

# CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS DELLA Y LA SUBUNIDAD MED31 DEL COMPLEJO MEDIATOR EN ARABIDOPSIS



Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas  
IBMCP (UPV-CSIC)  
Trabajo de Fin de Máster  
Curso 2016-18

**AUTOR**  
Lluís Carles Martínez Centelles  
Valencia, enero de 2018

**TUTORA ACADÉMICA**  
M<sup>a</sup> Pilar López Gresa

**TUTOR EXPERIMENTAL**  
David Alabadí Diego

## RESUMEN

En el laboratorio se está investigando los mecanismos moleculares por los que las proteínas DELLA regulan la expresión génica en plantas. Las DELLA son los reguladores negativos de la vía de señalización por giberelinas y sus niveles son regulados negativamente por esta hormona. Los resultados obtenidos en el laboratorio, junto a los de otros, han mostrado que una parte importante de esta regulación ocurre mediante la interacción física de las proteínas DELLA con factores de transcripción, en unos casos los inactiva, mientras que en otros la interacción promueve su actividad. Los últimos resultados del laboratorio apuntan a que las DELLA pueden actuar mediante otros mecanismos para regular la expresión génica, en particular, se ha encontrado interacción física con varias proteínas que regulan directamente la actividad de la RNA Pol II.

Una de estas proteínas es MED31. MED31 forma parte del complejo Mediator, que es un complejo multiproteico conservado de levaduras a humanos y que asiste a la RNA Pol II en prácticamente todas las etapas de la transcripción de un gen, por lo que es considerado como un activador transcripcional. Por tanto, estos resultados preliminares apuntan a que las DELLA podrían regular la transcripción de ciertos genes modulando la actividad del complejo Mediator y por tanto de la RNA Pol II a través de la interacción con la subunidad MED31. Trabajo previo en el laboratorio ha mostrado que una mutación hipomorfa *med31* tiene consecuencias muy importantes en el desarrollo de la planta, apuntando a que tiene una función relevante. En el contexto de este TFM vamos a tratar de (i) obtener nuevos alelos *med31* de *Arabidopsis* por amiRNA; (ii) caracterizar la interacción entre las proteínas DELLA y MED31 en plantas de *Nicotiana benthamiana* y de *Arabidopsis*, y (iii) evaluar la relevancia de la interacción mediante análisis transcriptómicos y fisiológicos.

**Palabras clave:** DELLA, Mediator, RNA Pol II, *Arabidopsis thaliana*, transcripción, giberelinas

## ABSTRACT

In our laboratory we are investigating about the molecular mechanisms by which DELLA proteins regulate gene expression in plants. DELLA are the negative regulators of the signaling pathway for gibberellins and their levels are negatively regulated by this hormone. The results obtained in the laboratory, together with those of others, have shown that an important part of this regulation occurs through the physical interaction of DELLA proteins with transcription factors, in some cases inactivating them, while in others the interaction promotes their activity. The latest results of the laboratory suggest that DELLA can act through other mechanisms to regulate gene expression, in particular, physical interactions have been found with several proteins that directly regulate RNA Pol II activity.

One of these proteins is MED31. MED31 is part of the Mediator complex, a multiprotein complex conserved from yeast to humans which assists RNA Pol II practically all the stages of gene transcription, so it's considered as a transcriptional activator. All in all, these preliminary results suggest that DELLA could regulate the transcription of certain genes modulating the activity of the Mediator complex and therefore of the RNA Pol II through the interaction with subunit MED31. Previous work in the laboratory has shown that a hypomorphic mutation *med31* has very important consequences in plant development, pointing out to a relevant function. In this TFM context, we will try to (i) obtain new *med31* alleles of *Arabidopsis* by amiRNA; (ii) characterize the interaction between DELLA and MED31 proteins in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* plants and (iii) evaluate the relevance of the interaction through transcriptomic and physiological analysis.

**Keywords:** DELLA, Mediator, RNA Pol II, *Arabidopsis thaliana*, transcription, gibberellins

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este TFM no habría podido ser posible de no ser por mis queridísimos familiares, que me han dado toda la fuerza y las ganas de tirar para adelante. Sin su aliento me habría resultado imposible haber llegado a este punto y por eso se merecen este reconocimiento.

También resaltar la ayuda de mis compañeros de laboratorio y del máster. Sois gente con la que es imposible llevarse mal, a pesar de que hemos tenido nuestros roces y discrepancias, y os mostráis prestos a echar una mano siempre que os la piden. La gente como vosotros es la que no se olvida.

Por último, a David, mi tutor, con el que he compartido momentos de frustración y de emoción a partes iguales. Muchas gracias por haberme acogido estos años y enseñarme tanto.

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

1. Las giberelinas. ....	1
1.1 Las giberelinas y el medio ambiente. ....	1
1.2 Señalización por giberelinas ....	1
1.3 Las proteínas DELLA ....	2
2. El complejo Mediator ....	3
2.1 Estructura del Mediator ....	3
2.2 Funciones del Mediator.....	4
3. Antecedentes.....	5

## II. OBJETIVO ..... 7

## III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 8

1. Materiales biológicos y condiciones de crecimiento .....	8
1.1 Material vegetal. ....	8
1.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	8
1.1.1.1 Esterilización y siembra .....	8
1.1.1.2 Tratamientos con GAs y paclobutrazol. ....	8
1.1.1.3 Transformación.....	8
1.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	9
1.1.2.1 Agroinfiltración.....	9
1.1.3 Recogida de muestras .....	9
1.2 Microorganismos .....	9
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.2.1.1 Transformación.....	10
1.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	10
1.2.2.2 Transformación.....	10
1.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
1.2.3.1 Transformación.....	11
1.2.3.2 Mating .....	11
1.2.3.3 Doble híbrido .....	11
2. Técnicas de Biología molecular .....	12
2.1 Construcciones de DNA.....	12

2.1.1 Reacción LR.....	12
2.1.2 Extracción de DNA plasmídico .....	12
2.2 Análisis de la expresión de proteínas.....	12
2.2.1 Extracción de proteínas totales .....	12
2.2.2 Co-inmunoprecipitación .....	13
2.2.3 Western blot.....	13
2.3 MicroRNA artificial (amiRNA) .....	14
2.3.1 Generación del amiRNA.....	14
2.4 Análisis de la expresión génica.....	15
2.4.1 Extracción de RNA total .....	15
2.4.2 Síntesis de cDNA .....	15
2.4.3 PCR cuantitativa “real-time” .....	16
3. Técnicas de microscopía.....	17
3.1 Lupa .....	17
3.2 Microscopio confocal .....	17
IV.RESULTADOS.....	18
1. Interacción entre MED31 y otras subunidades del Mediator .....	18
2. Localización nuclear de MED31.....	20
3. Interacción entre MED31 y DELLAs por doble híbrido.....	20
4. Interacción entre MED31 y DELLAs por coimmunoprecipitación .....	22
5. Análisis de mutantes <i>med31</i> .....	23
5.1 Efecto del tratamiento con GA y PAC .....	24
5.2 Análisis de los mutantes generados por amiRNA .....	26
V. CONCLUSIONES. ....	28
VI. REFERENCIAS. ....	29

## ABREVIATURAS

AD	Dominio de activación
amiRNA	MicroRNA artificial
Amp	Ampicilina
BD	Dominio de activación
Car	Carbenicilina
CDK8	Kinasa dependiente de ciclina-8
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
C <sub>T</sub>	<i>Cycle threshold</i> , ciclo umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
dT	Desoxitimidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	<i>Forward</i> , Directo
GA	Giberelina
GAI	GIBBERELIC ACID INSENSITIVE
GID1	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
GID2	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2
Gnt	Gentamicina
Kan	Kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Medio Murashige-Skoog
p/v	Peso/volumen
PAC	Pacbutrazol
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	<i>Pre-initiation complex</i> , Complejo de preiniciación
R	Reverso
RGA	REPRESSOR OF ga1-3
RGL1	REPRESSOR OF ga1-3-LIKE1
RGL2	REPRESSOR OF ga1-3-LIKE2
RGL3	REPRESSOR OF ga1-3-LIKE3
Rif	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i> , PCR cuantitativa a tiempo real
SD	<i>Standard Defined</i> , Medio mínimo sintético
SDS	Dodecilsulfato sódico
SLY1	SLEEPY1
Spm	Espectinomomicina
T	Temperatura
T-DNA	ADN de transferencia
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Suero tamponado con Tris

TE	Tampón Tris-EDTA
TF	Factor de transcripción
WT	<i>Wild type</i> , Tipo silvestre
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> , Proteína amarilla fluorescente
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> , Medio levadura peptona dextrosa







## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. Las giberelinas**

Las plantas, a diferencia de los animales, son seres sésiles, es decir, que no tienen capacidad de desplazarse. Esta característica hace que las plantas deban interpretar e integrar de alguna manera las señales ambientales para conseguir la supervivencia. Un papel relevante en la integración de estas señales medioambientales con los procesos de crecimiento, desarrollo y defensa frente a estrés lo juegan las fitohormonas, unos compuestos químicos sintetizados por las plantas que actúan como señalizadores y activan una cascada de eventos que derivan en la modificación de la expresión génica para activar diferentes respuestas fisiológicas en función de las condiciones en las que se encuentren.

Una de las fitohormonas más conocidas y estudiadas son las giberelinas (GA). Las GAs promueven cambios en la expresión génica que principalmente activan el crecimiento de la planta y sus órganos induciendo la división y la elongación celular, y actúan a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta, desde la germinación al desarrollo de órganos reproductivos y frutos. Aquellas plantas que presenten bajos niveles de GAs o sean insensibles a estas hormonas mostrarán defectos en todos estos procesos, siendo el más característico un fenotipo enano.

#### **1.1 Las giberelinas y el medio ambiente**

Los niveles de GAs en la planta se ven modificados en función del ambiente. En condiciones de oscuridad (por ejemplo, cuando la semilla acaba de germinar enterrada en el suelo), los niveles de GAs se ven incrementados e inducen un programa de desarrollo que se denomina escotomorfogénesis, y que resulta en una elongación rápida del hipocotilo, la presencia de un gancho apical y cotiledones pequeños y plegados, además la expresión de los genes asociados a procesos fotosintéticos, por ejemplo, está apagada; pero en el momento en que las plantas son expuestas a la luz (cuando la plántula emerge a la superficie), la biosíntesis de GAs disminuye y se promueve su degradación, por lo que se cambia el programa de desarrollo a la fotomorfogénesis. Así pues, se puede decir que los niveles de GAs son inversamente proporcionales a la cantidad de luz que recibe la plantas (Achard *et al.*, 2007). Cabe mencionar que una situación opuesta la encontramos cuando las variaciones son en la temperatura ambiente (Stavang *et al.*, 2009). Los niveles de GAs son más elevados a altas temperaturas, lo que resulta en la elongación de la planta. Por último, los niveles de GAs se ven reducidos por diferentes tipos de estrés abiótico, como sequía, frío o salinidad, pero otros tipos de condiciones adversas como la sombra o la sumersión hacen que los niveles de GAs aumenten para que así la planta elongue y vuelva a condiciones normales de luz u oxigenación, respectivamente. En definitiva, las GAs ocupan una posición central a la hora de organizar la vida de la planta en función de las condiciones del entorno.

