

Caracterización de mutantes *med31* en *Arabidopsis thaliana*

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO 2015-2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL**

AUTOR

Lluís Carles Martínez Centelles
Valencia, septiembre de 2016

TUTORA ACADÉMICA

M^a Pilar López Gresa

TUTOR EXPERIMENTAL

David Alabadí Diego

RESUMEN

El complejo Mediator es un conglomerado de más de 31 subunidades proteicas con un papel destacado en los organismos eucariotas en la regulación de la RNA polimerasa II (RNA-Pol II) mediante asociación con factores de transcripción. La mayor parte de estudios realizados acerca de este complejo se han llevado a cabo en levadura y en humanos, sin embargo, son pocos los realizados en plantas. La importancia de cada una de las subunidades que conforman el complejo se determina mediante la caracterización de mutantes que carecen del gen que codifica para dicha subunidad. En este trabajo se exponen los efectos en *Arabidopsis thaliana* de la ausencia de la subunidad 31 del complejo Mediator (MED31) en el mutante *med31*. Para ello se ha hecho una caracterización preliminar de los fenotipos de desarrollo de este mutante en las primeras fases del crecimiento y en los órganos reproductivos. Todos estos fenotipos se restauran al sobreexpresar *Flag-MED31* en el mutante *med31*. Además, se ha probado la hipótesis de que los fenotipos observados se deban, al menos en parte, a la expresión alterada de los genes *HANABA TARANU* y *ANGUSTIFOLIA3*, cuyos mutantes presentan fenotipos parecidos a los de *med31*.

Palabras clave: Complejo Mediator, MED31, Arabidopsis thaliana, fenotipo.

ABSTRACT

The Mediator complex is a conglomerate composed by over 31 protean subunits with a role in eukaryotic organisms in RNA polymerase II (RNA-Pol II) regulation by associating with transcription factors. Most of the research about this complex has been done in yeast and humans, however, there is little done in plants. The importance of each of the subunits that shape the complex is determined by characterizing mutants that lack the coding gene for one of them. In this study, the effects of the absence of subunit 31 of Mediator complex (MED31) in *Arabidopsis thaliana* mutant *med31* are shown. In order to do that, a preliminary characterization of developmental phenotypes of this mutant has been carried out in early stages of the development and in reproductive organs. All these phenotypes are corrected when overexpressing *Flag-MED31* in *med31* mutant. In addition, the hypothesis that the observed phenotypes are due, at least in part, to the altered expression of genes *HANABA TARANU* and *ANGUSTIFOLIA3*, whose mutants exhibit similar phenotypes to those of *med31*, has also been tested.

Keywords: Mediator complex, MED31, Arabidopsis thaliana, phenotype

Alumno: Lluís Carles Martínez Centelles
Valencia, septiembre de 2016

Tutora académica: Dra. M^a Pilar López Gresa

Tutor experimental: Dr. David Alabadí Diego

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y mi yaya, que siempre han estado detrás de mí para empujarme hacia adelante en todo momento.

A David, por darme la oportunidad de trabajar en este mundo que he decidido que sea parte de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, porque de vosotros he aprendido muchísimo y por haber tenido que soportarme todo este tiempo.

A Marina, Edgar, Pablo, Guillem y Elena, mis compañeros y amigos sin los que la carrera no habría sido lo mismo.

A todos vosotros, os estaré siempre agradecido.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1 Introducción | 1 |
| 2 El complejo Mediator | 1 |
| 2.1 Estructura y composición del Mediator | 1 |
| 2.2 Funciones del Mediator | 3 |
| 2.3 Estudios sobre el Mediator en animales..... | 4 |
| 2.4 Estudios sobre el Mediator en <i>Arabidopsis thaliana</i> | 5 |
| OBJETIVO | 6 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 1 Materiales biológicos y condiciones de crecimiento | 7 |
| 1.1 Material vegetal: <i>Arabidopsis thaliana</i> | 7 |
| 1.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 7 |
| 1.2.1 Método “Floral-dip” | 7 |
| 1.2.2 Condiciones de cultivo | 7 |
| 1.2.3 Selección de transformadas | 8 |
| 1.3 <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 1.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 1.4.1 Electroporación de <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 1.4.2 Condiciones de cultivo | 8 |
| 1.4.3 Recolección de minipreps | 9 |
| 1.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 9 |
| 1.6 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 9 |
| 1.6.1 Electroporación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 9 |
| 1.6.2 Condiciones de cultivo | 10 |
| 1.6.3 Cultivo de preinoculación | 10 |
| 2 Técnicas de Biología Molecular | 10 |
| 2.1 Análisis por PCR..... | 10 |
| 2.1.1 Extracción de ADN genómico | 10 |
| 2.1.2 Preparación de la PCR | 10 |
| 2.2 Construcciones de ADN..... | 11 |
| 2.2.1 Aislamiento de MED31 | 11 |
| 2.2.2 Vector de entrada..... | 12 |
| 2.2.3 Inserción en el vector de entrada | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4 Vector de expresión | 13 |
| 2.2.5 Inserción en el vector de expresión..... | 13 |
| 2.3 Análisis del nivel de expresión | 14 |
| 2.3.1 Extracción de ARN total..... | 14 |
| 2.3.2 Síntesis de cDNA | 14 |
| 2.3.3 PCR semicuantitativa..... | 15 |
| 2.3.4 PCR cuantitativa “real-time” | 16 |
| 3 Técnicas de microscopía | 17 |
| 3.1 Tratamiento con hidrato de cloral | 17 |
| 3.2 Instrumental empleado..... | 17 |
| 3.2.1 Lupa | 17 |
| 3.2.2 Microscopio | 17 |
| RESULTADOS..... | 18 |
| 1 Genotipado de las líneas de inserción SALK en el locus <i>MED31</i> | 18 |
| 2 Análisis fenotípico de los mutantes <i>med31</i>: fenotipos moleculares..... | 19 |
| 3 Análisis de los niveles de expresión de <i>MED31</i> | 20 |
| 4 Análisis fenotípico de los mutantes <i>med31</i>: morfología | 20 |
| 4.1 Fenotipos vegetativos | 20 |
| 4.1.1 Aspecto general de las plántulas..... | 20 |
| 4.1.2 Parte aérea | 21 |
| 4.1.3 Longitud de raíces..... | 22 |
| 4.1.4 Patrón vascular en cotiledones..... | 23 |
| 4.1.5 Aspecto general de las plantas adultas..... | 25 |
| 4.2 Fenotipos reproductivos | 26 |
| 4.2.1 Flores | 26 |
| 5 Análisis de los niveles de expresión de posibles dianas | 27 |
| 6 Análisis de la complementación de <i>med31</i> | 27 |
| DISCUSIÓN | 30 |
| CONCLUSIONES..... | 32 |
| BIBLIOGRAFÍA | 33 |

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----------|
| Figura 1.1: Estructura y organización del complejo Mediator de levaduras..... | 2 |
|--|----------|

Figura 1.2: Cambios estructurales del complejo Mediator y las distintas conformaciones que adquiere en función del elemento con el que interactúa.3

Figura 1.3: Interacción del complejo Mediator con la región promotora, la RNA-Pol II y el PIC (IIA, IIB, IID, IIE, IIF y IIH).4

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de individuos mutantes. 11

Figura 3.2: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia de *MED31*. 11

Figura 3.3: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia del cDNA de *UBQ10*. 15

Figura 3.4: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR de los cDNA de *MED31*, *AN3* y *HAN* respectivamente. 16

RESULTADOS

Figura 4.1: Esquema de la estructura de *MED31* con los sitios de las inserciones de T-DNA y los oligonucleótidos empleados en el genotipado..... 18

Figura 4.2: Resultado de la electroforesis en gel de agarosa 1% de las PCR de genotipado... 19

Figura 4.3: Resultado de la PCR semicuantitativa..... 19

Figura 4.4: Niveles de expresión de *MED31*, *AN3*, y *HAN*..... 20

Figura 4.5: Vista aérea de las plántulas. 21

Figura 4.6: Vista de las plántulas..... 21

Figura 4.7: Vista detallada de las plántulas..... 22

Figura 4.8: Vista de las raíces de las distintas líneas..... 23

Figura 4.9: Patrones vasculares de WT y *med31-1* 24

Figura 4.10: Patrones vasculares de *med31-2* 24

Figura 4.11: Vista de plantas adultas 25

Figura 4.12: Vista detallada de flores..... 26

Figura 4.13: Vista de plántulas transformadas con *35S::Flag* de la generación T1 27

Figura 4.14: Comparación de plántulas transformadas con *35S::Flag* de la generación T3 en fondo *med31-2* con WT y *med31-2*. 28

Figura 4.15: Comparación de plantas adultas transformadas con *35S::Flag* de la generación T3 en fondo *med31-2* con WT 29

TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1: Reactivos empleados en la PCR para el genotipado de individuos mutantes 11

Tabla 3.2: Perfil térmico empleado para el genotipado de individuos mutantes 11

| | |
|---|----|
| Tabla 3.3: Reactivos empleados en la PCR para amplificar la secuencia de <i>MED31</i> . | 12 |
| Tabla 3.4: Perfil térmico empleado para amplificar la secuencia de <i>MED31</i> . | 12 |
| Tabla 3.5: Reactivos empleados en la reacción de ligación de <i>MED31</i> en el vector de entrada. | 13 |
| Tabla 3.6: Reactivos empleados en la reacción de ligación de <i>MED31</i> en el vector de expresión. | 13 |
| Tabla 3.7: Reactivos empleados para la alineación de los oligonucleótidos dT con el ARNm molde. | 14 |
| Tabla 3.8: Reactivos empleados en la reacción de síntesis de cDNA genómico. | 14 |
| Tabla 3.9: Reactivos empleados en la PCR para amplificar la secuencia del cDNA de <i>MED31</i> y de <i>UBQ10</i> . | 15 |
| Tabla 3.10: Perfil térmico empleado para amplificar la secuencia del cDNA de <i>UBQ10</i> . | 15 |
| Tabla 3.11: Reactivos empleados en la RT-qPCR. | 16 |

RESULTADOS

| | |
|---|----|
| Tabla 4.1: Frecuencia de fenotipos de <i>med31-2</i> . | 22 |
| Tabla 4.2: Longitud media de la raíz primaria de las distintas líneas. | 23 |
| Tabla 4.3: Número de órganos florales. | 26 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| Car | Carbenicilina |
| CCNC | Ciclina C |
| CDK8 | Kinasa dependiente de ciclina-8 |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| C _T | <i>Cycle threshold</i> , ciclo umbral |
| dT | Desoxitimidina |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| F | <i>Forward</i> , Directo |
| Gnt | Gentamicina |
| Kan | Kanamicina |
| L/B | <i>Left border</i> , Borde izquierdo |
| LB | Medio Luria-Bertani |
| LR | Reacción de ligación |
| MS | Medio Murashige-Skoog |
| p/v | Peso/volumen |
| 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 |
| Rif | Rifampicina |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-qPCR | <i>Real-time quantitative PCR</i> , PCR cuantitativa a tiempo real |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| Spm | Espectinomicina |
| T-DNA | ADN de transferencia |
| TE | Tampón Tris-EDTA |
| TF | Factor de transcripción |
| WT | <i>Wild type</i> , Tipo silvestre |

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

En los genomas existen regiones de ADN con papel regulador conocidas como promotores e intensificadores. Estas regiones presentan motivos que permiten la unión de uno o varios factores de transcripción (TFs) que regulan el proceso de transcripción. Los TFs presentan un dominio específico de unión al ADN y otros dominios que les permiten interactuar con reguladores generales de la transcripción. El complejo Mediator (o Mediador) es un ejemplo de regulador general activado por los TFs.

