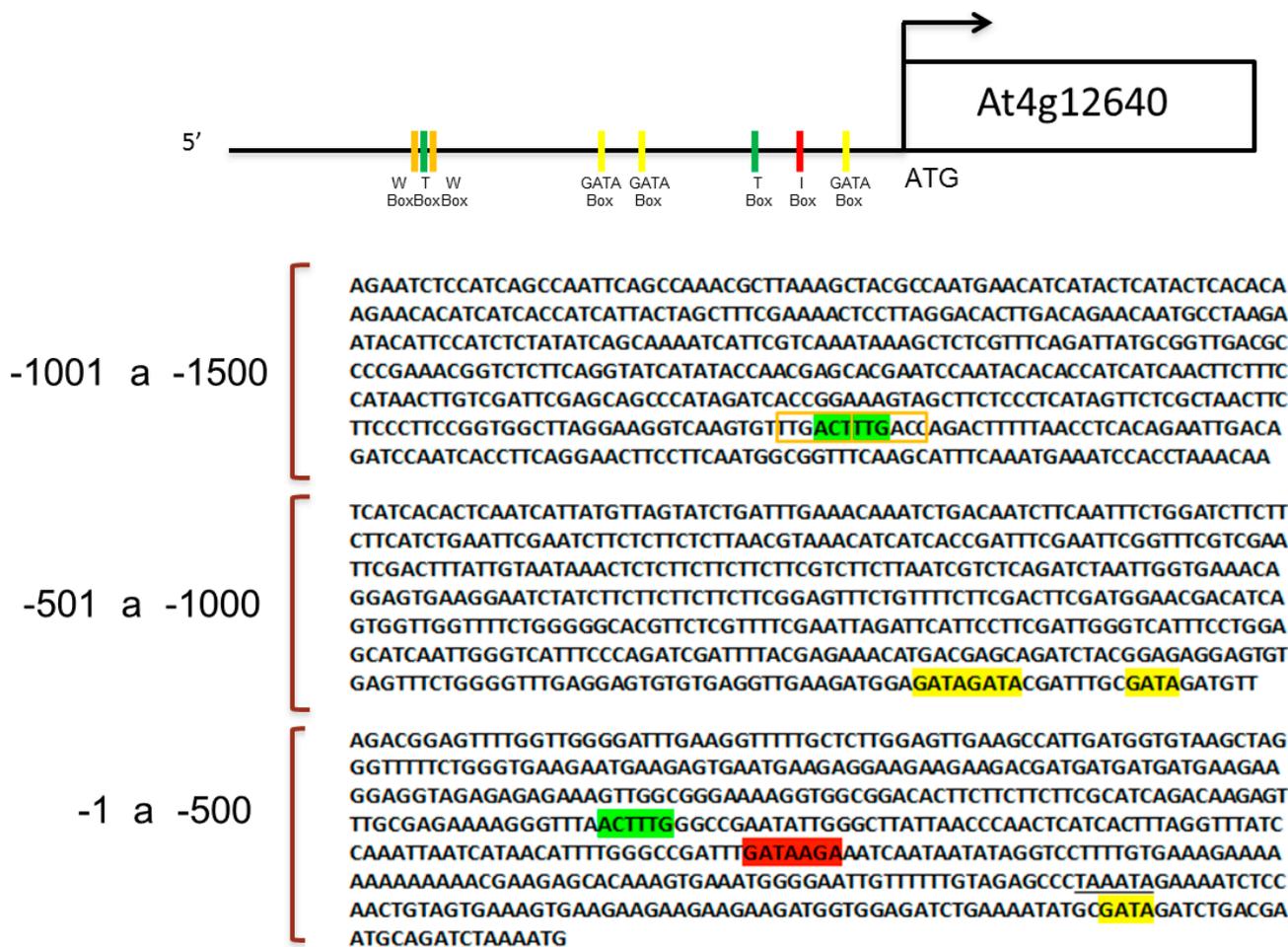


Figura 3. Expresión en hojas, raíz y flor de la versión 500 pb, 1000 pb y 1500 pb de la región promotora del gen *AtSpen2* fusionada al gen reportero *uidA* en plantas transformadas. A) Expresión en hoja cotiledonar, B) Expresión en hoja verdadera, C) Expresión en raíz, D) Expresión en flor.



**Figura 4. Los elementos cis-reguladores potenciales identificados.** En la región -500 son: T-Box, GATA-Box y I-Box, en la región -1000 se encuentran repetidos de la GATA-Box, en la región -1500 se encuentra repetido de T-Box y dos secuencias de W-Box.

de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones genéticas. Las semillas obtenidas se germinaron en medios MS con kanamicina 65 µg/ml, obteniéndose en todos los casos plantas potencialmente transformadas, con coloración verdosa y mayor crecimiento. La frecuencia de transformación obtenida fue entre 1 y 1.2% (**Figura 2A**). Las plantas seleccionadas a 65 µg/ml, fueron transferidas a un sustrato preparado con tierra y agrolita crecidas hasta la producción de semilla. La semilla recuperada fue utilizada para ser germinada y crecida nuevamente en medio MS con kanamicina a 65 µg/ml, para obtener la generación T1. Los resultados obtenidos demuestran que en las semillas producidas ocurrió una segregación del transgén de kanamicina en una relación de 3:1 (**Figura 2B**).