#### **1.2 Señalización por giberelinas**

La ruta de señalización por GAs se activa cuando éstas son detectadas en la célula por su receptor, la proteína soluble GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1). Las GAs se introducen en un bolsillo de GID1 y al unirse hacen que su dominio N-terminal sufra un cambio conformacional, haciendo que actúe como una tapa cerrando el bolsillo y permitiendo la interacción de GID1 con las proteínas DELLA, que son los principales represores de la respuesta

a GAs (apartado 1.3). La interacción de las DELLA con GID1 produce un cambio conformacional en las DELLA que facilita la interacción con SLEEPY1 (SLY1 en *Arabidopsis*; GID2 en arroz), una proteína F-box que forma parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa SCF<sup>SLY1</sup>. Cuando SLY1 reconoce las DELLA se produce la poliubiquitinación de éstas y como consecuencia, son enviadas al proteasoma 26S, donde se produce su degradación.

De este modo, unos elevados niveles de GAs tienen como consecuencia la eliminación del efecto represor de las DELLA sobre la respuesta a GAs, mientras que cuando los niveles de GAs son bajos, las DELLA ejercen su papel de represor de la respuesta a GAs (Figura 1.1).

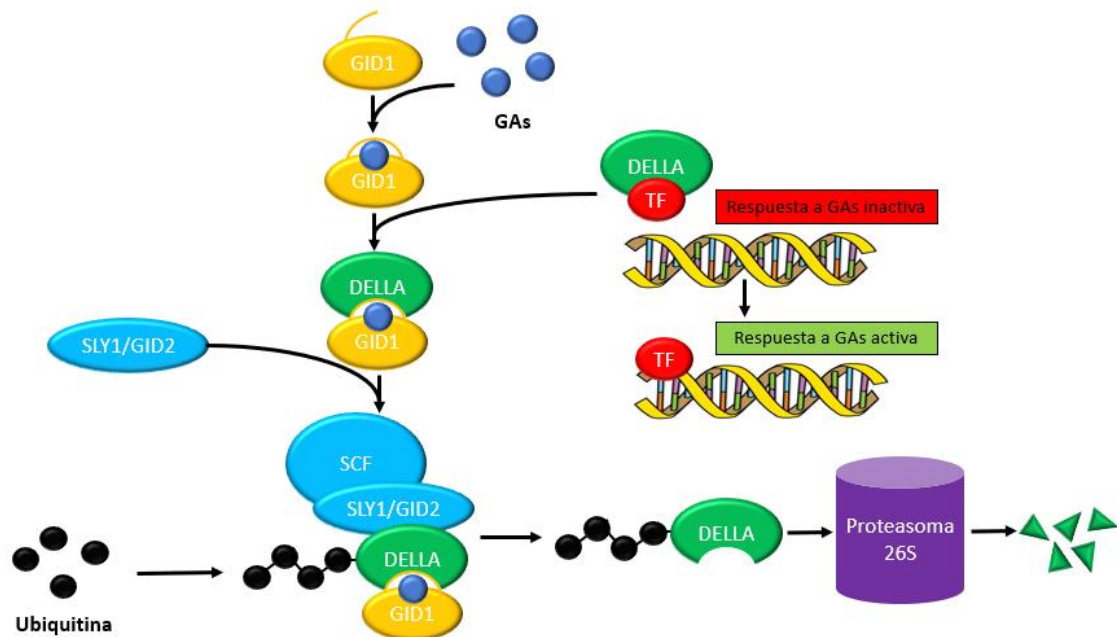


Figura 1.1: Representación esquemática del mecanismo de acción de las GAs.

### 1.3 Proteínas DELLA

Las DELLA son reguladores transcripcionales de la familia GRAS (de GAI, RGA y SCR) (Pysh *et al.*, 1999). Esta familia está formada por unos setenta reguladores transcripcionales que se caracterizan por un dominio que ocupa los dos tercios C-terminal de la proteína y que se denomina GRAS, mediante el cual interactúan físicamente con otros reguladores transcripcionales y factores de transcripción. A su vez, las proteínas DELLA forman una subfamilia caracterizada por la presencia de un motivo de secuencia, DELLA (de Asp, Glu, Leu, Leu y Ala), de donde toman el nombre y que está presente en el extremo N-terminal junto a otra secuencia característica, VHNYP (Val, His, Asn, Tyr y Pro), siendo ambas esenciales para la activación de la señalización por GAs, ya que son las zonas de interacción con GID1.

Como se ha mencionado antes, las DELLA son los principales represores de la respuesta a GAs. Carecen de dominio de unión a DNA, por lo que muy probablemente no sean capaces de unirlos directamente, y así, la visión actual que se tiene de su modo de acción es que se produce mediante la interacción con TFs, bien secuestrándolos para impedir su unión a DNA bien

actuando como coactivador mediante la unión al factor de transcripción mientras este está unido al promotor diana.

El número de DELLAs que presentan distintas especies puede no ser el mismo: mientras que algunas especies solamente poseen una, como es SLENDER1 (SLR1) en arroz o PROCERA en tomate; en *Arabidopsis thaliana* se encuentran hasta cinco: GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF ga1-3 (RGA), REPRESSOR OF ga1-3-LIKE1 (RGL1), RGL2 y RGL3. Los análisis genéticos han demostrado que las DELLA en estas especies son los reguladores negativos maestros de la señalización por GAs, al mostrar que una planta que carece de proteínas DELLA presenta un fenotipo de respuesta constitutiva a la hormona. Las cinco proteínas DELLA de *Arabidopsis* tienen la misma función bioquímica, y su especificidad de función viene determinada por los patrones de expresión de los diferentes genes (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2010).

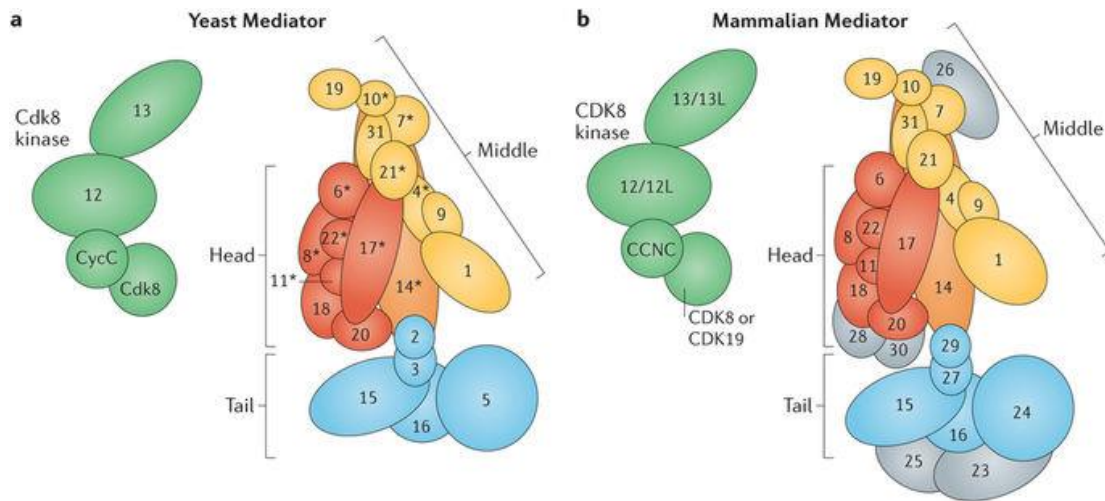
Gracias a muchos trabajos recientes sobre las proteínas DELLA, tenemos una visión bastante clara del papel que ejercen a la hora de conectar las señales ambientales con los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes y por tanto promueven las respuestas fisiológicas.

No obstante, aunque el principal mecanismo de acción de las DELLA se basa en la interacción con múltiples factores de transcripción, en los últimos años se ha descubierto que también existen interacciones con complejos remodeladores de la cromatina (Archacki *et al.*, 2013; resultados no publicados de nuestro laboratorio) y con el complejo Prefoldina, que ha permitido definir un papel no genómico para las DELLA (Locascio *et al.*, 2013). Estos trabajos abren la puerta a nuevos mecanismos de conexión entre señales ambientales y regulación de la expresión génica mediada por DELLAs.

## **2. El complejo Mediator**

### **2.1 Estructura del Mediator**

El Mediator es un complejo proteico altamente conservado en organismos eucariotas que forma parte imprescindible del mecanismo celular de la transcripción como regulador de la RNA polimerasa II (RNA Pol II). Está constituido por varias subunidades repartidas en 4 módulos (Figura 1.2): cabeza, centro, cola y un módulo kinasa dependiente de ciclina 8 (CDK8). Este último no forma parte intrínseca del Mediator, sino que se une de forma reversible por medio de MED13 (Knuesel *et al.*, 2009) cuando la actividad kinasa del módulo CDK8 es requerida para regular la actividad de los TFs o enviarlos al proteasoma para su degradación (Akoulitchev *et al.*, 2000; Alarcón *et al.*, 2009; Bancerek *et al.*, 2013).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 2: Estructura y composición de subunidades del Mediator en levaduras (a) y en mamíferos (b) (Soutourina, 2017).**

Una particularidad a tener en cuenta del Mediator es que, en células especializadas, puede cambiar su composición de subunidades, añadiéndose o perdiéndose las necesarias para adecuar su función en ciertos contextos, lo que resulta en una especialización funcional del complejo que consigue una expresión génica dirigida al tipo celular (Malik *et al.*, 2004; Taatjes y Tijan, 2004). Además de esta plasticidad a nivel conformacional, el Mediator también presenta una destacada variabilidad estructural que se corresponde con cambios en su función dependiendo del interactivo con el que se encuentre. Así, la unión de un TF hace que el Mediator sufra cambios estructurales que coinciden con la activación de la transcripción por la RNA Pol II (Taatjes *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2010). Del mismo modo, la unión del módulo CDK8 o la RNA Pol II al Mediator son mutuamente exclusivas al inducir cambios estructurales que impiden la interacción del otro (Naar *et al.*, 2002).

## 2.2 Funciones del Mediator

La función principal del complejo Mediator es actuar como un regulador del proceso de transcripción. Este papel lo lleva a cabo estableciendo interacciones entre la RNA Pol II y factores reguladores de la transcripción, como son los TFs unidos a DNA, y transmitiendo señales de una parte a otra que modulan la actividad de la RNA Pol II, aunque este mecanismo de regulación todavía está poco explorado.

El Mediator es necesario para que la RNA Pol II sea reclutada a los sitios del genoma donde hay TFs unidos a DNA. El complejo forma numerosos puntos de contacto con la RNA Pol II (Asturias *et al.*, 1999; Bernecky *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2002) y gracias a su gran tamaño facilita que el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC) se ensamble alrededor de forma estable, además de regular el reclutamiento o la actividad de algunos componentes del PIC. Cuando comienza la transcripción, la RNA Pol II se separa del Mediator mediante la fosforilación de su extremo C-terminal (Svejstrup *et al.*, 1997), lo que permite la unión del módulo CDK8 para regular la actividad de los TFs y estimular la elongación transcripcional mediante la interacción con factores del complejo de super elongación (SEC) (Ebmeier y Taatjes, 2010).

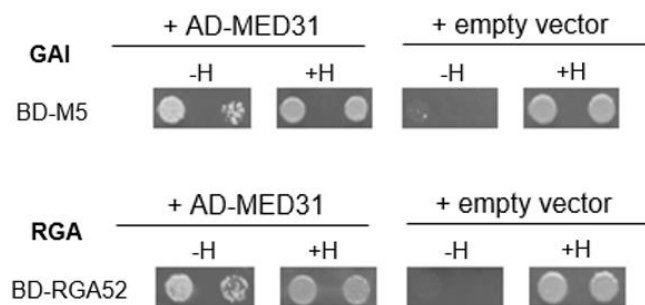
Además de estar involucrado en el proceso transcripcional, el Mediator también participa en procesos de remodelación de la cromatina, manteniendo las regiones promotoras de los genes libres de nucleosomas para facilitar el ensamblaje del PIC y promover la activación de la transcripción (Gilchrist *et al.*, 2010). Otro aspecto en el que el Mediator toma parte es la formación estable de bucles génicos que permiten acercar las regiones reguladoras distales del DNA a los promotores génicos (Plank y Dean, 2014).