2. El complejo Mediator

2.1 Estructura y composición del Mediator

Identificado en levaduras en primer lugar (Kelleher *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1993), el Mediator está compuesto por 21 subunidades, las cuales se conservan en el resto de eucariotas. No obstante, en mamíferos y otros eucariotas superiores se han encontrado hasta 31.

Las 21 subunidades de levadura se reparten en tres módulos (Figura 1.1): la cabeza, formada por MED6, MED8, MED11, MED17, MED18, MED19, MED20 y MED22; el centro, formado por MED1, MED4, MED7, MED9, MED10, MED21 y MED31, y la cola, formada por MED2, MED3, MED5, MED14, MED15 y MED16.

Por otro lado, las subunidades MED12 y MED13 forman parte del módulo quinasa dependiente de ciclina 8 (CDK8), que a su vez está formado por otras dos subunidades, la CDK8 y la ciclina-C (CCNC). Este módulo es capaz de unirse reversiblemente al Mediator con MED13 como enlace, estableciendo una interacción que activa el dominio quinasa de CDK8. Al parecer la fosforilación por esta quinasa modula la actividad de los TFs y/o dirige la degradación de éstos en el proteasoma (Akoulitchev *et al.*, 2000; Alarcón *et al.*, 2009; Bancerek *et al.*, 2013).

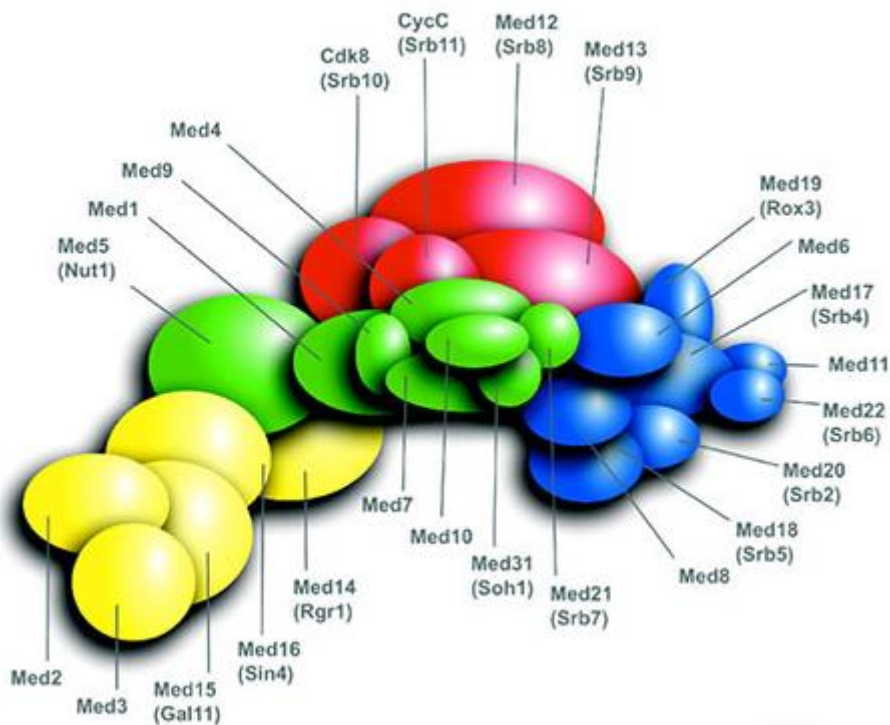


Figura 1.1: Estructura y organización del complejo Mediator de levaduras. En azul la cabeza, en verde el centro, en amarillo la cola y en rojo el módulo CDK8. Fuente: <http://geiselmed.dartmouth.edu/myers/research/> (Consultado el 8-7-2016).

Una característica remarcable del Mediator es que no siempre está formado por las mismas subunidades. Si bien existe un “core” constante de subunidades que siempre están presentes, la presencia de otras va a depender del contexto fisiológico en el que esté participando el complejo y por tanto de los TFs con los que interactúe (Kulak *et al.*, 2014). El proceso mediante el que se produce la adición o pérdida de subunidades es todavía un campo poco explorado. Este dinamismo conformacional no sólo se da a nivel de presencia o ausencia de subunidades, sino también a nivel estructural. Tanto en levadura como en humanos se ha observado una gran flexibilidad estructural en el Mediator cuando se une a otras proteínas o complejos proteicos (Figura 1.2) (Ebmeier y Taatjes, 2010).

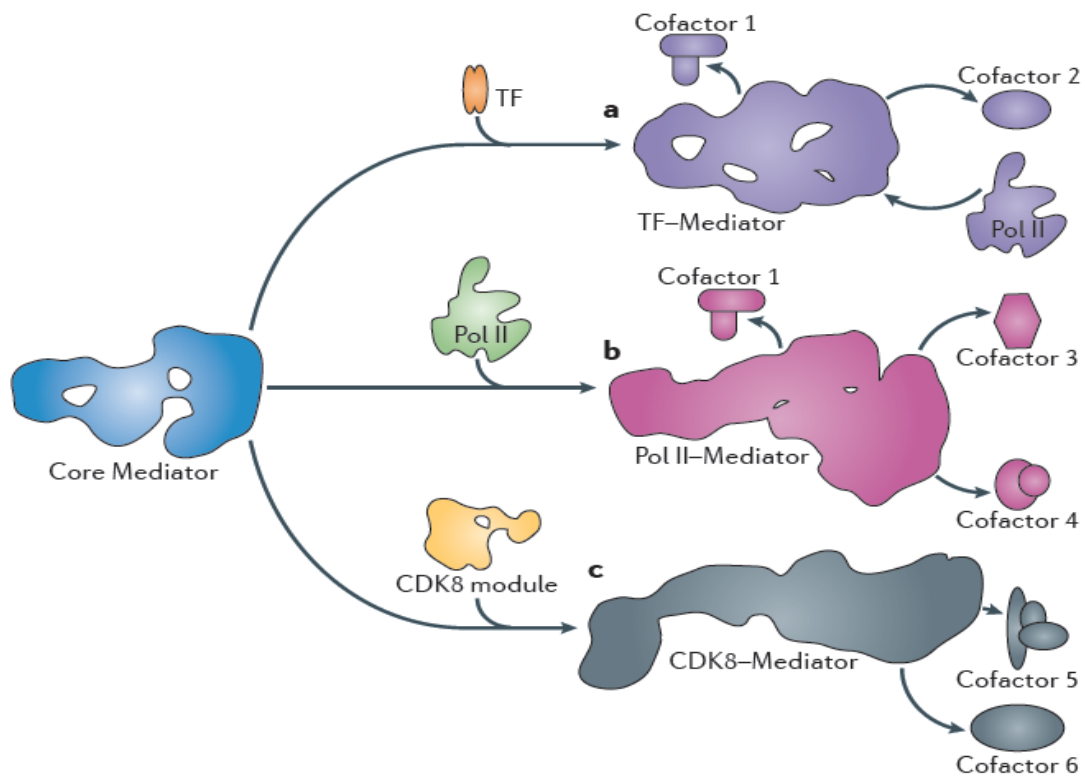


Figura 1.2: Cambios estructurales del complejo Mediator y las distintas conformaciones que adquiere en función del elemento con el que interactúa. (Allen y Taatjes, 2015)

2.2 Funciones del Mediator

El Mediator se considera parte fundamental de la maquinaria del proceso transcripcional, al observarse en levaduras asociado a los promotores de prácticamente todos los genes que codifican proteínas y requerido para la transcripción tanto basal como regulada por activadores (Holstege *et al.*, 1998; Thompson y Young, 1995). La función básica del Mediator es regular la transcripción mediante interacciones proteína-proteína con los TFs unidos a ADN, uniéndose un tipo de TF específico a cada subunidad del Mediator. Estas interacciones son interpretadas como señales moduladoras que llegan hasta la RNA polimerasa II (RNA-Pol II) actuando como una especie de puente que comunica los TFs con la RNA-Pol II. Este papel lo realiza gracias a que participa activamente en la formación del complejo de pre-iniciación (PIC) de la transcripción, que además incluye otros reguladores generales de la misma. Se piensa que su papel en este proceso es actuar como un soporte alrededor del cual se ensambla el PIC y que a la vez mantiene la comunicación entre los TFs unidos a ADN, la RNA-Pol II y el propio PIC (Grunberg y Hahn, 2013). Gracias a su gran tamaño es probable que promueva una formación estable del PIC al permitir una interacción directa con múltiples proteínas (Figura 1.3).

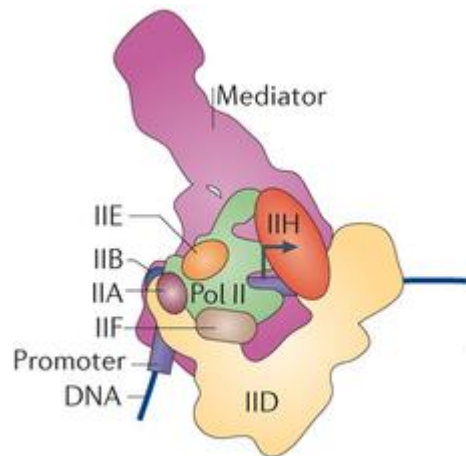


Figura 1.3: Interacción del complejo Mediator con la región promotora, la RNA-Pol II y el PIC (IIA, IIB, IID, IIE, IIF y IIH). (Allen y Taatjes, 2015)

Además, el Mediator participa en otros aspectos fundamentales relacionados con la transcripción en los que colabora estrechamente con la RNA-Pol II, como la elongación transcripcional (Conaway y Conaway, 2013) o la organización espacial de la cromatina, creando estructuras como los bucles génicos que parecen ser fundamentales para coordinar la transcripción en la célula (Plank y Dean, 2014).

Muchas funciones básicas del Mediator se han conservado entre levadura y humanos, como la unión del Mediator a TFs y al dominio C-terminal de la RNA-Pol II, aunque a lo largo de la evolución eucariota la composición, secuencias y función del Mediator se han diversificado (Poss *et al.*, 2013), probablemente debido en parte a la gran variedad de TFs que se unen al ADN en eucariotas superiores.

2.3 Estudios sobre el Mediator en animales

Gran parte de la información funcional del Mediator de animales se basa en la caracterización fenotípica de líneas celulares o animales mutantes en los que falta una subunidad del Mediator o presentan mutaciones en las secuencias de éstas. En humanos se están identificando cada vez más enfermedades relacionadas con estos aspectos, en especial patologías relacionadas con el desarrollo temprano y con el cáncer que tienen que ver con la subunidad MED12.

Mediante secuenciación de exomas, se ha constatado que MED12 es una de las subunidades que es habitual encontrar mutada en varios tipos de tumores observados en cáncer de próstata. Estas mutaciones afectan a la interacción entre el Mediator y el módulo CDK8, de modo que la actividad kinasa de este último se ve disminuida (Barbieri *et al.*, 2013; Kämpjärvi *et al.*, 2015).

También se ha observado en ratones que la expresión baja o nula de *MED12* daba como resultado embriones incapaces de desarrollarse más allá del décimo día y presentaban severos

problemas en la formación del sistema nervioso y malformaciones cardíacas, junto con la disrupción de la vía de señalización por WNT (Rocha *et al.*, 2013).