#### Expresión conferida por las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*

Para detectar la expresión conferida por las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*, se realizaron tinciones con x-gluc de plantas de la generación T1. En todas las líneas T1 resistentes a kanamicina 65 µg/ml, se encontró expresión del gen reportero *uidA*. En las líneas 500, 1000 y

1500, se encontró expresión en plantas de 10 días después de la germinación, en el tejido vascular en las siguientes estructuras: hoja cotiledonar, hoja verdadera y raíz. No se apreciaron diferencias en la intensidad de la coloración entre las diferentes líneas transgénicas conteniendo los diferentes tamaños de las regiones reguladoras 5'. En la **Figura 3** se presentan imágenes representativas de las tres líneas transgénica con la región reguladora 5'. La expresión en la flor se presentó en los filamentos de los estambres, en las diferentes líneas transformadas, pero no se encontró expresión en las anteras. En el gineceo sólo se encontró expresión en etapas del desarrollo de los estadios 12 y 13, sin embargo, ésta fue muy variable en intensidad, incluso en diferentes flores del mismo individuo. No obstante que la expresión de *AtSpn2* se observó en el tejido vascular, la función que podría tener en este tejido no es muy clara, a diferencia de otros genes como *AHA3* de *A. thaliana* que se expresa en el floema, y codifica una H<sup>+</sup>-ATPase que proporciona energía para SUC2, un simporter Sucrese-H<sup>+</sup>, contribuyendo en el transporte de sacarosa en este tejido (Truernit y Sauer 1995).

### Elementos *cis* presentes en las tres versiones de la región promotora

La región promotora del gen *AtSpen2* carece de una caja TATA canónica, que está presente en una tercera parte de los genes de *A. thaliana*, y que tiene la secuencia consenso TATAa/tAa/t, localizada ~30 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción; también carece del elemento iniciador (Inr), YYANa/tYY. Los elementos *cis*-reguladores potenciales identificados son: T-Box, GATA-Box y I-Box, relacionados con respuesta a luz y W-Box en respuesta a azúcar, (Figura 4). Se ha reportado que las regiones reguladoras de los genes tienen una función importante al determinar el lugar (tejido u órgano), tiempo e intensidad de la transcripción, lo que aunado a las características de la proteínas para las cuales codifican los genes, definen en gran parte la función molecular, celular y fisiológica de éstas (Hernández-García y Finer 2014). La ausencia de una caja TATA y de un elemento iniciador en *AtSpen2*, confirma que estos elementos no son los únicos que determinan la iniciación de transcripción, sino que hay otros elementos *cis* que no están sobre-representados en los promotores de todos los genes, o que no se detectan con los métodos tradicionales, que generalmente buscan secuencias consenso (Narlikar 2014).

De manera global, los resultados obtenidos permitieron demostrar una transformación eficiente de *A. thaliana* de las regiones reguladoras 5' de 500, 1000 y 1500 pb del gen *AtSpen2*. Las tres construcciones genéticas, permitieron establecer que la expresión conferida por el promotor del gen *AtSpen2* está ubicada en el tejido vascular y en zonas donde se forman células que posteriormente darán origen a este tejido. Los elementos *cis* ubicados en los primeros 500 pb son suficientes para proporcionar expresión al gen.

### Referencias

- Hernández-García CM, Finer JJ** (2014) Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217: 109–119.
- Horniyk C, Terzi LI, Simpson GG** (2010) The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Developmental Cell* 18:203–213
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907
- Kumari S, Ware D** (2013) Genome-wide computational prediction and analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. *PLoS One* 8:e79011. doi: [10.1371/journal.pone.0079011](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079011)
- Malamy JE, Benfey, PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Martínez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant. Molecular Biology Reporter* 22: 63–70.
- McBride KE, Summerfelt KR** (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 14: 269–276.
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 50: 1232–1241.
- Narlikar L** (2014) Multiple novel promoter-architectures revealed by decoding the hidden heterogeneity within the genome. *Nucleic Acids Research* 42: 12388–12403.
- Sambrook J, Russell D** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, Amasino RM** (2001) FPA, a Gene Involved in Floral Induction in *Arabidopsis*, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. *The Plant Cell* 13: 1427–1436.
- Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564–570.
- White RJ** (2001) Gene transcription. *Blackwell Science, Glasgow UK*. 273 pp.