La mayor parte de estas funciones del Mediator están conservadas a lo largo de los organismos eucariotas, sin embargo, en organismos superiores se han observado diferencias en la composición y en las secuencias de las subunidades, junto a una mayor diversidad funcional con respecto a organismos más simples como levaduras (Poss *et al.*, 2013). Estas variaciones posiblemente sean debidas parcialmente a la amplia diversidad de TFs presentes en estos organismos superiores.

En plantas se han realizado numerosos estudios sobre diferentes subunidades del Mediator para comprender los procesos en los que se ve involucrado. Muchos de los estudios se han dirigido a investigar el papel del Mediator en diferentes estreses tanto bióticos como abióticos. Por ejemplo, se ha comprobado el papel de las subunidades MED14, MED15 y MED16 en la expresión de genes activados por ácido salicílico (Wang *et al.*, 2016) y su relevancia en la regulación cruzada entre rutas de señalización por ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico. Por otra parte, MED25, está involucrado en la regulación de la señalización por ácido jasmónico y ácido abscísico (Chen *et al.*, 2012), además de tener una importante función en la regulación del tamaño celular (Xu y Li, 2013) que es complementaria a la de MED8 (Xu y Li, 2009).

### 2.3 Antecedentes

Previamente a la realización de este trabajo, en el laboratorio se encontró en un rastreo de interactores de DELLA un resultado positivo en la interacción entre MED31 y la versión truncada de GAI M5GAI. Esta interacción se confirmó y, además, se comprobó que MED31 también interacciona en levadura con otra DELLA, en este caso RGA (su versión truncada RGA52) (Figura 1.3).



**Figura 1.3: Interacción de MED31 con M5GAI y RGA52 en levadura. Vectores: pGADT7/pGBKT7. +/- H: con/sin histidina.**

Mi TFG consistió en el estudio de mutantes hipomorfos *med31*, en los que se observaron varios defectos en el desarrollo de las plantas a lo largo de todas sus etapas, debidos parcialmente a los bajos niveles de expresión de *MED31*.

Estos resultados, junto con el nuevo papel no genómico de las DELLA llevaron a plantear la hipótesis de que MED31 es capaz de interactuar *in planta* con las proteínas DELLA y que esta interacción tiene una relevancia fisiológica.

## II. OBJETIVO

La realización de este TFM se basa en la hipótesis de que la subunidad MED31 interacciona con las proteínas DELLA y que esta interacción tiene una importante relevancia fisiológica a lo largo del desarrollo de la planta. Para probar esta hipótesis se han fijado los siguientes objetivos:

- i) Obtener nuevos alelos *med31* de Arabidopsis por amiRNA
- ii) Caracterizar la interacción entre las proteínas DELLA y MED31 en plantas de *Nicotiana benthamiana*
- iii) Evaluar la relevancia de la interacción mediante análisis transcriptómicos y fisiológicos



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales biológicos y condiciones de crecimiento

##### 1.1 Material vegetal

###### 1.1.1 *Arabidopsis thaliana*

En este trabajo se emplearon plantas de la accesión Columbia-0 (Col-0) como silvestre (WT) y las líneas mutantes *med31-2*, *gai-1D* y *dellaP* (Park *et al.*, 2013). Todas las líneas mutantes se encontraban en fondo genético Col-0. El mutante *med31-2* proviene de la colección de líneas de inserción del Salk Institute y la describimos en mi TFG. Los fenotipos que se muestran en este trabajo se han hecho con una línea obtenida tras un retrocruzamiento con el WT y básicamente son los mismos que se observaron en la línea original.

Las semillas sembradas se estratificaron durante 4-5 días a 4° C en oscuridad y a continuación se cultivaron en condiciones de día largo (ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad) a 22° C durante 7 días. Tras este periodo las plantas se trasplantaron a tierra regada con solución nutritiva. Estas plantas se dejaban crecer en las mismas condiciones de luz hasta que se recolectaban las semillas.

###### 1.1.1.1 Esterilización y siembra

Las semillas se esterilizaron con un lavado de 5 minutos con 1 mL de solución de etanol 70% y Triton X-100 0,05% y un segundo con 1 mL de etanol 96% también de 5 minutos. Se sembraron en condiciones de esterilidad en medio Murashige-Skoog (MS) con 0.8 % (p/v) agar, 1% (p/v) de sacarosa y pH 5.7.

###### 1.1.1.2 Tratamientos con GAs y paclobutrazol

Los tratamientos con GA y paclobutrazol (PAC) se llevaron a cabo en placas de MS suplementadas con distintas concentraciones de estos compuestos: 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M de GA<sub>3</sub> y 5, 10, 50 y 100 nM de PAC. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 7 días.

###### 1.1.1.3 Transformación

Las plantas fueron sometidas al tratamiento de inmersión floral para su transformación (Clough y Bent, 1998; protocolo modificado). Una vez se consiguió el cultivo de preinoculación saturado de *Agrobacterium tumefaciens*, se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm. El *pellet* se resuspendió en una solución de sacarosa 5% y Silwet (240  $\mu$ L por 1 L). En esta solución se introdujeron las plantas de *Arabidopsis* de modo que se impregnaran bien las flores jóvenes, que son las que serían inoculadas con *A. tumefaciens* y adquirirían el T-DNA con el inserto construido. Las líneas transformadas fueron WT, *gai-1D* y *dellaP*.

Las plantas inoculadas se taparon y se dejaron a 22° C durante unas 18 h para facilitar la infección de *A. tumefaciens*. Tras este tiempo, ya se dejaron destapadas en condiciones de día largo y se esperó a la maduración de las flores para recolectar las semillas transgénicas.

Las semillas recolectadas de las flores inoculadas (T1) se sembraron en medio MS con el herbicida BASTA 0.01% (p/v) y el antibiótico carbenicilina (Car) 0.01% (p/v) para seleccionar

aquellas plantas que hayan adquirido el inserto de T-DNA y eliminar cualquier presencia de células de *A. tumefaciens* respectivamente. Posteriormente, las plantas seleccionadas se pasaron a tierra para examinar su desarrollo.

### **1.1.2 *Nicotiana benthamiana***

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron empleadas para la expresión transitoria de proteínas, ya que esta planta presenta un sistema de RNA de interferencia alterado (Yang *et al.*, 2004). Las proteínas se sobreexpresaron mediante la infiltración de hojas con células de *A. tumefaciens*.

#### **1.1.2.1 Agroinfiltración**

Las células de *A. tumefaciens* se cultivaron en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes a la resistencia de la cepa y la proporcionada por la construcción de DNA para seleccionar las células que la contenían. El cultivo se refrescó el día previo a la infiltración en 5 mL de LB con los mismos antibióticos para obtener un cultivo saturado apto para la inoculación.

Las células fueron centrifugadas el día de la infiltración y fueron resuspendidas en 2 mL solución de infiltración (MES 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM y acetosiringona 200 μM). A continuación, se dejaron incubando en oscuridad durante 2 h a T ambiente. Por último, se prepararon los inóculos con las células necesarias para expresar las proteínas de interés y se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* usando jeringuillas de 1 mL.

Las plantas infiltradas se dejaron en cámara de cultivo durante 3 días a 22° C en condiciones de día largo. Pasado este tiempo se recogió la muestra de tejido infiltrado para su observación al microscopio confocal o para analizar las interacciones de proteínas por co-inmunoprecipitación (co-IP).

### **1.1.3 Recogida de muestras**

Para la recogida de muestras de tejido tanto de *Arabidopsis* como de *N. benthamiana*, se congeló el material vegetal (ápices caulinares y hojas infiltradas, respectivamente) usando nitrógeno líquido y se guardó a -80° C para posteriormente machacar el tejido con un mortero enfriado con nitrógeno líquido. El tejido machacado se recogió en tubos de microcentrífuga de 2 mL.

## **1.2 Microorganismos**

### **1.2.1 *Escherichia coli***

Para la construcción y la clonación de los diferentes vectores se transformaron células de *Escherichia coli*. La cepa TOP10 fue la empleada en este trabajo, apta para la transformación mediante electroporación.

El medio básico empleado para el crecimiento era Luria-Bertani (LB), al que se le añadía agar para el cultivo en placa y los antibióticos necesarios. La composición del medio es 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl y, si era sólido, 1.5% (p/v) agar. Tras la siembra, los cultivos se dejaban a 37° C o/n y en agitación si eran líquidos.

### **1.2.1.1 Transformación**

Para la transformación, se añadió 1 µL de la solución donde estaba el plásmido a una alícuota de 50 µL de células de la cepa TOP10. A continuación, esta solución se introduce en un vial de electroporación y se somete a un pulso de 1500 V durante 4 ms. Después, las células se rescatan con 250 µL de medio LB y se mantienen durante 1 hora a 37° C en agitación para que expresen los genes de resistencia a antibiótico del vector que portan.

Las células se sembraron en LB agar al que se añadía un antibiótico en función de la resistencia del vector (espectinomina (Spm), kanamicina (Kan), ampicilina (Amp) o gentamicina (Gnt) 0,01% (p/v)) y se dejaron incubando o/n para seleccionar aquellas colonias transformantes. A partir de las colonias resistentes se inocularon cultivos líquidos de 3 mL con el fin de aislar DNA del plásmido correspondiente.

### **1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens***

La cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* fue la empleada en este trabajo, apta para ser transformada por electroporación y con resistencias a los antibióticos rifampicina (Rif) y Gnt. El medio en donde se cultivaba es el mismo que en el caso de *E. coli*. Tras la siembra los cultivos se dejaban a 28° C durante 2 días, si eran sólidos, y o/n en agitación si eran líquidos.

#### **1.2.2.1 Transformación**

Los vectores, ya clonados en *Escherichia coli* y recogidos en minipreps se utilizaron para transformar las células de *Agrobacterium tumefaciens*, para más tarde transferir el inserto de ADN a *Arabidopsis*.

Para la transformación se añadió 1 µL de plásmido a una alícuota de 50 µL de células de la cepa C58. A continuación, esta solución se introduce en un vial de electroporación y se somete a un pulso de 1440 V durante 4 ms. Después, las células se rescatan con 250 µL de medio LB y se mantienen durante 2 h a 28° C en agitación para que expresen los genes de resistencia a antibiótico del vector que portan.

Las células se sembraron en LB agar al que se añadía un antibiótico en función de la resistencia del vector (Spm o Kan 0.01% (p/v)), junto con Rif y Gnt 0.01% (p/v), y se incubaron durante 2 días para seleccionar las colonias que se hubieran transformado. Se seleccionaron aquellas colonias que hubieran crecido para inocularlas en 5 mL de LB líquido con los antibióticos respectivos y se volvían a incubar, esta vez o/n.

### **1.2.3 *Saccharomyces cerevisiae***

Las cepas Y2HGold e Y187 de *Saccharomyces cerevisiae* fueron las empleadas en este trabajo. Estas cepas presentan doble auxotrofia para leucina y triptófano, por lo que la selección de células transformadas se basó en su capacidad para crecer en medios carentes de estos aminoácidos gracias al plásmido con el que se transformen.

Para el crecimiento de la levadura se empleó el medio mínimo sintético (SD), pH 5.8, al que se le añadía agar para el cultivo en placa. La composición del medio es YNB 0.77% (p/v), suplemento de aminoácidos 0.14% (p/v) y, si era sólido, 2% (p/v) agar. Antes de sembrar, al medio se le añadía glucosa 0.2% (p/v), histidina y uracilo 0.04% (p/v), junto a leucina o triptófano, si era necesario, en función de la auxotrofia. Tras la siembra, los cultivos se dejaban a 28° C durante 2/3 días y en agitación y o/n si eran líquidos.