Otro de los genes identificados en fenotipos relacionados con la detención del desarrollo de embriones es *MED14*. En pez cebra se identificaron codones de parada prematuros en el gen de *MED14* en varios mutantes con defectos en corazón, cerebro y ausencia de elongación de la aleta pectoral. Estudios en planaria identificaron que, al parecer, *MED14* está involucrado en el mantenimiento de las células madre y las células progenitoras, sin afectar a las células ya diferenciadas (Burrows *et al.*, 2015).

En definitiva, estos resultados apuntan que Mediator tiene papeles importantes en desarrollo de animales y en el control del ciclo celular.

2.4 Estudios sobre el Mediator en *Arabidopsis thaliana*

Los estudios en *Arabidopsis thaliana* no son tan abundantes, pero revelan la gran diversidad de funciones en la que el Mediator está implicado y la importancia que representa en el desarrollo de la planta.

Se ha descrito que las subunidades *MED8* y *MED25* juegan un papel en la regulación del tamaño final de los órganos de la planta (Xu y Li, 2009; Xu y Li, 2013). Por un lado, *MED25* actúa como un limitador de la proliferación y la expansión celular, posiblemente funcionando como un regulador de estos procesos en la transcripción. Por otro lado, *MED8* fomenta que se dé la situación contraria pero no tiene una función antagonica a la de *MED25*, ya que ambos actúan de modo independiente en el proceso mediante el control de genes diana diferentes.

Además, *MED25* también ha sido descrito como un importante componente de la defensa basal al ser requerido para la síntesis de ácido jasmónico, donde *MED8* también participa, y en la resistencia a hongos necrotróficos, en la cual también está involucrado *MED21*. Otras subunidades con funciones en procesos defensivos son *MED15*, en la síntesis de ácido salicílico, y *MED16*, que participa en la tolerancia al frío y a la sequía.

En el caso de *MED16*, también se ha revelado que participa en la capacidad de la planta para tomar hierro del medio (Zhang *et al.*, 2014). En concreto, *MED16* facilita la interacción entre los TFs FIT e IB que son claves en el control de genes implicados en la homeostasis del hierro, como *FRO2* e *IRT2*.

La floración y la identidad de los órganos florales son controlados por *MED18* a través de los genes *FLC*, que participa como un importante regulador negativo de la floración en respuesta a estímulos endógenos y exógenos, y *AG*, que determina la identidad de los estambres y los carpelos (Zheng *et al.*, 2013).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es realizar un análisis inicial del papel que juega la subunidad MED31 en *Arabidopsis thaliana*.

Nuestro interés en MED31 radica en dos aspectos: (i) fue identificado en el laboratorio como una proteína que interacciona físicamente con las proteínas DELLA, que son reguladores negativos de la señalización por giberelinas, y cuya caracterización funcional representa el principal tema de investigación del grupo; y (ii) su función es prácticamente desconocida, a pesar de ser una de las subunidades conservadas en el complejo.

Para ello analizaremos el fenotipo de dos alelos mutantes *med31*, prestando atención a la morfología de las plántulas, flores y plantas adultas, así como a los niveles de mensajeros de genes cuya expresión se pueda ver regulada por MED31. También prepararemos líneas transgénicas en las que expresaremos MED31 etiquetado con el epitopo FLAG en un fondo mutante *med31* con el fin de (i) confirmar que los fenotipos del mutante se deben a la deficiencia de MED31, y (ii) obtener herramientas que nos permitan investigar aspectos moleculares de MED31 y su relación con las proteínas DELLA en el futuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Materiales biológicos y condiciones de crecimiento*

1.1 *Material vegetal: Arabidopsis thaliana*

La planta *Arabidopsis thaliana* es un organismo modelo importante para la identificación de genes y la determinación de sus funciones. Su uso es muy extendido gracias a las ventajas que ofrece: su pequeño tamaño, tiempo corto de desarrollo, gran número de descendientes y un genoma nuclear relativamente pequeño y secuenciado.

En este trabajo empleamos plantas de la accesión Columbia-0 (Col-0) como silvestre (WT) y dos líneas SALK (*med31-1* y *med31-2*), conseguidas por la inserción de un T-DNA que interrumpe la secuencia del gen de MED31 (ver descripción en Resultados).

Las semillas se esterilizaron con dos lavados de 5 min: el primero con una solución de etanol 70% y Triton X-100 0,05% y el segundo con etanol 96%. 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.

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.

1.2 *Transformación de Arabidopsis thaliana*

1.2.1 *Método “Floral-dip”*

Una vez se consiguió el cultivo de preinoculación saturado, se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm. El *pellet* se resuspendió en una solución de sacarosa 5% y Silwet (240 µL 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 *Agrobacterium tumefaciens* y adquirirían el T-DNA con el inserto construido. Las líneas transformadas fueron WT y *med31-2*.

1.2.2 *Condiciones de cultivo*

Las plantas inoculadas se taparon y se dejaron a 22°C durante unas 18 h para facilitar el crecimiento de *Agrobacterium 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 que contendrían el inserto de T-DNA.

1.2.3 Selección de transformadas

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 *Agrobacterium tumefaciens* respectivamente.

La siguiente generación (T2) se sembró en medio MS con BASTA 0.01% (p/v) y se seleccionaron aquellas líneas que presentaran una proporción 3:1 de individuos tolerantes/sensibles al herbicida. Con esto se conseguía seleccionar aquellas plantas que sólo tuvieran una copia del T-DNA insertada en su genoma, siguiendo las leyes mendelianas de la herencia genética.

La tercera generación (T3) también se sembró en medio MS con BASTA 0.01% (p/v) y esta vez se seleccionaron las líneas que presentasen un 100% de tolerancia a BASTA. De esta forma se seleccionaban las líneas homocigotas para el locus donde el T-DNA se haya insertado.

1.3 Escherichia coli

La enterobacteria *Escherichia coli* es el organismo empleado para la construcción y propagación clonal de los distintos vectores usados. La cepa cultivada fue DH5 α , 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 durante 16 h y en agitación si eran líquidos.

1.4 Transformación de Escherichia coli

1.4.1 Electroporación de Escherichia coli

Tras finalizar la construcción de los diferentes vectores se procedió a la transformación de células de *Escherichia coli* para la clonación de los mismos.

Para ello, se añadieron 2 μ L de la solución donde estaba el plásmido a una alícuota de 50 μ L de células de la cepa DH5 α . 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 μ L de medio SOC (o 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.

1.4.2 Condiciones de cultivo

Las células se sembraron en LB agar al que se añadía un antibiótico en función de la resistencia del vector (espectinomicina (Spm) o kanamicina (Kan) 0,01% (p/v)) y se dejaron incubando durante 18h para seleccionar aquellas colonias que se hubieran transformado. A partir de las colonias resistentes se inocularon cultivos líquidos de 3 mL con el fin de aislar ADN del plásmido correspondiente.

1.4.3 Recolección de minipreps

Después de la incubación de los cultivos líquidos se procedió a la extracción y purificación de los vectores clonados mediante el kit de purificación E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini I de Omega, basado en la purificación del ADN plasmídico por columna tras una lisis alcalina. En primer lugar, se centrifugan los cultivos a 13000 rpm durante 1 minuto y se elimina el sobrenadante para resuspender el *pellet* en 250 μ L de solución I mezclando en el vórtex. A continuación, se añaden 250 μ L de solución II, mezclando suavemente, y 350 μ L de solución III, agitando los tubos hasta formar un precipitado floculante, para después centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se introduce en una minicolumna con una membrana que retiene el ADN plasmídico y filtra los demás componentes del sobrenadante. Primero se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante recogido se desecha. A continuación, se añaden 500 μ L de tampón HBC y se vuelve a centrifugar. Se descarta el sobrenadante y después se añaden 700 μ L de tampón de lavado de ADN y se centrifuga de nuevo. El sobrenadante se desecha otra vez y se centrifuga la columna vacía durante 2 minutos. Por último, se añade 40 μ L de tampón de elución a la columna, pasándola a un tubo Eppendorf y se centrifuga 1 minuto para eluir el plásmido retenido en la columna. El plásmido eluido es cuantificado posteriormente con NanoDrop.

1.5 *Agrobacterium tumefaciens*

La proteobacteria *Rhizobium radiobacter* (más conocida como *Agrobacterium tumefaciens*) se empleó como vector para la transformación de los individuos de *Arabidopsis*, ya que es capaz de integrar fragmentos de ADN en el genoma de plantas en locus aleatorios. Se usó la cepa C58, apta para ser transformada por electroporación y con resistencias a los antibióticos rifampicina (Rif) y gentamicina (Gnt).

El medio en donde se cultivaba es el mismo que en el caso de *Escherichia coli*. Tras la siembra los cultivos se dejaban a 28°C durante 40 h, si eran sólidos, y 18 h en agitación si eran líquidos.

1.6 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

1.6.1 Electroporación de *Agrobacterium tumefaciens*

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 gen de interés a *Arabidopsis*.

Para la transformación se añadieron 2 μ L de plásmido a una alícuota de 50 μ L 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 μ L de medio SOC (o LB líquido) y se mantienen durante 2 h a 28°C en agitación para que expresen los genes de resistencia a antibiótico del vector que portan.

1.6.2 Condiciones de cultivo

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 18h para seleccionar las colonias que se hubieran transformado. Se seleccionaron aquellas colonias que hubieran crecido para inocularlas en 3 mL de LB líquido con los antibióticos respectivos y se volvían a incubar, esta vez unas 18 h.

1.6.3 Cultivo de preinoculación

A partir de los cultivos líquidos se preparó el cultivo para realizar la inoculación de células de *Agrobacterium tumefaciens* en individuos de *Arabidopsis*. El cultivo consistió en LB líquido con los antibióticos necesarios al 0.01% (p/v). Se añadió 1 mL de células a 250 mL de medio. El cultivo se dejó a 28°C en agitación durante unas 18 h.

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1 Análisis por PCR

2.1.1 Extracción de ADN genómico

Como molde para las PCR se usó ADN genómico extraído de plántulas enteras o de hojas de plantas jóvenes. La extracción se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Edwards *et al.* (1991). En primer lugar, se machaca el tejido en un tubo Eppendorf sin tampón, añadiendo a continuación 400 µL de tampón de extracción (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) y mezclando en un vórtex durante 5 segundos. Después se centrifuga el extracto a 13000 rpm durante 1 minuto y se transfieren 300 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, donde se mezcla con 300 µL de isopropanol para facilitar la precipitación del ADN. Se deja incubar a temperatura ambiente 2 minutos y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos. Por último, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 100 µL de TE 1x.

2.1.2 Preparación de la PCR

Una vez obtenido el ADN genómico de las distintas líneas de *Arabidopsis*, se procedió a realizar una PCR para genotiparlas, basándose en la presencia/ausencia de fragmentos amplificados para distinguirlas. Se emplearon dos pares de oligonucleótidos: el primero, formado por MED31F-59 como directo o *forward* y MED31R+544 como reverso, amplificaba un fragmento del inicio de la secuencia de *MED31* y el otro, formado por LBb1.3 como directo y MED31R+544 como reverso, amplificaba un fragmento que comenzaba en el borde izquierdo (L/B) del T-DNA insertado en la secuencia de *MED31*. El oligonucleótido LBb1.3 fue amablemente cedido por el Dr. David Esteve (IBMCP). El diseño de los oligonucleótidos viene descrito en Resultados.