Para el *mating* se empleó el medio levadura peptona dextrosa (YPD), cuya composición es peptona 2% (p/v) y extracto de levadura 1% (p/v), al que se añadía posteriormente glucosa 2% (p/v). Este medio es escaso en nitrógeno, lo que induce la diploidización de las levaduras. Las células se dejaban en este medio a 28° C o/n.

#### **1.2.3.1 Transformación**

La transformación de levaduras haploides se realizó mediante un protocolo que combina el tratamiento con polietilenglicol (PEG), acetato de litio (LiAc) y DNA de simple cadena (ssDNA) junto a un choque térmico (Schiestl y Gietz, 1989; protocolo modificado). Tras el proceso, se sembraron las células en SD sin triptófano o leucina para seleccionar las colonias que hubieran incorporado el plásmido.

#### **1.2.3.2 Mating**

Tras el crecimiento de células haploides, se realizó el apareamiento o *mating* para la generación de células diploides (Fields y Song, 1989). Para el *mating* se inocula una colonia de cada cepa en 0,5 mL de medio YPD y posteriormente se siembra en placa en medio SD sin triptófano ni leucina para seleccionar las células que porten los dos plásmidos necesarios para el ensayo de doble híbrido.

#### **1.2.3.3 Doble híbrido**

Para el ensayo de doble híbrido, se picaron colonias seleccionadas tras el mating que se resuspendieron en agua y se hicieron diluciones seriadas de las mismas (1:10, 1:100 y 1:1000). A continuación, se sembraron en cuatro placas con SD: una sin triptófano ni leucina como control de crecimiento, otra igual, pero sin histidina para seleccionar células que expresan el gen *HIS3* gracias a la interacción entre las proteínas, y otras dos a las que se añadía 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) 5 mM y 10 mM para eliminar falsos positivos, ya que es un inhibidor competitivo del enzima codificado por el gen *HIS3*. Las células se dejaron creciendo durante 3-6 días para observar el crecimiento de las colonias.

## 2. Técnicas de Biología Molecular

### 2.1 Construcciones de DNA

#### 2.1.1 Reacción LR

Para generar los vectores de expresión necesarios para este trabajo, se partió de vectores de entrada que llevaban insertada la secuencia de los genes de interés flanqueadas por los sitios de recombinación attL, para llevar a cabo una reacción LR que resultara en los genes de interés insertados en los vectores de expresión flanqueados por sitios attB generados tras la reacción. Esta reacción se puso a punto empleando el kit comercial Gateway LR Clonase II de Invitrogen.

Vector de entrada (50 ng/μL)	0,5 μL
Vector de destino (150 ng/μL)	0,5 μL
Tampón TE 1X	3 μL
LR clonasa II	1 μL

Tabla 2.1: Reactivos empleados en la reacción LR.

La LR tuvo lugar durante 1-16 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, la LR se detuvo mediante la adición de 1 μL de proteinasa K y posteriormente se mantuvo 10 minutos a 37° C. El producto fue empleado para transformar células de *E. coli*.

#### 2.1.2 Extracción de DNA plasmídico

Después de la incubación de los cultivos líquidos de *E. coli* se procedió a la extracción y purificación de los vectores clonados mediante el kit comercial E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini I de Omega, basado en la purificación del ADN plasmídico por columna tras una lisis alcalina. El plásmido es eluido en 40 μL de tampón de elución y es cuantificado espectrofotométricamente mediante NanoDrop.

Para comprobar que el plásmido obtenido era el deseado se llevaba a cabo una digestión del mismo con diferentes combinaciones de enzimas de restricción. La digestión se dejaba a 37° C durante 1-16 h. Tras la reacción, se analizaba el tamaño de los fragmentos generados mediante electroforesis en geles de agarosa, normalmente del 1% (p/v).

## 2.2 Análisis de la expresión de proteínas

### 2.2.1 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas de hojas de *N. benthamiana* se realizó de dos formas:

i) Para comprobar la expresión de las proteínas sobreexpresadas, se realizó una extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes con tampón Laemli 2X (Tris-HCl pH 6,8 (67,5 mM), SDS 2%, glicerol 25% y azul de bromofenol 0,015%) con DTT 1M a partir de 100 μL de tejido pulverizado. La mezcla se agitó con vórtex durante 30'' y se hirvió durante 5' a 95° C. Posteriormente se centrifugó a 4° C durante 15' a 13000 rpm. Se recogieron 5 μL del sobrenadante y se diluyeron en 20 μL de Laemli 1X para su cuantificación mediante un método colorimétrico derivado del de Lowry *et al.* (1951), midiendo la absorbancia a 750 nm. Para la recta de calibrado se prepararon tubos con BSA a diferentes concentraciones (0,2; 0,5;

1,1 y 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Mediante la función obtenida se calculó la concentración de proteína de las muestras.

- i) Para los análisis por co-inmunoprecipitación (Co-IP) se realizó una extracción de proteínas en condiciones nativas. Para ello se partió de unos 800  $\mu\text{L}$  de material pulverizado que se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción, que estaba compuesto de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, Triton-X100 1% (p/v), 1 mM PMSF y 1x del "cocktail" de inhibidores de proteasas de Roche. Las muestras homogenizadas se mantuvieron 15 minutos en hielo y a continuación se centrifugaron dos veces a 13000 rpm y 4° C para eliminar los restos celulares. Las proteínas en el extracto se cuantificaron por el método de Bradford.

### 2.2.2 Co-inmunoprecipitación

Tras la cuantificación, se guardaron 40  $\mu\text{g}$  de proteínas totales desnaturizadas con tampón laemli para emplearse como *input*. Para la IP se empleó 1 mg de proteínas totales en un volumen de 1 mL de tampón de extracción, que se incubaron con 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-GFP conjugado a bolas paramagnéticas (Miltenyi) durante 2 h a 4° C con rotación suave. Tras la incubación el extracto se pasó por columnas "μColumn" (Miltenyi) a T ambiente y se lavaron con 800  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado frío (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 150 mM NaCl, Triton-X100 0,1% (p/v)). Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron con tampón de elución desnaturizante proporcionado por el fabricante (Miltenyi).

### 2.2.3 Western blot

Los extractos de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los geles contaban con una fase superior de concentración, de menor concentración de acrilamida/bisacrilamida, y una fase inferior de separación del 12,5% de acrilamida/bisacrilamida. La SDS-PAGE se llevó a cabo a 170 V durante 90'-120' a T ambiente.

Tras finalizar la SDS-PAGE, se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (Amersham Hybond, GE Healthcare Life Sciences) activadas con metanol. La transferencia se realizó en condiciones húmedas en tampón de transferencia continuamente en agitación a 100 V durante una hora a 4° C. A continuación, la membrana se tiñó con Ponceau S (Ponceau S 0,1% en ácido acético 5%) para comprobar que las proteínas se habían transferido a la membrana. Para ello se sumergió la membrana durante 10' en agitación lenta; pasado este tiempo se observaban las bandas de las proteínas más abundantes (la subunidad grande de la RuBisCO).

Tras la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de bloqueo (TBS-T (TBS + Tween 20 0,1%) y leche desnatada en polvo 5% (p/v). La membrana se sumergió durante 1 h en agitación lenta y se lavó posteriormente con TBS-T. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante 1 h a T ambiente u o/n a 4° C. Se trabajó con anticuerpos monoclonales producidos en ratón  $\alpha$ -GFP (JL8, Clontech Laboratories),  $\alpha$ -c-myc (9E10, Sigma Aldrich) y  $\alpha$ -HA, este último conjugado a la peroxidasa de rábano (HA-HRP, Roche Applied Science). Los anticuerpos se diluyeron en la solución de bloqueo en proporción 1:1000 ( $\alpha$ -c-myc)

o 1:5000 ( $\alpha$ -GFP y  $\alpha$ -HA). Al acabar la incubación se lavó la membrana 4 veces (1 lavado de 15' y 3 de 5') con TBS-T para seguidamente realizar la incubación con el anticuerpo secundario producido en oveja  $\alpha$ -mouse IgG-HRP (GE Healthcare), diluido en solución de bloqueo en proporción 1:10000 (a excepción de las membranas incubadas con HA-HRP). La incubación se realiza de la misma forma que con el anticuerpo primario. Tras la incubación se lava la membrana de la manera antes mencionada y se dispensaron 300  $\mu$ L de la solución de revelado (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity, Thermo Scientific), mediante la cual se produce una reacción quimioluminiscente por la acción de la HRP. Tras 5' de reacción, la membrana se introduce en la cámara de revelado y se observan las bandas de las proteínas mediante la máquina LAS 3000 (FujiFilm).

### 2.3 MicroRNA artificial (amiRNA)

Para la obtención de nuevas líneas mutantes que presentasen una reducción en la expresión de *MED31*, se recurrió a la técnica de silenciamiento dirigido por amiRNA, siguiendo el protocolo desarrollado por Carbonell *et al.* (2014). Esta técnica consiste en la generación de amiRNAs basados en el microRNA *MIR390a* de *Arabidopsis thaliana* mediante el apareamiento de dos oligonucleótidos solapantes y parcialmente complementarios. Éstos son insertados de forma direccional en vectores de expresión *BsaI/ccdB* (B/c) mediante digestión parcial por *BsaI* y ligación por T4 DNA ligasa, reemplazando en el vector el gen letal *ccdB* por el amiRNA.

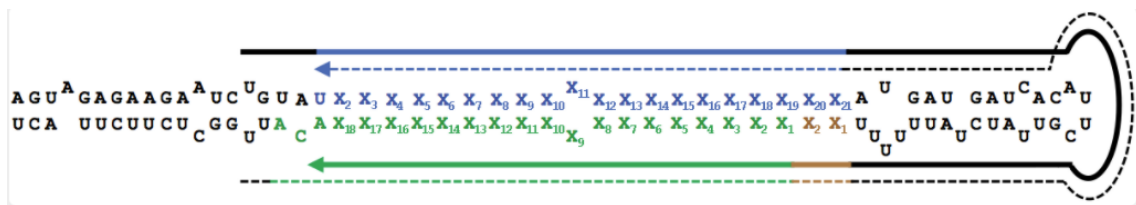


Figura 2.1: Representación esquemática del sistema de generación de amiRNAs. Las X indican las bases que el programa genera *de novo* para dirigir el amiRNA al gen deseado. Fuente: <http://p-sams.carringtonlab.org/amirna/designer>

#### 2.3.1 Generación del amiRNA

Para generar un amiRNA que silencie la expresión de *MED31*, se accedió al sitio web <http://p-sams.carringtonlab.org/amirna/designer>, una herramienta online para el diseño de amiRNAs que provee la secuencia del amiRNA junto con la de los oligonucleótidos requeridos para clonar el amiRNA en vectores B/c en medio de la secuencia de *AtMIR390a*, necesaria para formar un RNA de doble cadena, y obtener un amiRNA funcional.