MED31F-59: 5'-GGTTCTTTTAAGACCGCTTCTTGTGG-3' Longitud: 26 pb; Tm: 69.1°C
 MED31R+544: 5'-CAAAATACCGATTCTGTGCCAGG-3' Longitud: 23 pb; Tm: 68.2°C
 Lbb1.3: 5'-ATTTTGCCGATTCGGAAC-3' Longitud: 19 pb; Tm: 63.6°C

Figura 3.1: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de individuos mutantes.

| | |
|-------------------------|-------------|
| ADN genómico | 1 µL |
| Tampón 5X | 10 µL |
| Oligonucleótido F 10 µM | 2 µL |
| Oligonucleótido R 10 µM | 2 µL |
| DNA polimerasa 50U/µL | 0.2 µL |
| Agua | Hasta 50 µL |

Tabla 3.1: Reactivos empleados en la PCR para el genotipado de individuos mutantes. La DNA polimerasa empleada fue MyTaq Red DNA (Bioline).

| Nº de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|--------------|-------------|--------|
| 1 | 94 °C | 1' |
| 30 | 94 °C | 10" |
| | 55 °C | 10" |
| | 72 °C | 25" |
| 1 | 72 °C | 7' |

Tabla 3.2: Perfil térmico empleado para el genotipado de individuos mutantes.

2.2 Construcciones de ADN

2.2.1 Aislamiento de MED31

Para poder elaborar las construcciones que contenían el fragmento de ADN con la secuencia codificante del gen de *MED31*, este fragmento se obtuvo mediante PCR usando como molde un "pool" de cDNAs que ya se tenía en el laboratorio y que se había obtenido de plántulas de *Arabidopsis silvestres* Col-0 de 7 días cultivados en luz continua.

MED31Fatg: 5'-ATGGCTTCGCCAGAGGAGATGG-3' Longitud: 22 pb; Tm: 72.5°C
 MED31R: 5'-TTATATACCTTCTTTCTCTTCTACG-3' Longitud: 27 pb; Tm: 66.5°C

Figura 3.2: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia de *MED31*.

| | |
|-------------------------|-------------|
| cDNA molde 50 ng/μL | 2 μL |
| Tampón 10X | 5 μL |
| dNTPs 10 mM | 1 μL |
| Oligonucleótido F 10 μM | 2.5 μL |
| Oligonucleótido R 10 μM | 2.5 μL |
| DNA polimerasa 50U/μL | 0.5 μL |
| Agua | Hasta 50 μL |

Tabla 3.3: Reactivos empleados en la PCR para amplificar la secuencia de *MED31*. La DNA polimerasa empleada fue ExTaq (Takara).

| Nº de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|--------------|-------------|--------|
| 1 | 94 °C | 2' |
| 30 | 94 °C | 30" |
| | 55 °C | 30" |
| | 72 °C | 1' |
| 1 | 72 °C | 10' |

Tabla 3.4: Perfil térmico empleado para amplificar la secuencia de *MED31*.

Para comprobar que el fragmento amplificado era el esperado, tras la PCR se preparó un gel de agarosa al 1% en donde se cargó el producto de PCR, en el que se llevaría a cabo una electroforesis para determinar el tamaño del fragmento amplificado.

2.2.2 Vector de entrada

El vector *pCR8* es un plásmido de 2817 pb que contiene los siguientes elementos: un gen de resistencia a Spm para la selección en cultivos bacterianos y los sitios de recombinación attL1 y attL2 para la transferencia del gen de interés mediante el método Gateway a un vector de expresión, entre éstos hay un sitio de corte del enzima de restricción *EcoRI*, en el cual se insertará el gen de interés, ya que el vector viene ya digerido por este enzima en el kit que se emplea para la inserción del gen de interés.

2.2.3 Inserción en el vector de entrada

Una vez amplificado, el fragmento de *MED31* se introdujo mediante topoisomerasas en el vector *pCR8*. Para ello se empleó el kit de clonaje *pCR8/GW/TOPO TA* (Thermo Fisher). El clonaje se basa en que la *Taq* polimerasa añade una adenina en los extremos 3'-OH. La acción la realiza la Topoisomerasa I unida covalentemente al vector linearizado, que presenta dos timinas sobresalientes en los extremos 3'-OH del mismo. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 25 minutos.

| | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Producto de PCR | 0,9 μL |
| Solución salina | 1 μL |
| pCR8 (5-10 ng/ μL) | 1 μL |
| Agua | Hasta 6 μL |

Tabla 3.5: Reactivos empleados en la reacción de ligación de *MED31* en el vector de entrada.

Para comprobar que la reacción de ligación se produjo correctamente, se realizó una digestión del vector ya clonado en *Escherichia coli* con los enzimas *PvuII* y *BamHI*. El resultado se analizó separando los fragmentos en un gel de agarosa al 1%.

2.2.4 Vector de expresión

Para los ensayos que requerían la transformación de *Arabidopsis* se empleó el vector *pEarleyGate 202*, un plásmido de 11775 pb que contiene los siguientes elementos: un gen de resistencia al antibiótico kanamicina (Kan), para la selección en cultivos bacterianos; un gen de resistencia al herbicida glufosinato (BASTA), para la selección en cultivos de plantas; un promotor y un terminador 35S, para sobreexpresar el gen de interés insertado; un epitopo N-FLAG y los sitios de recombinación attR1 y attR2 para la transferencia del gen de interés mediante el método Gateway, entre los cuales se sitúa el gen letal *ccdB* para que aquellas células que no hayan adquirido el gen de interés no crezcan. En este vector se incluía un inserto de cDNA de *MED31* fusionado en el extremo 5' al marcador *N-FLAG* y fue el que se empleó para la transformación de individuos *med31-2* y estudiar si la sobreexpresión de *MED31* era capaz de revertir el fenotipo de mutante a silvestre.

2.2.5 Inserción en el vector de expresión

A partir del vector de entrada pCR8 se realizó la reacción de ligación (LR) del inserto de *MED31* a los vectores de expresión mediante el método Gateway. Este método se basa en la recombinación génica para subclonar un fragmento de ADN en un vector de destino de forma más rápida y en un solo paso mediante los sitios de recombinación entre los cuales se inserta el gen de interés. La LR se realizó desde el vector de entrada al vector de expresión *pEarleyGate 202*.

| | |
|---|-----------------|
| <i>pCR8-MED31</i> (50 ng/ μL) | 1 μL |
| <i>pEarleyGate 202</i> | 1 μL |
| Tampón TE 1X | 6 μL |
| LR clonasa II | 2 μL |

Tabla 3.6: Reactivos empleados en la reacción de ligación de *MED31* en el vector de expresión.

La LR tuvo lugar durante 1 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.

Para determinar que la LR se había producido de forma satisfactoria se hizo una digestión del vector ya clonado en *E. coli* con los enzimas *BamHI* y *PstI*, que cortan en tres partes el

vector si el fragmento de MED31 se ha insertado en éste. El resultado se analizó separando los fragmentos en un gel de agarosa al 1%.

2.3 *Análisis del nivel de expresión*

2.3.1 *Extracción de ARN total*

El ARN total se obtuvo a partir de material vegetal congelado de cada una de las diferentes líneas. Para la extracción del ARN se empleó el kit NucleoSpin RNA Plant de Macherey-Nagel. En primer lugar, se añadió 350 µL de tampón RA1 mezclado con 3.5 µL de mercaptoetanol, esta mezcla lisa las células e inactiva las RNAsas. A continuación, el lisado se filtra por una columna centrifugando a 11000 rpm durante 1 minuto y seguidamente, se ajustan las condiciones de unión del RNA a una nueva columna añadiendo 350 µL de etanol 70%. Después, se pipetea el filtrado para retener el ARN, se centrifuga 30 segundos, se descarta el líquido recogido y se añaden 350 µL de tampón MBC. Se vuelve a centrifugar 1 minuto, se desecha el sobrenadante y se añaden 95 µL de la mezcla de DNasa para digerir el ADN. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se lava la membrana con 200 µL de tampón RAW2 y 600 de tampón RA3, centrifugando 30 segundos después de la adición y desechando el sobrenadante. Por último, se añaden 250 µL de tampón RA3 y se centrifuga durante 2 minutos, se desecha el sobrenadante y seguidamente se eluye el ARN en 30 µL de agua libre de RNAsas, centrifugando 1 minuto. El ARN recogido es cuantificado en el NanoDrop.

2.3.2 *Síntesis de cDNA*

A partir del ARN obtenido se sintetiza el cDNA mediante el kit 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 ARN mensajeros (ARNm) y en la segunda la síntesis propiamente dicha con la transcriptasa reversa PrimeScript.

| | |
|----------------------|-------------|
| Oligonucleótido dT | 1 µL |
| dNTPs | 1 µL |
| ARNm molde | 1 µg |
| Agua libre de RNAsas | Hasta 10 µL |

Tabla 3.7: Reactivos empleados para la alineación de los oligonucleótidos dT con el ARNm 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 ARNm molde y oligonucleótido dT | 10 µL |
| Tampón PrimeScript 5X | 4 µL |
| Inhibidor de RNAsas (40U/µL) | 0.5 µL |
| PrimeScript RTasa (200U/µL) | 2 µL |

Tabla 3.8: 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 minutos. El producto de la reacción se diluye en agua hasta los 100 µL y se guarda a -20°C.

2.3.3 PCR semicuantitativa

Una vez obtenido el cDNA a partir del ARN de cada una de las líneas de *Arabidopsis*, se procedió a realizar una PCR semicuantitativa en la que se amplificarán fragmentos de la secuencia de *MED31* de cada línea y de un gen control, en este caso *UBQ10*. Se determinará la cantidad relativa de producto obtenido comparando la intensidad de la banda de *MED31* con la del gen control a la luz UV. Para la amplificación de la secuencia del cDNA de *MED31* se emplearon los oligonucleótidos y el perfil térmico descritos en el apartado 2.2.1 de esta sección. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del cDNA de *UBQ10* fueron amablemente cedidas por el Dr. Miguel Ángel Blázquez (IBMCP).

UBQ10F: 5'-GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT-3' Longitud: 31 pb; Tm: 77.2°C

UBQ10R: 5'-CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG-3' Longitud: 32 pb; Tm: 67.9°C

Figura 3.3: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia del cDNA de *UBQ10*.

| | |
|-------------------------|-------------|
| cDNA | 1 µL |
| Tampón 10X | 5 µL |
| dNTPs 10 mM | 1 µL |
| Oligonucleótido F 10 µM | 2.5 µL |
| Oligonucleótido R 10 µM | 2.5 µL |
| DNA polimerasa 50U/µL | 0.5 µL |
| Agua | Hasta 50 µL |

Tabla 3.9: Reactivos empleados en la PCR para amplificar la secuencia del cDNA de *MED31* y de *UBQ10*. La DNA polimerasa empleada fue ExTaq (Takara).

| Nº de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|--------------|-------------|--------|
| 1 | 94 °C | 2' |
| 30 | 94 °C | 30" |
| | 64 °C | 30" |
| | 72 °C | 1' |
| 1 | 72 °C | 10' |

Tabla 3.10: Perfil térmico empleado para amplificar la secuencia del cDNA de *UBQ10*.

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa 1% para determinar el tamaño de los fragmentos por electroforesis y la cantidad relativa de producto amplificado.

2.3.4 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 ARNm), 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. Además, los resultados fueron validados estadísticamente mediante un T-test considerando un p-valor < 0,05.

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

Con esta técnica se pretende averiguar el nivel de expresión, no sólo de *MED31*, sino también de los genes *ANGUSTIFOLIA3 (AN3)* y *HANABA TARANU (HAN)*. 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 se dan anomalías que interfieran en la determinación de la cantidad de producto amplificado. En este caso el gen control es *EF1α*. De cada muestra de cDNA se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas y en cada PCR se realizó un control negativo.

| | |
|--|-----------------------------|
| MED31qRTf: 5'-GAAACAACAGACTGAAGCACATTCTAC-3' | Longitud: 27 pb; Tm: 64.9°C |
| MED31qRTTr: 5'-TTGAAGGTGCAACTGGTGGTT-3' | Longitud: 21 pb; Tm: 66.8°C |
| AN3qRTf: 5'-TAAATCTCCCCCTCCTTTTCG-3' | Longitud: 21 pb; Tm: 64.0°C |
| AN3qRTTr: 5'-AACTCCCGGAAATTGAATGT-3' | Longitud: 21 pb; Tm: 65.3°C |
| HANqRTf: 5'-AAGAACTACTGCGGCTACAGGAA-3' | Longitud: 23 pb; Tm: 65.0°C |
| HANqRTTr: 5'-CCCGTACTGGTCGGTTTGAA-3' | Longitud: 20 pb; Tm: 66.9°C |

Figura 3.4: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la RT-qPCR de los cDNA de MED31, AN3 y HAN respectivamente.

| | |
|-------------------------|-------------|
| cDNA | 1 µL |
| SYBR Premix + Dye | 10.4 µL |
| Oligonucleótido F 10 µM | 0.4 µL |
| Oligonucleótido R 10 µM | 0.4 µL |
| Agua | Hasta 20 µL |

Tabla 3.11: Reactivos empleados en la RT-qPCR.

3. Técnicas de microscopía

3.1 Tratamiento con hidrato de cloral

Para poder observar el patrón vascular de los cotiledones fue necesario blanquear las plántulas. Para ello se empleó un tratamiento con hidrato de cloral siguiendo el protocolo desarrollado por Franks *et al.* (2009).

Primero se fijó el tejido en una solución de 9 partes etanol y 1 ácido acético, sumergiendo las plántulas durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron dos lavados con etanol 90% de 30 minutos cada uno. Por último, se introdujo el tejido en la solución de hidrato de cloral (2.5 g de hidrato de cloral por mL de glicerol 30%) durante varias horas para el blanqueamiento del tejido. Tras este tratamiento, el tejido estaba preparado para que se observase el patrón vascular al microscopio.

3.2 Instrumental empleado

3.2.1 Lupa

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.

3.2.2 Microscopio

Se empleó el microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con cámara digital refrigerada DS-Ri 1 equipado de un sistema de epi-fluorescencia con filtros para visualizar FITC, Rodamina, calcofluor, DAPI y plata, y un sistema de contraste interferencial (DIC) y campo oscuro.

RESULTADOS

1. Genotipados de las líneas de inserción SALK en el locus MED31

El gen de *MED31* consta de 6 exones y 5 intrones y tiene una longitud de 1755 pb. Para poder identificar los individuos mutantes *med31-1* y *med31-2* y diferenciarlos de los WT se diseñó un par de oligonucleótidos sobre la región de *MED31*: uno directo o *forward* (MED31F-59) que alinea a 59 pb aguas arriba del codón de inicio y otro reverso (MED31R+544), a 544 pb aguas abajo del codón de inicio (Figura 4.1). Empleando esta combinación de oligonucleótidos en la PCR únicamente se amplificó el fragmento comprendido entre ellos solamente en individuos WT, ya que en los mutantes se encuentran los insertos de T-DNA en esta región, siendo el espacio entre oligonucleótidos mucho mayor, por lo que en las condiciones de la PCR no hubo tiempo suficiente para que este fragmento se amplificase.

En el caso de *med31-1* la inserción se encuentra en la región no traducida del extremo 5' (5'-UTR) y en *med31-2*, se sitúa en el primer intrón de la región codificante de la secuencia (Figura 4.1).

Para diferenciar los individuos mutantes *med31-1* y *med31-2* entre sí se utilizó otro par de oligonucleótidos: el oligonucleótido directo empleado, LBb1.3, es específico para el genotipado de líneas SALK y se alinea con el L/B del T-DNA insertado en las secuencias de *MED31* de los individuos mutantes.

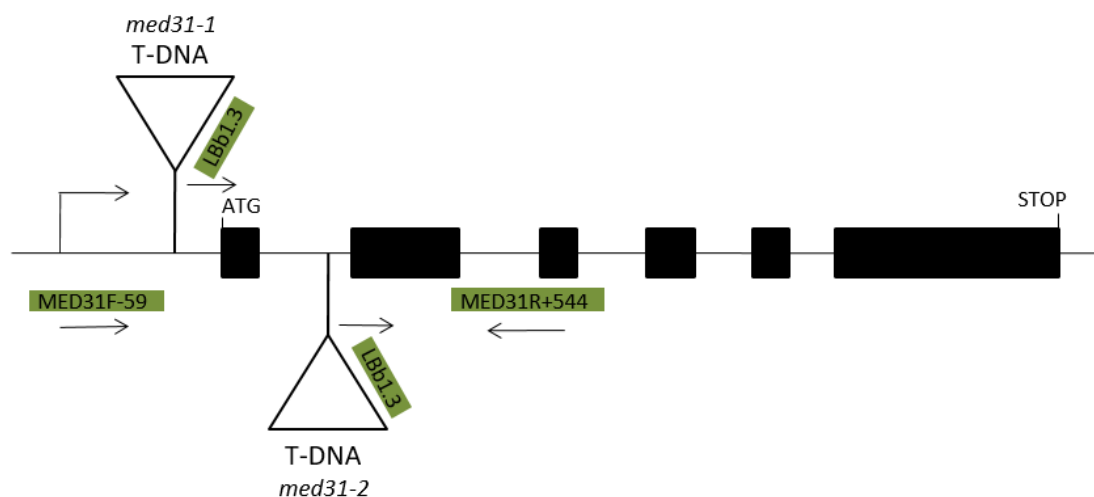


Figura 4.1: Esquema de la estructura de *MED31* con los sitios de las inserciones de T-DNA y los oligonucleótidos empleados en el genotipado.

En el análisis en un gel de agarosa de los productos de PCR se observó el patrón de bandas de la Figura 4.2, que indica que los individuos *med31-1* y *med31-2* llevaban la mutación (el T-DNA) en homocigosis.

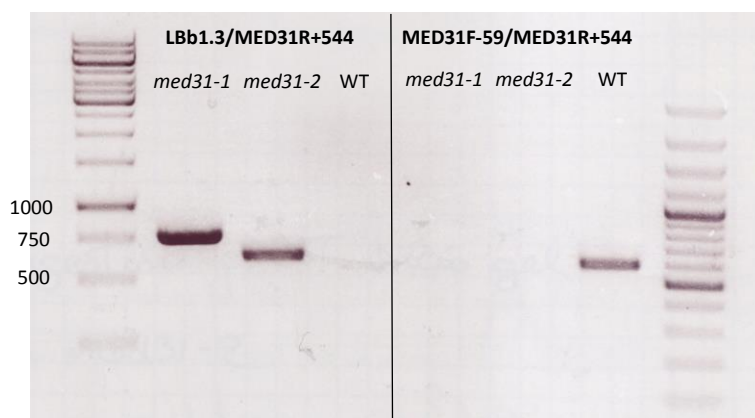


Figura 4.2: Resultado de la electroforesis en gel de agarosa 1% de las PCR de genotipado. Las bandas de las líneas mutantes tienen un tamaño de 750 pb (*med31-1*) y 600 pb (*med31-2*) aprox. La banda de WT tiene un tamaño de 600 pb aprox.

2. Análisis fenotípico de los mutantes *med31*: fenotipos moleculares

La posición de los T-DNAs en ambos mutantes, así como el aspecto de las plantas homocigotas, apuntaban que *med31-1* probablemente no tendría afectada la expresión del gen, mientras que *med31-2* fuese posiblemente un mutante nulo. Para determinar los niveles de expresión en cada caso decidimos hacer una PCR semicuantitativa empleando oligonucleótidos que permitían amplificar la región codificante (interrumpida por el T-DNA en *med31-2*). Es decir, se pretendía comprobar si en los individuos mutantes se producía ARNm de *MED31* y, en caso afirmativo, estimar la cantidad relativa que se sintetizaba. Se cargaron muestras tras 20, 25 y 30 ciclos de amplificación para hacer un seguimiento de la cantidad de producto de PCR obtenido. Al analizar el resultado por electroforesis en gel de agarosa se comprobó que tanto en *med31-1* como en *med31-2* se producía transcrito de *MED31* y que la cantidad sintetizada era similar a la de WT (Figura 4.3).

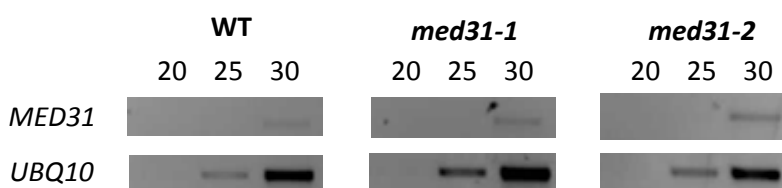


Figura 4.3: Resultado de la PCR semicuantitativa. Arriba, PCR de *MED31*; abajo, PCR de *UBQ10*. De izquierda a derecha, los productos de PCR de cada línea tras 20, 25 y 30 ciclos de amplificación.

Los resultados de *med31-2* fueron sorprendentes, no obstante, la PCR semicuantitativa no es del todo resolutiva si los cambios en el nivel de expresión entre el mutante y el WT no son grandes. Además, el T-DNA en *med31-2* está en un intrón y hay bastantes casos en la literatura donde se ha demostrado que el T-DNA puede ser procesado y eliminado con el intrón durante el procesamiento del ARNm (Yang, 2008); en estos casos el procesamiento es menos eficiente y, por tanto, la expresión del gen es menor que en el silvestre.