La herramienta nos pide la entrada del gen para generar un amiRNA y los oligonucleótidos necesarios para obtenerlo, ofreciendo varias opciones en función de cuáles son considerados una mejor opción por el programa.

amiRMED31-F Longitud: 75 pb; Tm: 87,6° C  
TGTATGAGTCAAGTAGGCTTCCCTGATGATGATCACATTTCGTTATCTATTTTTTCAGGGAAGCCGACTTGACTCA

amiRMED31-R Longitud: 75 pb; Tm: 87,9° C  
AATGTGAGTCAAGTCGGCTTCCCTGAAAAAATAGATAACGAATGTGATCATCATCAGGGAAGCCTACTTGACTCA

**Figura 2.2: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación del amiRNA.**

Los oligonucleótidos son disueltos en un tampón de apareamiento (Tris-HCl pH 7,5 (60 mM), NaCl (500 mM), MgCl<sub>2</sub> (60 mM) y DTT (10 mM)) a una concentración de 4 μM y son incubados durante 5' a 94° C en un termobloque. A continuación, se deja enfriar el termobloque a T ambiente durante 1 h. Los oligonucleótidos apareados se disuelven en agua a una concentración de 0.15 μM y se procede a la reacción de digestión-ligación para su inserción en el vector de expresión, que tiene lugar a 37°C durante 30'.

Vector B/c	50 ng
Oligos apareados	1 μL
10X buffer T4 DNA ligasa	1 μL
T4 DNA ligasa (3 U/μL)	1 μL
BsaI (10 U/μL)	1 μL
Agua	Hasta 10 μL

**Tabla 2.2: Reactivos empleados en la reacción de digestión-ligación.**

Para comprobar que el amiRNA se había ligado correctamente, se realizó una digestión del vector ya clonado en *Escherichia coli* con los enzimas EcoRI y PstI que fue analizada posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y secuenciado. Al amiRNA generado se le denominó *amiR-MED31*.

## 2.4 Análisis del nivel de expresión génica

### 2.4.1 Extracción de RNA total

El RNA total se obtuvo a partir de material vegetal congelado de cada una de las diferentes líneas transformadas con *amiR-MED31*. Para la extracción del RNA se empleó el kit comercial NucleoSpin RNA Plant de Macherey-Nagel. En primer lugar, se añadió 350 μL de tampón RA1 mezclado con 3.5 μL de β-mercaptoetanol, esta mezcla lisa las células e inactiva las RNasas. A continuación, el lisado es filtrado mediante minicolumnas para retener y purificar el RNA. Por último, se eluye el RNA en 30 μL de agua libre de RNasas. El RNA recogido es cuantificado en el NanoDrop.

### 2.4.2 Síntesis de cDNA

A partir del RNA obtenido se sintetiza el cDNA mediante el kit comercial PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis de Takara. Este kit permite la síntesis de cDNA en dos fases: en la primera se produce el alineamiento de oligonucleótidos dT en la cola poliA de los RNA mensajeros (mRNA) y en la segunda la síntesis propiamente dicha con la transcriptasa reversa PrimeScript.



Oligonucleótido dT	1 $\mu$ L
dNTPs	1 $\mu$ L
mRNA molde	1 $\mu$ g
Agua libre de RNasas	Hasta 10 $\mu$ L

**Tabla 2.3: Reactivos empleados para la alineación de los oligonucleótidos dT con el mRNA molde.**

Esta mezcla se mantiene durante 5 minutos a 65° C y seguidamente se introduce en hielo. A continuación, se añaden los reactivos necesarios para completar la reacción de síntesis de cDNA.

Mezcla de mRNA molde y oligonucleótido dT	10 $\mu$ L
Tampón PrimeScript 5X	4 $\mu$ L
Inhibidor de RNasas (40U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
PrimeScript RTasa (200U/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L

**Tabla 2.4: Reactivos empleados en la reacción de síntesis de cDNA genómico.**

La reacción tiene lugar a 42° C durante 1 h. Seguidamente, se inactiva el enzima incubando la reacción a 95° C durante 5'. El producto de la reacción se diluye en agua hasta los 100  $\mu$ L y se guarda a -20° C.

### 2.4.3 PCR cuantitativa “real-time”

El nivel de expresión se determinó mediante una PCR cuantitativa “*real-time*” (RT-qPCR), con la que se puede, según la cantidad de cDNA de partida (y, por tanto, de mRNA), obtener un valor relativo de la expresión del gen de interés con respecto a la de un gen control. Esto se realiza al establecer un valor umbral de producto amplificado y determinando el ciclo de la PCR en el que se supera este valor (“*Cycle threshold*”,  $C_T$ ). La cantidad de producto amplificado se determina midiendo la intensidad de fluorescencia emitida por el marcador SYBR Green, que se activa una vez se une a los fragmentos amplificados. Esta PCR se realizó en un termociclador de RT-qPCR ABI 7500 Fast-Real Time y los resultados se analizaron mediante el software con el que funciona la máquina.

El perfil térmico empleado en la qPCR fue 10' a 95° C y a continuación 40 ciclos de 15'' a 95° C y 1' a 60° C.

Las secuencias de los oligonucleótidos para la RT-qPCR se obtuvieron mediante el software Primer Express 3.0 y los oligonucleótidos son previamente validados para comprobar que no dan anomalías que interfieran en la determinación de la cantidad de producto amplificado. En este caso el gen control es *EF1 $\alpha$* .

MED31qRTf: 5'-GAAACAACAGACTGAAGCACATTCTAC-3'	Longitud: 27 pb; Tm: 64.9° C
MED31qRTTr: 5'-TTGAAGGTGCAACTGGTGGTT-3'	Longitud: 21 pb; Tm: 66.8° C

**Figura 3.4: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR de los cDNA de MED31.**

cDNA	1 $\mu$ L
SYBR Premix + Dye	10.4 $\mu$ L
Oligonucleótido F 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ L
Oligonucleótido R 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ L
Agua	Hasta 20 $\mu$ L

**Tabla 2.5: Reactivos empleados en la RT-qPCR.**

### 3. Microscopía

#### 3.1 Lupa

Para la observación y toma de imágenes de plántulas de *Arabidopsis* se utilizó la lupa de fluorescencia MacroFluo (MZZ16F Leica) con cámara digital (DFC300 FX Leica) equipada de un sistema de filtros para GFP2, DSR y Violet.

#### 3.2 Microscopio confocal

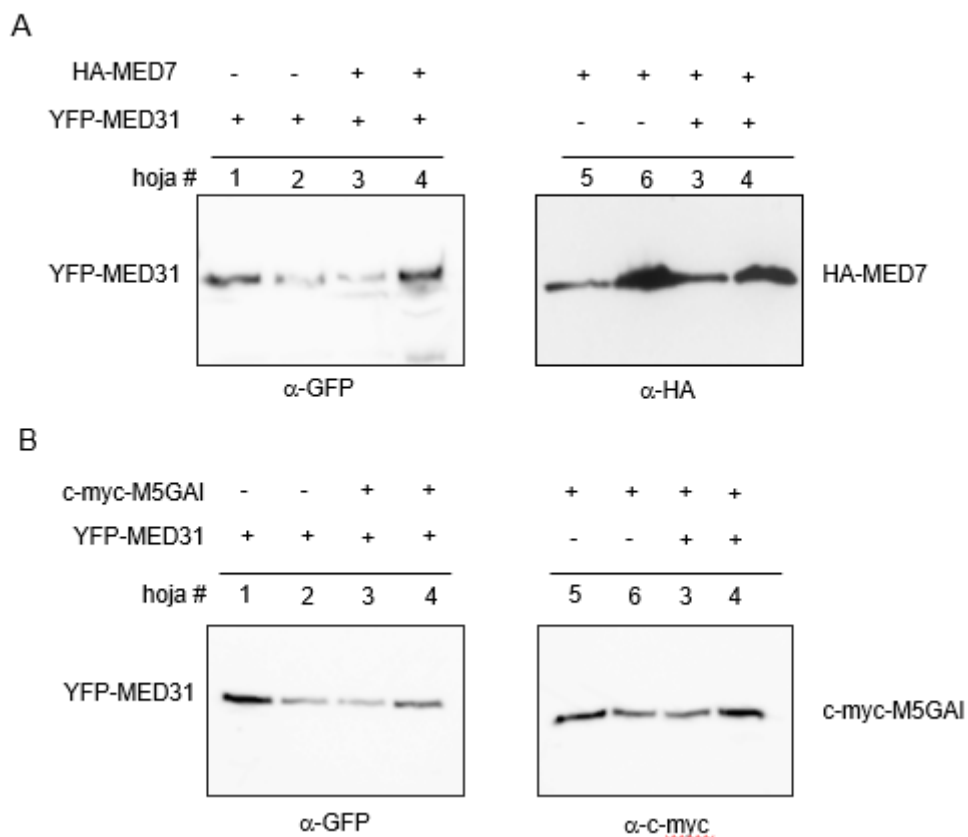
Para la observación de la localización celular de MED31 en hojas infiltradas de *N. benthamiana* se empleó el microscopio confocal Leica TCS SL, con el láser de 488 nm para excitar la proteína YFP fusionada al extremo N-terminal de MED31. Para la observación se obtuvieron muestras circulares de tejido empleando un sacabocados que se depositaron en un portaobjetos con agua. La emisión emitida por la YFP se recogió entre 509-553 nm.

## IV. RESULTADOS

### 1. Interacción entre MED31 y otras subunidades del Mediator

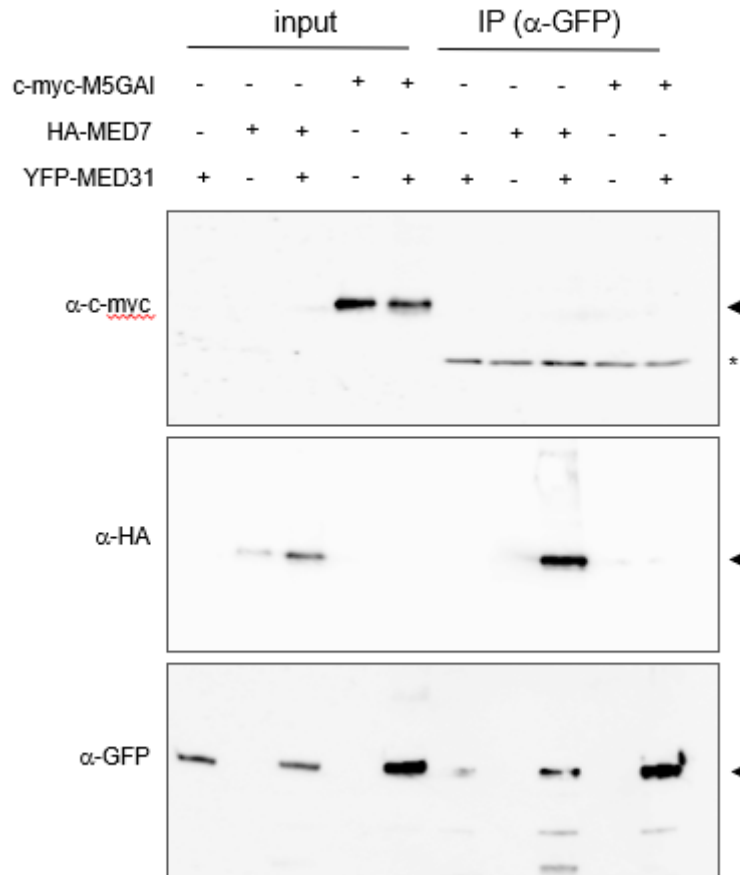
Antes de pasar a investigar la interacción de MED31 con proteínas DELLA y la posible relevancia fisiológica de esta interacción, se trató de definir algunas características básicas que MED31 de *Arabidopsis* debería cumplir si actúa como el MED31 de otros organismos modelo como humanos o levaduras. Esto es, tiene que estar integrado en el complejo Mediator de la misma manera que lo es en otros organismos y, por supuesto, tiene que tener una localización nuclear.