3. Análisis de los niveles de expresión

Para determinar los niveles de *MED31* con mayor resolución empleamos la RT-qPCR. Para ello hicimos una cuantificación relativa (RQ) del nivel de expresión de *MED31* en las líneas mutantes respecto a WT, cuyo valor tomamos como 1. Este valor de RQ se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$RQ = (C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen control}) - (C_T \text{ medio gen interés} - C_T \text{ medio gen control})$$

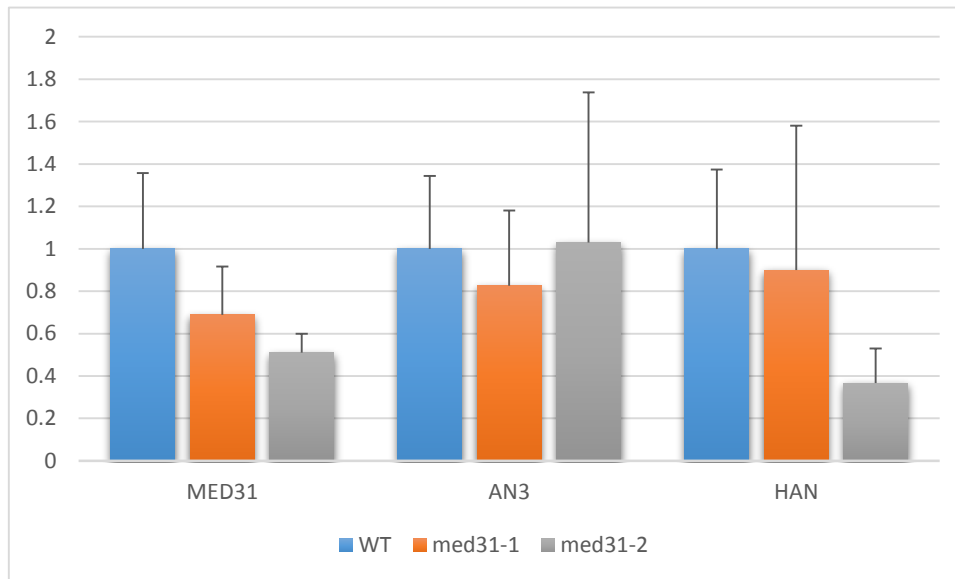


Figura 4.4: Niveles de expresión de *MED31*, *AN3*, y *HAN*

Como se puede ver en la Figura 4.4, la expresión de *MED31* fue similar en WT y *med31-1*, mientras que se redujo prácticamente a la mitad en *med31-2*. Estos resultados indican que la inserción de T-DNA en este alelo probablemente es procesada con el intrón y que como consecuencia la expresión del gen se ve reducida a la mitad cuando se compara con el WT. Por tanto, la mutación *med31-2* la podríamos considerar como una mutación *knock-down* que causa una reducción en el nivel de mensajero del gen.

4. Análisis fenotípico de los mutantes *med31*: morfología

4.1 Fenotipos vegetativos

4.1.1 Aspecto general de las plántulas

Las plántulas germinadas de las dos líneas mutantes presentaban fenotipos variables. Mientras que los individuos *med31-1* no presentaban diferencias a simple vista con los WT, en las plántulas de *med31-2* se observó gran variedad de alteraciones morfológicas, tales como número variable de cotiledones, menor tamaño, menor tasa de germinación y un aspecto en general más raquítrico y débil que las otras líneas (Figuras 4.5 y 4.6).

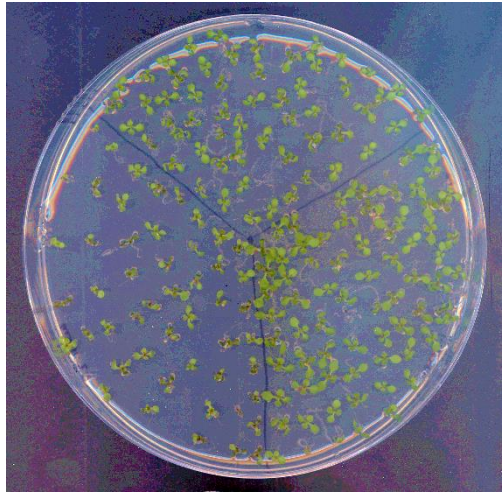


Figura 4.5: Vista aérea de las plántulas. Arriba WT, a la derecha *med31-1* y a la izquierda *med31-2*.

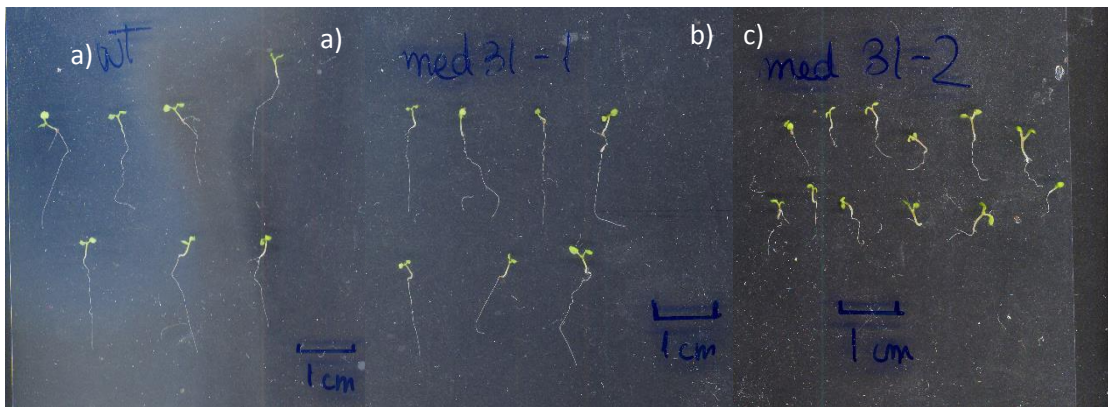


Figura 4.6: Vista de las plántulas a) WT, b) *med31-1* y c) *med31-2*.

4.1.2 Parte aérea

Un análisis detallado bajo la lupa de plántulas *med31-1* no mostró diferencias aparentes con los individuos WT. En ambos se observaba el fenotipo característico de una línea silvestre: dos cotiledones simétricos, dos hojas primarias, mesófilos completamente verdes, tricomas en las hojas jóvenes, etc.

En el caso de *med31-2*, las observaciones fueron bien distintas. Se observó siempre una gran variedad de fenotipos, unos más aberrantes que otros. Mientras que muchos individuos presentaban 2 cotiledones, igual que el tipo silvestre, también se podía ver un alto porcentaje de plántulas con 3 cotiledones e incluso 4 (Figura 4.6 y Tabla 4.1). Además, incluso en las plantas con 2 cotiledones se observaban algunas malformaciones como cotiledones “cup-shape”, cotiledones asimétricos, cotiledones lobulados, cotiledones con mesófilos clareados o vitrificación. En algunos casos extremos, la mutación causó cambios homeóticos, como por ejemplo la emergencia de una raíz en un cotiledón, muy probablemente como consecuencia de un cambio de identidad de ciertas células en el cotiledón afectado. En otras ocasiones se observaron plántulas gemelas, es decir, dos plántulas generadas a partir de la misma semilla (Figura 4.7).

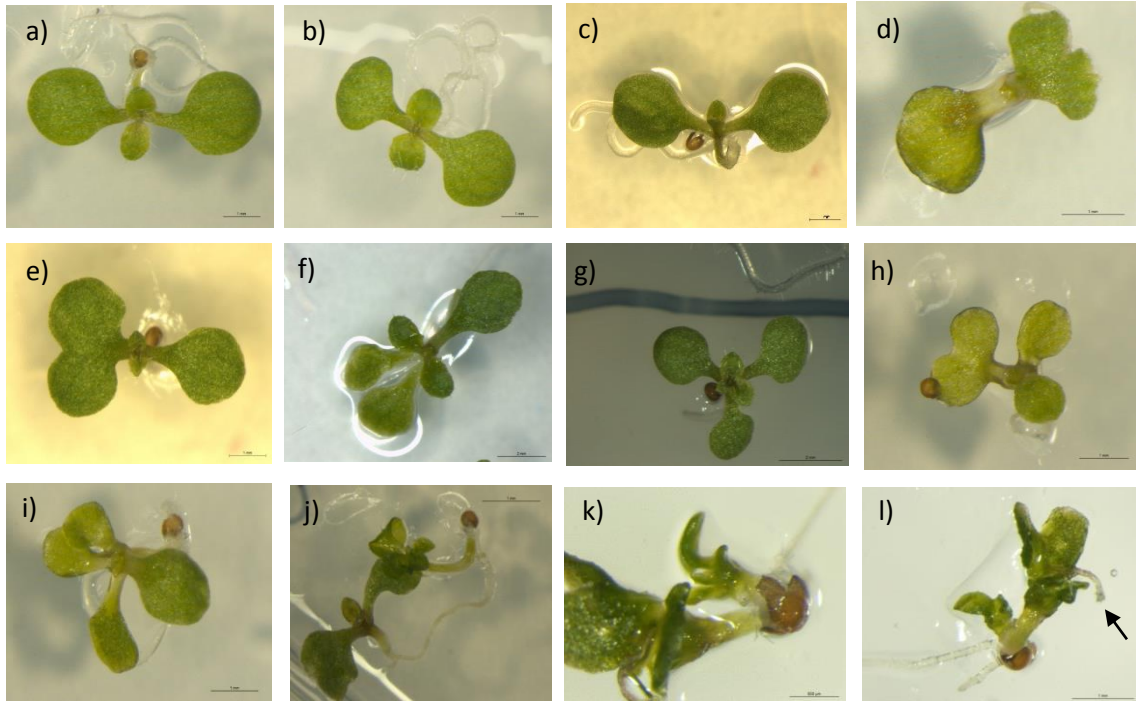


Figura 4.7: Vista detallada de las plántulas a) WT, b) *med31-1*, c-e) *med31-2* con 2 cotiledones, f-h) *med31-2* con 3 cotiledones, i) *med31-2* con 4 cotiledones, j-k) plántulas gemelas de *med31-2* y l) *med31-2* con cambio homeótico en la que una raíz sale de un cotiledón.

Además, nos planteamos la cuestión de si esta gradación de fenotipos estaba influenciada de alguna manera por el fenotipo de la planta progenitora, *i.e.* que la descendencia de plantas con tres cotiledones, por ejemplo, fuera más propensa a tener este fenotipo. Para responderla, analizamos la descendencia de plantas con 2 cotiledones y de plantas con 3. Interesantemente, no se apreció una diferencia significativa en la proporción de fenotipos, por lo que esos individuos también fueron incluidos en el conteo final (Tabla 4.1).

| 2 cotiledones | 3 cotiledones | 4 cotiledones | TOTAL |
|---------------|---------------|---------------|-------|
| 394 (55,49%) | 299 (42,11%) | 17 (2,39%) | 710 |

Tabla 4.1: Frecuencia de fenotipos de *med31-2*. Los cotiledones lobulados se contaron como uno solo.

4.1.3 Longitud de raíces

Para determinar la longitud de las raíces, las placas donde se sembraron las semillas de las distintas líneas se colocaron en posición vertical, de modo que fuese más fácil observar el crecimiento. Las medidas se tomaron 10 días después de inducir la germinación. Los resultados observados indican que las raíces de los individuos *med31-1* no mostraban diferencias significativas con los WT, mientras que en el caso de *med31-2*, la raíz era sustancialmente más corta que la de los demás, aunque se observaron excepciones puntuales, consistentes con la variedad observada en la parte aérea (Figura 4.8 y Tabla 4.2).

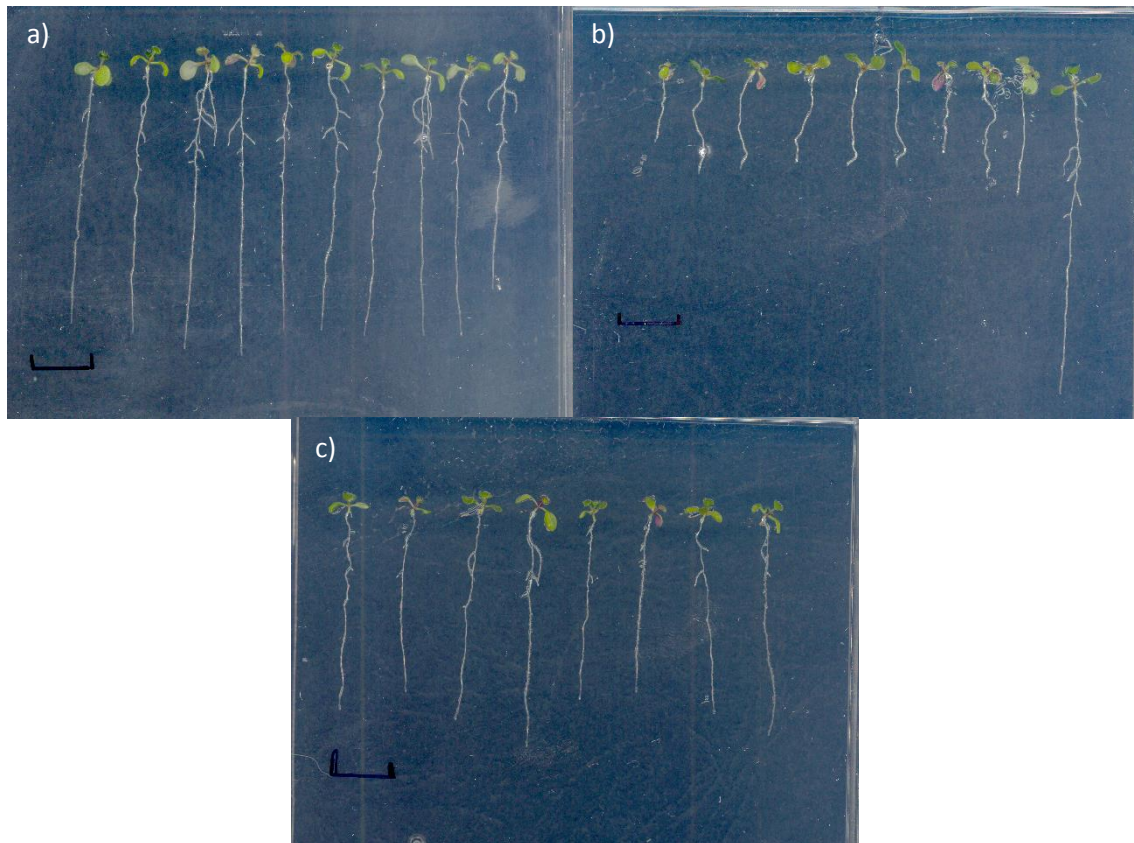


Figura 4.8: Vista de las raíces de las distintas líneas: a) *med31-1*, b) *med31-2* y c) WT. La barra de escala equivale a 1 cm.

| Genotipo | Longitud \pm SD (cm) | n |
|----------------|------------------------|----|
| WT | 4,88 \pm 1,82 | 25 |
| <i>med31-1</i> | 3,63 \pm 0,50 | 29 |
| <i>med31-2</i> | 2,00 \pm 0,93 | 34 |

Tabla 4.2: Longitud media de la raíz primaria de las distintas líneas.

4.1.4 Patrón vascular en cotiledones

El patrón de haces vasculares de los cotiledones está muy bien definido y es muy sensible a mutaciones y/o tratamientos que tienen consecuencias en el desarrollo. Para determinar el patrón vascular en nuestros mutantes se trataron las plántulas con hidrato de cloral para clarear el tejido y fueron observadas bajo el microscopio para observar el patrón que formaban los vasos en los cotiledones. En los individuos WT se observa un vaso central que atraviesa la parte central del cotiledón y en el ápice se bifurca en dos bucles que abarcan prácticamente todo el cotiledón a lo ancho y vuelven al vaso central. Además, se forman otros dos bucles adjuntos a los primeros que también están conectados al vaso central. En conjunto forman un patrón parecido a una yema apical. Este patrón también se observó en los individuos *med31-1* (Figura 4.9) y en ambas líneas se observaron individuos en los que los bucles no estaban del todo cerrados, seguramente debido al poco tiempo de vida que tenían dichos individuos.

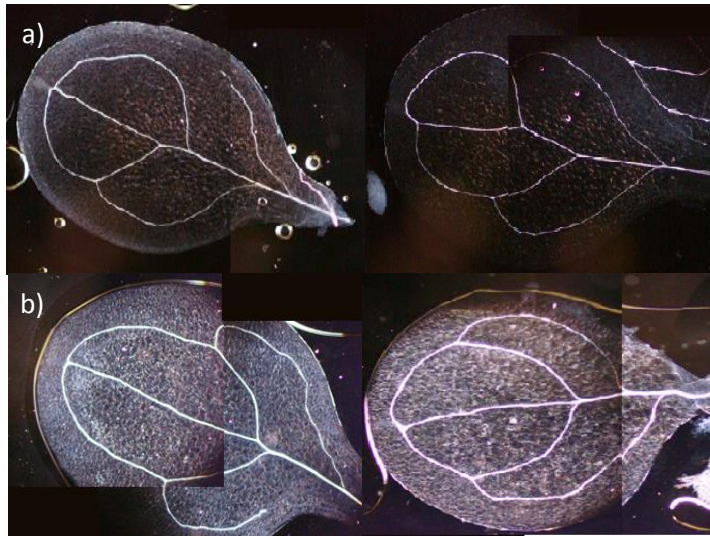


Figura 4.9: Patrones vasculares de a) WT y b) *med31-1*.

Por lo que respecta a los individuos *med31-2* (Figura 4.10), los patrones no estaban tan definidos y no se observaba una organización concreta en algunos casos. Los vasos se disponían en una conformación más irregular y se observó tanto una terminación prematura como una generación espontánea de los mismos. También se observaron casos en que los bucles inferiores no volvían al vaso central y discurrían en paralelo a éste hasta prácticamente la base del cotiledón.

Además, en las plántulas con cotiledones lobulados o 3 cotiledones se observaba que el patrón se dividía, resultando en que cada cotiledón (o semicotiledón) se quedaba con dos bucles, en vez de cuatro.

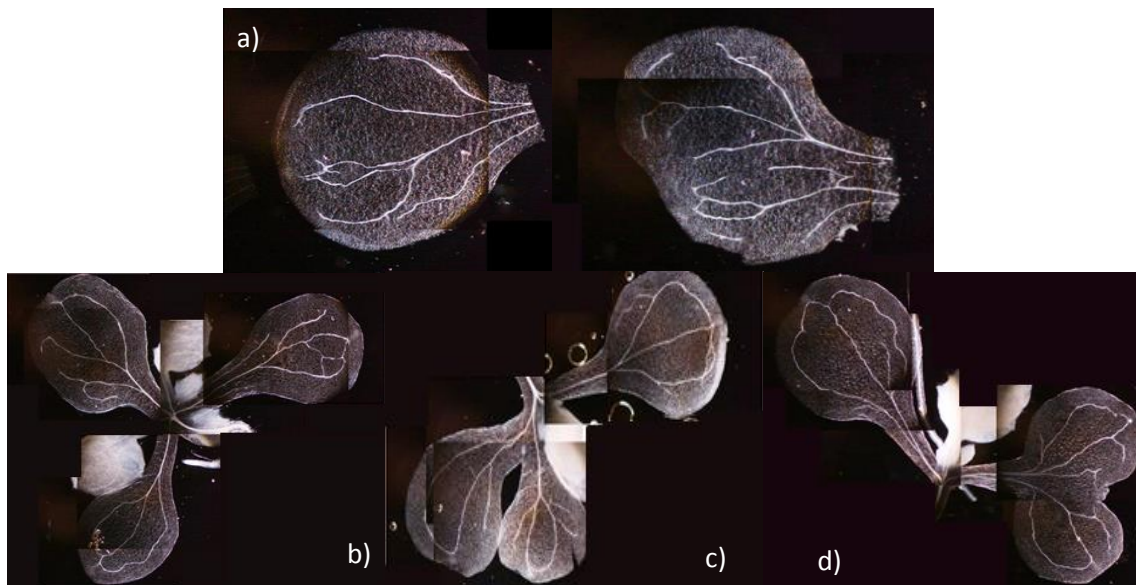


Figura 4.10: Patrones vasculares de *med31-2*: a) plántula de 2 cotiledones, b) y c) plántulas de 3 cotiledones y d) plántula con cotiledón lobulado.

4.1.5 Aspecto general de las plantas adultas

Las plantas adultas de *med31-2* (Figura 4.11) presentaban una roseta más pequeña y compactada que en WT y *med31-1*, el tallo era generalmente menos grueso y en muchos casos no alcanzaba la misma longitud que las otras dos líneas. También se observó en algunos casos ausencia de dominancia apical, viéndose al menos dos tallos principales en algunos individuos. Aun así, las plantas producían meristemos florales de forma continua y eran perfectamente capaces de producir descendencia, aunque la cantidad de semillas recolectadas de esta línea siempre era ligeramente inferior.



Figura 4.11: Vista de plantas adultas: a) WT, b) *med31-1*, c-f) *med31-2*.

4.2 Fenotipos reproductivos

4.2.1 Flores

Un análisis de visu inicial de las plantas adultas de *med31-2* ya apuntaba a que las flores presentaban alteraciones en cuanto al número de órganos. Las flores de *med31-2* presentaban una amplia variedad de variantes fenotípicas, especialmente en el número de pétalos y estambres: mientras que el número de pétalos solía ser ocasionalmente mayor que en WT y *med31-1*, el número de estambres era frecuentemente inferior (Figura 4.12 y Tabla 4.3). Además, también se observó en algunos casos una disposición irregular de los órganos. Sin embargo, no había tanta diversidad fenotípica en el número de sépalos y ninguna en el número de carpelos (Tabla 4.3). Algunas anomalías observadas en los órganos florales fueron sépalos con ápices blancos, estambres con filamentos fusionados o pétalos lobulados.



Figura 4.12: Vista detallada de flores: a) WT, b) *med31-1*, c-e) *med31-2* con 4 pétalos, f) *med31-2* con 3 pétalos, g) y h) *med31-2* con 5 pétalos, i-l) *med31-2* con 6 pétalos.

| Genotipo | Sépalos | | Pétalos | | Estambres | | Carpelos | | n |
|----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|-----------|-----------------|----------|----------------|----|
| | Rango | Media \pm SD | Rango | Media \pm SD | Rango | Media \pm SD | Rango | Media \pm SD | |
| WT | 4 | 4 | 4 | 4 | 5-6 | 5,6 \pm 0,52 | 2 | 2 | 10 |
| <i>med31-1</i> | 4 | 4 | 4 | 4 | 5-6 | 5,7 \pm 0,48 | 2 | 2 | 10 |
| <i>med31-2</i> | 3-6 | 4,36 \pm 0,60 | 3-7 | 4,42 \pm 0,84 | 3-7 | 5,04 \pm 0,95 | 2 | 2 | 50 |

Tabla 4.3: Número de órganos florales. Las flores incluidas son las del meristemo primario. Los órganos fusionados fueron contados como uno solo.

5. Análisis de los niveles de expresión de posibles dianas

Los fenotipos observados en las diferentes fases del desarrollo de *Arabidopsis* en *med31-2* son similares a los observados en el doble mutante *an3 han* (Kanei *et al.*, 2012), por lo que se planteó la hipótesis de que la expresión de estos dos genes estuviera regulada por *MED31*. Para probar la hipótesis determinamos la expresión de *AN3* y *HAN* en el mutante *med31-2* (Figura 4.4). Los resultados indicaron que, si bien la expresión de *AN3* no se veía alterada, la de *HAN* se veía reducida en una proporción similar a la de *MED31*. Estos resultados apuntan a que quizás parte del fenotipo de nuestro mutante es debido a los niveles bajos de *HAN*.