En levadura, MED31 se encuentra en el módulo central, formando un submódulo junto a MED7, MED21 y MED10, siendo MED7 el núcleo de este submódulo, ya que interactúa con todos los demás (Koschubs *et al.*, 2009; Larivière *et al.*, 2013). MED31 está conectado al resto del complejo, por tanto, a través de MED7. Para comprobar que esta organización se mantiene también en plantas, se procedió a realizar un ensayo de interacción entre MED31 y MED7 por co-IP en hojas de *N. benthamiana*. El CDS de MED31 se clonó en el vector pEarleyGate104, generando una fusión traduccional YFP-MED31 y el de MED7 en el vector pEarleyGate201 para generar una fusión HA-MED7, ambas bajo el control del promotor 35S. A continuación, se expresó transitoriamente HA-MED7, YFP-MED31 y una mezcla de las dos en dos hojas de *N. benthamiana* cada una por infiltración con *A. tumefaciens*, y determinamos si las proteínas se expresaban y si tenían el tamaño esperado.



**Figura 4.1: Análisis Western de los niveles de proteínas transgénicas en plantas de *N. benthamiana*. (A) Infiltraciones con HA-MED7 y/o YFP-MED31. (B) Infiltraciones con c-myc-M5GAI y/o YFP-MED31. Se infiltraron dos hojas con cada mezcla según en los paneles que hay encima de las imágenes. Los números son los identificadores las hojas en cada experimento.**

Como se puede ver en la Figura 4.1A, las proteínas del tamaño esperado se acumularon de la manera esperada. Por tanto, teníamos material adecuado para realizar las IPs. Para ello usamos dos extractos control provenientes de las hojas 1 y 6, y que expresan YFP-MED31 y HA-MED7, respectivamente, así como un extracto de la hoja 4 que expresa ambas proteínas. La IP se realizó con anticuerpos  $\alpha$ -GFP para inmunoprecipitar YFP-MED31.

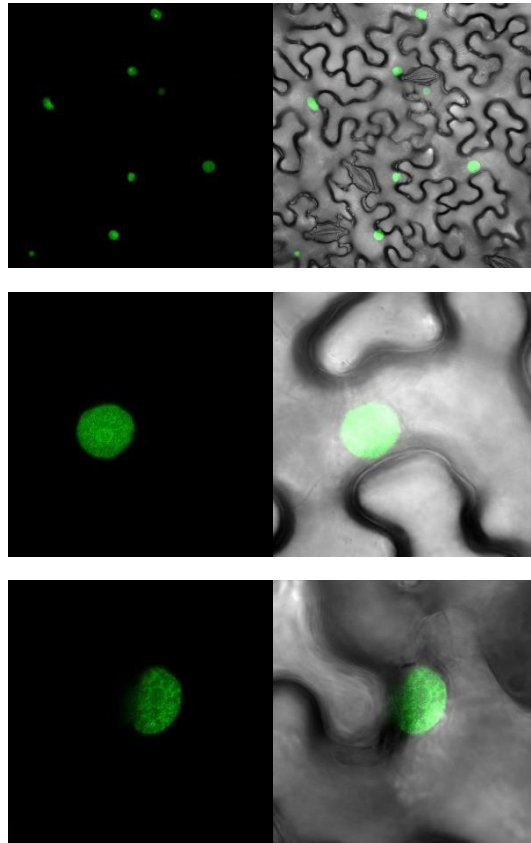


**Figura 4.2: Resultado del ensayo de co-IP de proteínas transgénicas en *N. benthamiana*. El \* marca una banda inespecífica; las puntas de flecha indican la banda correspondiente a la proteína expresada.**

Como se puede ver en la Figura 4.2 y consistente con los resultados de la Figura 4.1A, YFP-MED31 y HA-MED7 se acumularon en las hojas esperadas (*input*). Y lo más importante, HA-MED7 fue inmunoprecipitado con anticuerpos  $\alpha$ -GFP únicamente de las hojas que co-expresaban HA-MED7, indicando que ambas proteínas estaban interaccionando físicamente. Aunque el ensayo de co-IP no es cuantitativo, sí pudimos observar que la señal de HA-MED7 co-inmunoprecipitada es bastante fuerte, apuntando a que la interacción entre ambas proteínas es muy estrecha, probablemente con una relación de 1:1, de forma similar a como se encuentran en levadura o mamíferos. Por tanto, MED31 y MED7 de *Arabidopsis* se comportan como cabría esperar al interaccionar in vivo.

## 2. Localización nuclear de MED31

Para el ensayo de localización se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con la construcción que sobreexpresa YFP-MED31 (la misma construcción empleada para las IP) mediante el promotor 35S. Como era de esperar, y consistente con un papel relacionado con la expresión génica, YFP-MED31 apareció localizado exclusivamente en los núcleos de las células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana* (Figura 4.3).



**Figura 4.3:** Imágenes de microscopía confocal de células de la epidermis del envés de hojas infiltradas de *N. benthamiana* con la construcción YFP-MED31. Las imágenes de la izquierda se corresponden con el canal de la frecuencia emitida por YFP y las de la derecha, la convergencia de la imagen transmitida con la fluorescencia emitida.

## 3. Interacción entre MED31 y DELLAs por doble híbrido

Una vez mostrado que MED31 probablemente actúa como parte del complejo Mediator en *Arabidopsis*, tratamos de confirmar la interacción encontrada en el laboratorio entre MED31 y M5GAI, y además, extender este análisis a las otras cuatro DELLA de *Arabidopsis*, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3 mediante doble híbrido en levadura. La posible interacción entre las proteínas DELLA y MED31 es muy interesante puesto que podría ser una manera de conectar la actividad de Mediator con el ambiente, puesto que los niveles de DELLA son muy susceptibles a los cambios en las condiciones del entorno de la planta (Sun *et al.*, 2010). Además, MED31 ocupa una posición en el complejo que lo deja en la superficie del mismo, siendo así accesible a interacciones con otras proteínas ajenas al mismo (Larrivière *et al.*, 2013). Para ello se emplearon versiones de todas ellas don el dominio N-terminal delecionado, de manera similar a M5, ya que causa que la versión entera tenga una fuerte capacidad de autoactivación

transcripcional, haciéndola inservible para el ensayo de doble híbrido. Todas las versiones empleadas consistían en el dominio GRAS. En los ensayos se emplearon los dos juegos de vectores que normalmente se usan en este tipo de ensayo. Por un lado, M5GAI y RGA52 se fusionaron al dominio de unión a ADN de Gal4 (BD) en el vector pDEST32 y se usaron para transformar la cepa de levadura Y187; se empleó el vector pDEST22 para fusionar el dominio de activación de Gal4 (AD) a MED31 y se introdujo en la cepa de levadura Y2HGold. En el caso de las versiones deletionadas de RGL1, RGL2 y RGL3, fueron insertadas en el vector pGBKT7 para su fusión con el BD y MED31 se insertó en el vector pGADT7 para obtener la fusión AD-MED31. Con estas construcciones se transformaron las cepas Y187 e Y2HGold, respectivamente.

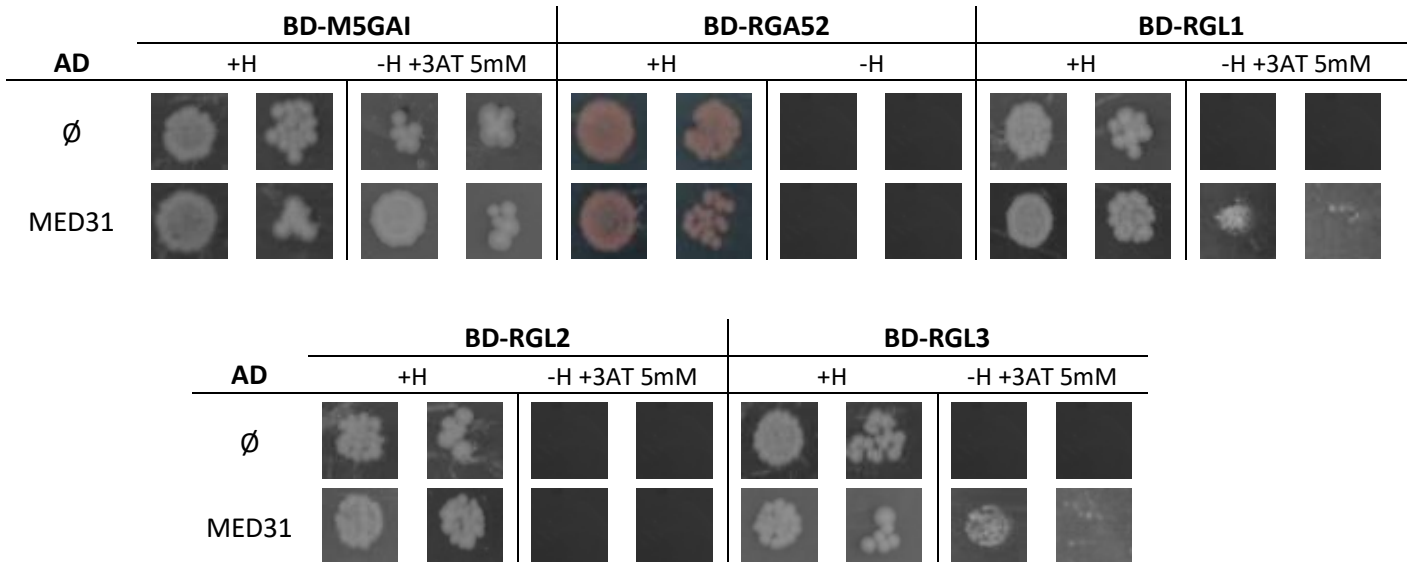


Figura 4.4: Goteos realizados con levaduras diploides transformadas con BD-DELLA y AD-MED31. ∅: pDEST22/pGADT7 vacío. +/-H: con/sin histidina.

Los resultados de la Figura 4.4 muestran que MED31 es capaz de interactuar con tres de las cinco DELLAs. A pesar de que BD-M5GAI presenta un pequeño índice de autoactivación, no se observa el mismo crecimiento que en los goteos de las células que también portan AD-MED31. Por otro lado, a pesar de que RGA52 es capaz de interactuar con MED31 cuando se expresa en el vector pGBKT7 (Figura 1.3), no se observa interacción cuando se expresa desde el pDEST32. Este último vector es centromérico y por tanto se encuentra en menor número de copias que los pGBKT7/pGADT7, que son episomales y por tanto permiten mayor acumulación de la proteína, que puede que sea limitante para la interacción RGA52 y MED31. Las interacciones con RGL1 y RGL3 se observan incluso en medio suplementado con 3AT 5mM, indicando que la interacción es lo suficientemente fuerte como para superar el efecto del inhibidor. En cambio, tampoco se observa interacción entre AD-MED31 y BD-RGL2. A falta de comprobaciones futuras de las interacciones, estos resultados apuntan a cierta especificidad en la interacción de MED31 con las DELLA.

Los resultados mostrados indican que la interacción ocurre a través del dominio GRAS de las proteínas DELLA, como ocurre con la mayoría de los interactores identificados hasta la fecha.

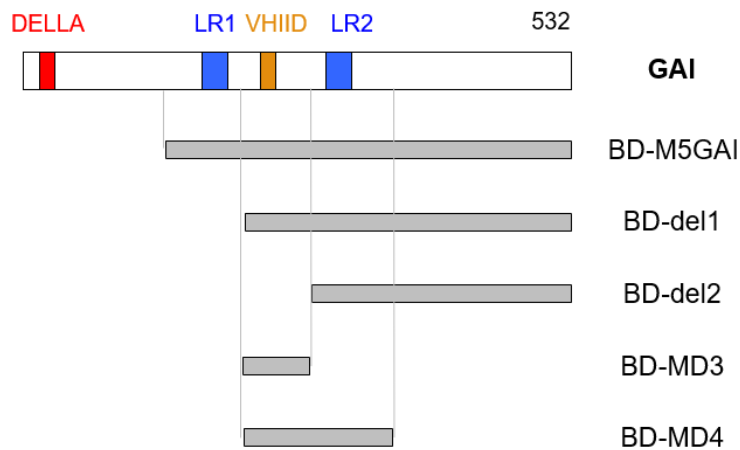


Figura 4.5: Descripción de las delecciones de GAI empleadas.

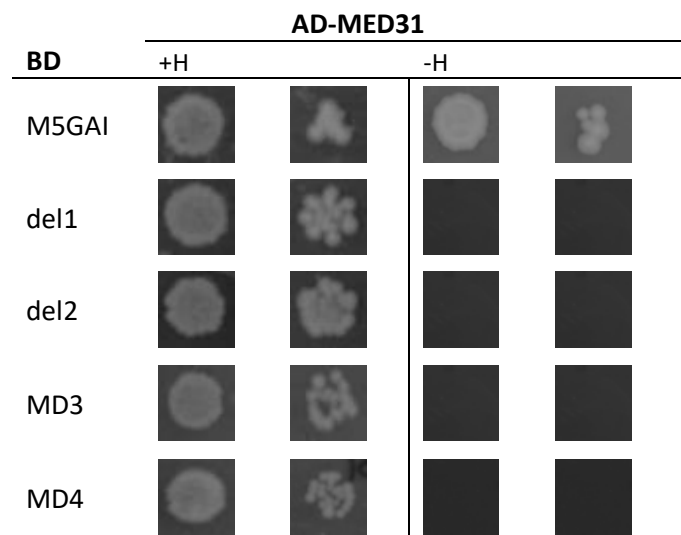


Figura 4.6: Goteos realizados con levaduras diploides transformadas con BD-GAI y AD-MED31. Ø: pDEST22 vacío. +/-H: con/sin histidina.

Para profundizar un poco más en el mecanismo de interacción, decidimos enfrentar MED31 con versiones de GAI en las que el dominio GRAS también ha sido deletado en mayor o menor medida (Figura 4.5 y 4.6). Con el resultado obtenido, se puede ver que la interacción entre AD-MED31 y las delecciones de GAI solamente se da con BD-M5GAI. Este resultado indica que posiblemente M5GAI contiene la secuencia mínima con la que MED31 interacciona con GAI, ya que no se observa interacción de AD-MED31 con las demás delecciones. Estos resultados son consistentes con la idea general de que el motivo LR1 es esencial para mediar en la interacción de las proteínas DELLA con la mayoría de sus interactores.

#### 4. Interacción entre MED31 y DELLAs por co-inmunoprecipitación

Tras comprobar que MED31 es capaz de interactuar directamente *in vivo* con proteínas DELLA en un sistema heterólogo como *Saccharomyces cerevisiae* y que se localiza en el núcleo

celular en plantas, se procedió a realizar un ensayo mediante co-IP para confirmar que la interacción entre MED31 y DELLAs tenía lugar también *in planta*. Para ello, siguió la misma lógica que para la interacción entre MED7 y MED31, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con las construcciones pEarleyGate104-MED31, con la que se fusiona MED31 a YFP, y pEarleyGate203-M5GAI, para fusionar M5GAI al epitopo c-myc, ambas fusiones en el extremo N-terminal de la proteína, bajo el control del promotor 35S.

Como se puede ver en la Figura 4.2, no se observa que haya interacción entre MED31 y M5GAI *in planta* por co-IP, a pesar del resultado positivo encontrado en levadura (Figura 4.4) y de que los niveles de expresión de las proteínas de fusión son adecuados (Figura 4.1B). Pensamos que esto puede deberse a varias razones. Puede que MED31 y M5GAI realmente no sean capaces de interactuar directamente en el contexto fisiológico celular de la planta, requiriendo la presencia de alguna otra proteína para favorecer la interacción. De hecho, en el laboratorio se ha identificado un caso en el que las DELLA requieren de una proteína adaptadora para establecer una interacción con una tercera proteína, un requerimiento que no ocurre para ver la interacción en levadura. No tenemos ninguna pista de cuál podría ser esta proteína. Otra posibilidad es que las construcciones empleadas afectan a las estructuras de las proteínas de forma que los sitios de interacción no son reconocidos. Si bien YFP-MED31 es apto para interactuar con MED7, puede que la fusión a YFP enmascare específicamente los motivos de interacción con M5GAI. Es menos probable que el problema sea en c-myc-M5GAI, dado el pequeño tamaño del epitopo. En el laboratorio se va a fusionar MED31 a otros epitopos más pequeños como FLAG o HA para probar su interacción con DELLAs. En cualquier caso, el hecho de que MED31 interactúe claramente con tres de las cinco DELLAs en levadura nos hace pensar que no es una cuestión artefactual y que se podría dar en la planta.

## 5. Análisis de mutantes *med31*

Previamente en el laboratorio, durante la realización de mi TFG, se realizó un análisis inicial del papel ejercido por MED31 en *Arabidopsis*, empleando líneas mutantes SALK generadas por la inserción de un T-DNA que interrumpe la secuencia de *MED31*. En el trabajo se describió cómo una de las líneas mutantes, *med31-2*, presentaba una gran variedad de fenotipos morfológicos en diferentes etapas del desarrollo de la planta, desde las fases tempranas hasta los órganos reproductivos.

Además, a nivel molecular se comprobó que los niveles de expresión de *MED31* de los mutantes *med31-2* eran aproximadamente un 50% más bajos que en individuos WT, por lo que *med31-2* era un alelo hipomorfo. Esta bajada de los niveles de transcritos se daba a su vez en otros genes implicados en el desarrollo de la planta como *HANABA TARANU*, cuyo mutante ofrecía unos fenotipos con similitud a los de *med31-2*, como plántulas con 3 y 4 cotiledones (Kanei *et al.*, 2012).

La asociación de los fenotipos con la baja expresión de *MED31* se confirmó mediante la generación de líneas transgénicas en fondo *med31-2* que sobreexpresaban *MED31*, ya que se conseguía restaurar el fenotipo. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la baja expresión de *MED31* en *med31-2* era la causa de los fenotipos observados en las líneas mutantes.

En este trabajo se decidió investigar la posible relación entre MED31 y las DELLA y el posible significado fisiológico que puede tener esta relación. Para ello, se generó una nueva línea a partir de un retrocruzamiento entre las líneas *med31-2* y el silvestre Col-0, con el fin de eventualmente



limpiar el fondo genético de otras inserciones de T-DNA no ligadas, y así poder abordar genéticamente de una manera más “limpia” la posible relación de MED31 con DELLAs. Estas nuevas líneas presentaban prácticamente la misma variabilidad fenotípica descrita para el mutante *med31-2* (Figura 4.7 y 4.8). Estos resultados indican que probablemente, el fenotipo observado durante la realización del TFG no estaba influenciado por otras posibles inserciones en nuestro mutante.



**Figura 4.7:** Vista detallada de las plántulas de la línea obtenida por el retrocruzamiento entre *med31-2* y Col-0. En las imágenes se muestran plántulas mutantes *med31-2* con diferentes grados fenotípicos.



**Figura 4.8:** Vista detallada de las flores de la línea obtenida por el retrocruzamiento entre *med31-2* y Col-0. En las imágenes se muestran los diferentes fenotipos causados por la mutación en los órganos florales.

### 5.1 Efecto del tratamiento con GA y PAC

A pesar de no haber podido confirmar la interacción de DELLAs y MED31 in planta, pensamos que todavía valía la pena, como se ha mencionado con anterioridad, continuar hacia delante. Lo primero que quisimos hacer fue diseñar algún experimento que nos permitiera comprobar si la actividad de MED31 se veía comprometida si se alteraban los niveles de DELLA endógenos, es decir, comprobar la relevancia fisiológica de la interacción. Para ello pensamos que el mutante *med31-2* era idóneo puesto que es hipomorfo, es decir, tiene menos actividad que el silvestre, en este caso por una expresión reducida, una actividad susceptible de ser potenciada o reducida por DELLAs. Este tipo de ensayos no se podrían realizar con un alelo nulo. Por tanto, para comprobar si a nivel fisiológico el nivel de proteínas DELLA podía alterar el fenotipo del mutante *med31-2*, se sembraron semillas *med31-2* de una línea nueva obtenida tras el retrocruzamiento en MS suplementado con varias dosis de GA<sub>3</sub> o PAC, de modo que los niveles de DELLA disminuyeran o aumentaran, respectivamente, ya que el PAC es un inhibidor de la síntesis de GAs. En este caso, se realizó el mismo análisis del fenotipo morfológico de los individuos que en el TFG, atendiendo al número de cotiledones que tenían las plántulas puesto que este fenotipo era muy obvio y fácil de determinar.



Figura 4.9: Vista detallada de ejemplos de plántulas *med31-2* en medio MS a) control, b) con GA<sub>3</sub> 5µM y c) con PAC 50 nM.

		GA <sub>3</sub> (µM)					
		Mock	0,1	0,5	1	5	10
WT	2 cotiledones	90 (100%)	86 (100%)	84 (100%)	91 (100%)	83 (100%)	84 (100%)
	3 cotiledones	-	-	-	-	-	-
	4 cotiledones	-	-	-	-	-	-
<i>med31-2</i>	2 cotiledones	43 (52,44%)	54 (46,96%)	45 (54,22%)	22 (35,48%)	41 (53,95%)	51 (57,30%)
	3 cotiledones	37 (45,12%)	59 (51,30%)	35 (42,17%)	39 (62,90%)	34 (44,74%)	38 (42,70%)
	4 cotiledones	2 (2,44%)	2 (1,73%)	3 (2,61%)	1 (1,61%)	1 (1,32%)	-

Tabla 4.1: Frecuencia de los fenotipos de las plántulas *med31-2* tratadas con GA<sub>3</sub>.

		PAC (nM)				
		Mock	5	10	50	100
WT	2 cotiledones	90 (100%)	94 (100%)	87 (100%)	88 (100%)	93 (100%)
	3 cotiledones	-	-	-	-	-
	4 cotiledones	-	-	-	-	-
<i>med31-2</i>	2 cotiledones	48 (52,74%)	49 (54,44%)	40 (42,55%)	53 (51,96%)	50 (51,02%)
	3 cotiledones	41 (45,05%)	39 (43,33%)	45 (47,87%)	46 (45,10%)	45 (45,92%)
	4 cotiledones	2 (2,20%)	2 (2,22%)	9 (9,57%)	3 (2,94%)	3 (3,06%)

Tabla 4.2: Frecuencia de los fenotipos de las plántulas *med31-2* tratadas con PAC.

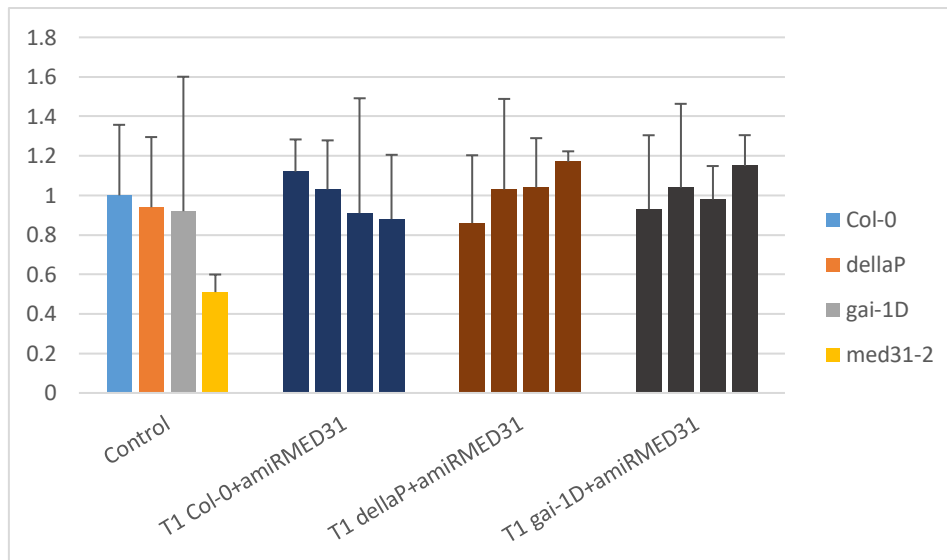
Como muestran los resultados de las Tablas 4.1 y 4.2 y la Figura 4.9, no parece que los porcentajes de plántulas *med31-2* con diferente número de cotiledones se vea afectado de

manera muy significativa o consistente por los tratamientos con GA<sub>3</sub> o PAC, es decir, por la ausencia o la sobreacumulación de DELLAs. Sí se observó la respuesta esperada a los tratamientos en cuanto a la elongación de peciolo de las hojas, más y menos elongados en respuesta a GA<sub>3</sub> y PAC (Figura 4.9). Estos resultados fueron ciertamente frustrantes. No obstante, pensamos que se podría hacer un análisis más exhaustivo del fenotipo de plántulas *med31-2* en presencia de los fármacos antes de descartar una relación fisiológica en la función de ambas proteínas. Por ejemplo, analizando longitud de la raíz o la presencia de cotiledones asimétricos, e incluso estudiar si se ven afectados los fenotipos homeóticos de flores, como sépalos con aspecto de pétalo o número variable de pétalos, muy típicos del mutante. También sería interesante abordar esta cuestión con una mayor resolución mediante un análisis del transcriptoma del mutante en presencia de GAs o PAC.

## 5.2 Análisis de los mutantes generados por amiRNA

A la vista de los resultados obtenidos cuando se alteran los niveles de DELLA mediante métodos farmacológicos, en los que no se apreció efecto alguno en el fenotipo de los mutantes *med31-2*, y como un abordaje alternativo, se decidió generar nuevas líneas mutantes *knock-down* por silenciamiento genético mediante amiRNA (Carbonell *et al.*, 2014), tanto en fondo silvestre, como en un fondo *dellaP*, que es deficiente en las cinco DELLA de Arabidopsis (Park *et al.*, 2013), y otro que produce una DELLA hiperactiva, *gai-1D*, introgresado en fondo Col-0 (Park *et al.*, 2013). De esta manera podríamos comprobar si, a nivel genético, los niveles elevados o reducidos de actividad DELLA junto con la disminución de la expresión de *MED31* producían algún efecto que afectara a la planta a nivel fisiológico. Puesto que el transgén *amiRMED31* es dominante, podíamos evaluar y comparar su efecto en plántulas T1s de los distintos fondos.

Desafortunadamente, los más de 20 individuos T1 aislados en cada uno de los fondos, resistentes al herbicida BASTA por la presencia del transgén *amiRMED31*, no presentaron diferencias aparentes respecto a las líneas de origen en el aspecto morfológico. El hecho de no observar ningún fenotipo apuntaba a que la estrategia de silenciamiento no había funcionado y no nos permitía sacar ninguna conclusión a cerca de la relación funcional DELLA-MED31. Por tanto, se decidió comprobar si de alguna manera el nivel de expresión de *MED31* se vio afectado por *amiRMED31*. Se realizó una RT-qPCR a partir de cDNA de cinco individuos T1 de cada fondo y se comparó el nivel de expresión de *MED31* entre las líneas transgénicas, las líneas parentales de origen y el mutante *med31-2*.



**Figura 4.10: Niveles de expresión de *MED31* de las líneas parentales y de las líneas transgénicas. Los datos se han agrupado en función del fondo genético.**

En el resultado obtenido se puede apreciar que las diferencias en el nivel de expresión de *MED31* de las líneas transgénicas respecto a las otras líneas son prácticamente mínimas, de modo que el *amiRMED31* no produjo el efecto esperado en las plantas transgénicas, mientras que la expresión en el mutante estaba reducida aproximadamente en un 50%, tal como ya habíamos observado en mi TFG. Pensamos que esta aproximación es muy interesante y que vale la pena retomarla mediante el diseño de otros amiR alternativos. También pensamos que esta aproximación probablemente sea más adecuada que la generación de una mutación nula por CRISPR-Cas9. Esta última probablemente resultaría en un fenotipo letal, si atendemos a que el alelo *med31-2* presenta en ocasiones individuos con fenotipos muy aberrantes con solo una disminución de la expresión de *MED31* a la mitad.

## V. CONCLUSIONES

1. MED31 probablemente forma parte el complejo Mediator de Arabidopsis a través de la interacción con MED7, confirmando que el modelo de levadura es extrapolable a plantas.
2. MED31 es capaz de interactuar con M5GAI en levadura y que requiere el motivo LR1, pero en las condiciones del ensayo de co-IP expuestas no se da esta interacción *in planta*.
3. Los niveles de proteína DELLA no alteran el fenotipo de número de cotiledones ni la variabilidad fenotípica del mutante *med31-2*.

## VI. REFERENCIAS

- Achard P, Genschik P. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot.* 2009;60(4):1085–92.
- Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, Fu X, Harberd N. DELLAs Contribute to Plant Photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 2007;143(3):1163–72.
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng X, Blázquez MA. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J.* 2008;53(2):324–35.
- Allen BL, Taatjes DJ. The Mediator complex: A central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(3):155–66.
- Archacki R, Buszewicz D, Sarnowski TJ, Sarnowska E, Rolicka AT, Tohge T, Fernie A, Jikumaru Y, Kotlinski M, Iwanicka-Nowicka I, Kalisiak K, Patryn J, Halibart-Puzio J, Kamiya Y, Davis S, Koblowska M, Jerzmanowski A. BRAHMA ATPase of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Acts as a Positive Regulator of Gibberellin-Mediated Responses in Arabidopsis. *PLoS One.* 2013;8(3).
- Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, Wingsle G, Björklund S. Purification of a Plant Mediator from Arabidopsis thaliana Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Mol Cell.* 2007;26(5):717–29.
- Carbonell A, Takeda A, Fahlgren N, Johnson SC, Cuperus JT, Carrington JC. New Generation of Artificial MicroRNA and Synthetic Trans-Acting Small Interfering RNA Vectors for Efficient Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2014;165(1):15–29.
- Chen R, Jiang H, Li L, Zhai Q, Qi L, Zhou W, Liu X, Li H, Zheng W, Sun J, Li C. The Arabidopsis Mediator Subunit MED25 Differentially Regulates Jasmonate and Abscisic Acid Signaling through Interacting with the MYC2 and ABI5 Transcription Factors. *Plant Cell.* 2012;24(7):2898–916.
- Cheng H. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development.* 2004;131(5):1055–64.
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol.* 2014;217(1):67–75.
- Daviere J-M, Achard P. Gibberellin signaling in plants. *Development.* 2013;140(6):1147–51.
- De Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature.* 2008;451:480-484.
- Dill A. The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation. *Plant Cell Online.* 2004;16(6):1392–405.

Dill A, Jung HS, Sun TP. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):14162–7.

Dill A, Sun TP. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2001;159(2):777–85.

Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. DELLAs Function as Coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in Regulation of Gibberellin Homeostasis and Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2014;26(7):2920–38.

Gallego-Bartolome J, Minguet E, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadi D, Blázquez MA. Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(33):13446–51.

Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadi D. Transcriptional diversification and functional conservation between della proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol*. 2010;27(6):1247–56.

Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, Powers SJ, Gong F, Phillips A, Heden P, Sun TP, Thomas S. Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online*. 2006;18(12):3399–414.

Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y. The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an “Inhibitor of an Inhibitor” Enables Flexible Response to Fluctuating Environments. *Plant Cell Online*. 2009;21(5):1328–39.

Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J. 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*. 2001;13(5):999–1010.

Jiang C, Fu X. GA action: turning on de-DELLA repressing signaling. *Curr Opin Plant Biol*. 2007;10(5):461–5.

Kanei M, Horiguchi G, Tsukaya H. Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in *Arabidopsis* by ANGUSTIFOLIA3 and HANABA TARANU. *Development*. 2012;139(13):2436–46.

Koschubs T, Seizl M, Larivière L, Kurth F, Baumli S, Martin DE, Cramer P. Identification, structure, and functional requirement of the Mediator submodule Med7N/31. *EMBO J*. 2009;28(1):69–80.

Larivière L, Plaschka C, Seizl M, Petrotchenko E V., Wenzek L, Borchers CH, Cramer P. Model of the Mediator middle module based on protein cross-linking. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(20):9266–73.

Li X. Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*. *Bio-Protocol*. 2013;53:1689-1699.

- Locascio A, Blázquez MA, Alabadí D. Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol.* 2013;54(8):1229–37.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Mathur S, Vyas S, Kapoor S, Tyagi AK. The Mediator Complex in Plants: Structure, Phylogeny, and Expression Profiling of Representative Genes in a Dicot (*Arabidopsis*) and a Monocot (*Rice*) during Reproduction and Abiotic Stress. *Plant Physiol.* 2011;157(4):1609–27.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature.* 2008;456:459-463.
- Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiol.* 1962;15:473-497.
- Nambara E, Akazawa T, McCourt P. Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazole on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 1991;97:736-738
- Olszewski N, Sun T-P, Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell.* 2002;14 Suppl(Figure 1):S61–80.
- Park J, Nguyen KT, Park E, Jeon J-S, Choi G. 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.* 2013;25(3):927–43.
- Peng J, Carol P, Richards D, King K, Cowling R, Murphy G, Harberd N. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 1997;11(23):3194–3205.
- Schiestl RHR, Gietz RDR. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Science.* 1989;299:1896-1898.
- Schwechheimer C. Gibberellin Signaling in Plants – The Extended Version. *Front Plant Sci.* 2012;2(January):1–7.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T. The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell.* 1998;10(2):155–69.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP. Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the *RGA* protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2001;13(7):1555–66.
- Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 [Epub ahead of print]
- Stavang JA, Pettersen RI, Wendell M, Solhaug KA, Junntila O, Moe R, Olsen JE. Thermoperiodic growth control by gibberellin does not involve changes in photosynthetic or respiratory capacities in pea. *J Exp Bot.* 2010;61(4):1015–29.



Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlauff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Tosköz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell*. 2005;122(6):957–68.

Sun TP. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol*. 2011;21(9):R338–45.

Sun T, Gubler F. Molecular Mechanism of Gibberellin Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55(1):197–223.

Tyler L. DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2004;135(2):1008–19.

Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*. 2005;437(7059):693-8.

Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. *Plant Cell Online*. 2007;19(7):2140–55.

Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2007;58:183-198.

Wang C, Du X, Mou Z. The Mediator Complex Subunits MED14, MED15, and MED16 Are Involved in Defense Signaling Crosstalk in Arabidopsis. *Front Plant Sci*. 2016;7(December):1–7.

Wen C-K, Chang C. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*. 2002;14(1):87–100.

Wild M, Daviere J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P. The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell*. 2012;24(8):3307–19.

Wild M, Achard P. The DELLA protein RGL3 positively contributes to jasmonate/ethylene defense responses. *Plant Signal Behav*. 2013;8(4):e23891.

Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EMN, Maier A, Scheichheimer C. The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of Arabidopsis. *Plant Cell Online*. 2007;19(4):1209–20.

Xu R, Li Y. Control of final organ size by Mediator complex subunit 25 in Arabidopsis thaliana. *Development*. 2011;138(20):4545–54.

Yang S, Carter SA, Cole AB, Cheng N, Nelson RS. 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*. 2004;101(16):6297–302.

Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP. Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007;19(10):3037–57.