6. Análisis de la complementación de *med31*

La transformación de las líneas WT y *med31-2* dio como resultado plantas transgénicas que sobreexpresaban *MED31* al tener el inserto de T-DNA el promotor *35S*. Las plantas de las líneas obtenidas tras seleccionar en MS con BASTA presentaban el aspecto de plantas WT, tanto aquellas que tenían fondo genético *med31-2*, indicando que el inserto produce una proteína funcional y que los bajos niveles de *MED31* son la causa de los fenotipos, como WT, lo cual indica que en WT los niveles de *MED31* están por debajo del umbral de saturación (Figura 4.13). En el caso de las líneas transgénicas en fondo *med31-2*, el fenotipo se veía totalmente corregido, tanto en las primeras etapas del desarrollo como en la etapa adulta (Figura 4.15); salvo algunas excepciones en las que aparecieron individuos que, pese a ser resistentes a BASTA, tenían el fenotipo de *med31-2*.

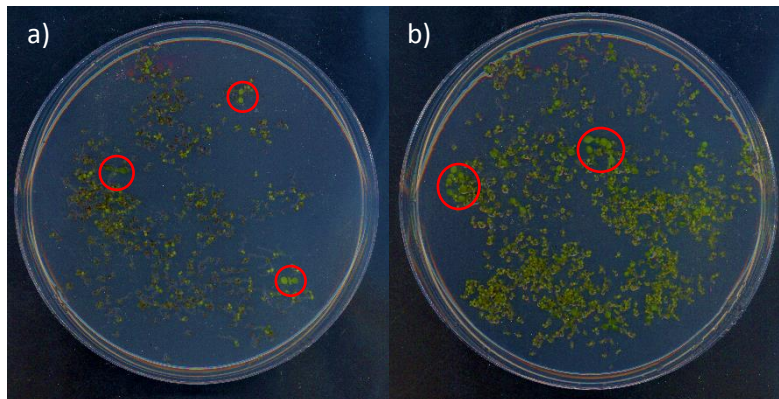


Figura 4.13: Vista de plántulas transformadas con *35S::Flag* de la generación T1: a) en fondo *med31-2* y b) en fondo WT (marcadas en rojo).

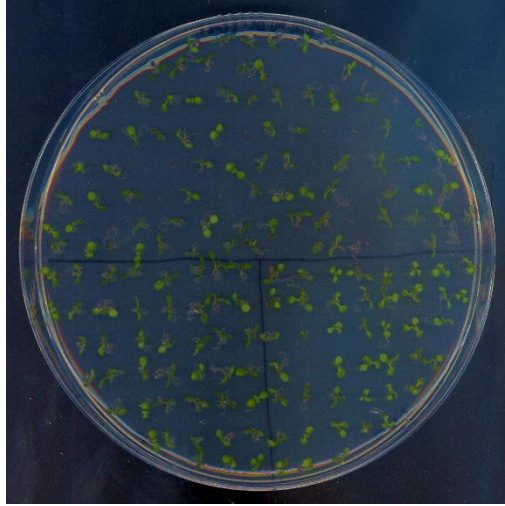


Figura 4.14: Comparación de plántulas transformadas con *35S::Flag* de la generación T3 en fondo *med31-2* (arriba) con WT (izquierda) y *med31-2* (derecha).

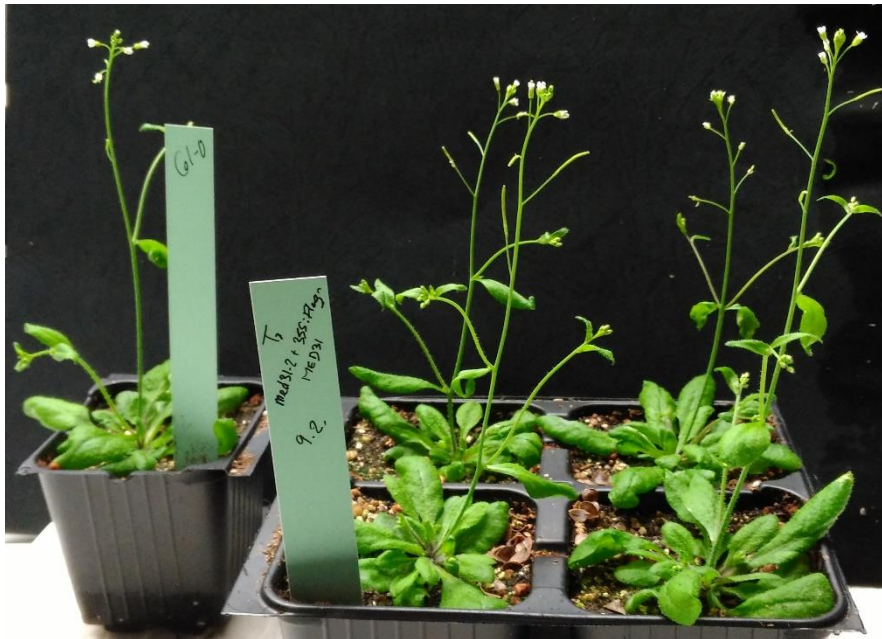


Figura 4.15: Comparación de plantas adultas transformadas con *35S::Flag* de la generación T3 en fondo *med31-2* (derecha) con WT (izquierda) (Ver Figura 4.10 para comparar con *med31-2*).

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era realizar un análisis inicial del papel que juega la subunidad MED31 en *Arabidopsis thaliana*, analizando el fenotipo de dos alelos mutantes *med31*, prestando atención a la morfología de las plántulas, flores y plantas adultas, así como a los niveles de mensajeros de genes cuya expresión se pueda ver regulada por MED31. También preparamos líneas transgénicas en las que expresamos MED31 etiquetado con el epitopo FLAG en un fondo mutante *med31* con el fin de (i) confirmar que los fenotipos del mutante se deben a la deficiencia de MED31, y (ii) obtener herramientas que nos permitan investigar aspectos moleculares de MED31 y su relación con las proteínas DELLA en el futuro.

No existen estudios previos sobre el papel de MED31 en *Arabidopsis*, pero sí en embriones de ratón, en donde se describieron defectos en el desarrollo y la proliferación embrionarios y en el desarrollo de las extremidades (Risley *et al.*, 2010). De manera similar, la causa de los fenotipos observados en las plantas *med31-2* tiene su origen en el desarrollo embrionario y se ve reflejado en las primeras etapas del desarrollo, afectando principalmente a los cotiledones (hojas embrionarias), como se ha podido observar en el número y forma de éstos y en la distribución de los vasos.

Siguiendo en esta línea, algunos individuos *med31-2* que llegan a la fase adulta presentan un fenotipo en el que el tallo es mucho más corto, por lo que la elongación del tallo podría ser regulada también por MED31. Este punto es interesante porque puede ser una evidencia de la relación que establece con las proteínas DELLA con las que interacciona físicamente (datos no mostrados), que regulan negativamente la elongación del tallo.

Por lo que respecta a la morfología de los órganos florales, los individuos *med31-2* presentan ciertas anomalías en el número de pétalos y estambres principalmente, lo que lleva a pensar que MED31 también está involucrado en la regulación de los genes que dirigen la diferenciación de los órganos florales.

Los resultados obtenidos en el análisis del nivel de expresión indican que la planta es muy sensible a los niveles de MED31 y que una disminución del 50% tiene consecuencias muy dramáticas en el desarrollo de las plantas, probablemente derivadas del papel clave de esta subunidad conservada en el complejo Mediator. Los fenotipos mostrados en las distintas fases del crecimiento fueron la razón por la que se también se decidió comprobar el nivel de expresión de AN3 y HAN, ya que los mutantes que carecen de estos genes presentaban fenotipos similares en las mismas etapas (Kanei *et al.*, 2012). HAN es un TF que regula el desarrollo floral y del meristemo apical en *Arabidopsis*. AN3 fue descrito en primera instancia como un coactivador transcripcional que regula la proliferación celular en los primordios foliares (Horiguchi *et al.*, 2005) y desde hace poco se ha encontrado que también actúa como regulador de la acumulación de antocianinas (Meng, 2015) o en tolerancia a sequía modulando la eficiencia del uso del agua (Meng y Yao, 2015). Si bien la expresión de AN3 no se ve afectada por la mutación *med31*, sí lo está la de HAN, lo que podría contribuir al fenotipo observado de cotiledones y órganos florales supernumerarios, teniendo en cuenta sus funciones descritas. Para probar esta hipótesis deberíamos sobreexpresar HAN en un fondo *med31-2* y determinar el grado de corrección de los fenotipos comunes.

Al sobreexpresar *MED31* en un fondo mutante se corrigió el fenotipo mutante, lo cual indica que la proteína *MED31* sintetizada con el epitopo FLAG es perfectamente funcional y que los fenotipos observados en los individuos mutantes son debidos al bajo nivel de expresión de *MED31*. Interesantemente, al sobreexpresar *MED31* en fondo WT no se observó ningún cambio fenotípico, lo que lleva a suponer que los niveles de *MED31* no son limitantes.

CONCLUSIONES

Los fenotipos observados en los mutantes *med31-2* son debidos a los niveles reducidos de MED31, lo cual resalta su importancia en las distintas etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, probablemente como parte del complejo Mediator.

MED31 regula la expresión de *HANABA TARANU*, cuya baja expresión es en parte razón de los fenotipos observados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, C.; ZAROMYTIDOU, A.; XI, Q.; GAO, S.; YU, J.; FUJISAWA, S.; BARLAS, A.; MILLER, A.; MANOVA-TODOROVA, K.; MACIAS, M. J.; SAPKOTA, G.; PAN, D. & MASSAGUÉ, J.; 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*, 139(4): 757-769.

AKOULITCHEV, S.; CHUIKOV, S. & REINBERG D.; 2000. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*, 407(6800): 102-106.

ALLEN, B. & TAATJES, D.; 2015. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews*, 16: 155-166.

AN, C. & MOU, Z.; 2013. The function of the Mediator complex in plant immunity. *Plant Signal Behav*, 8(3).

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; & PATEL, H. R.; 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5(2): 209-219.

BANCEREK, J.; POSS, Z.; STEINPARZER, I.; SEDLYAROV, V.; PFAFFENWIMMER, T.; MIKULIC, I.; DÖLKEN, L.; STROBL, B.; MÜLLER, M.; TAATJES, D. & KOVARIK, P.; 2013. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*, 38(2): 250-262.

BARBIERI, C.; BACA, S.; LAWRENCE, M.; DEMICHELIS, F.; BLATTNER, M.; THEURILLAT, J. P.; WHITE, T.; STOJANOV, P.; VAN ALLEN, E.; STRANSKY, N.; NICKERSON, E.; CHAE, S. S.; BOYSEN, G.; AUCLAIR, D.; ONOFRIO, R.; PARK, K.; KITABAYASHI, N.; MACDONALD, T.; SHEIKH, K.; VUONG, T.; GUIDUCCI, C.; CIBULSKIS, K.; SIVACHENKO, A.; CARTER, S.; SAKSENA, G.; VOET, D.; HUSSAIN, W.; RAMOS, A.; WINCKLER, W.; REDMAN, M.; ARDLIE, K.; TEWARI, A.; MOSQUERA, J. M.; RUPP, N.; WILD, P.; MOCH, H.; MORRISSEY, C.; NELSON, P.; KANTOFF, P.; GABRIEL, S.; GOLUB, T.; MEYERSON, M.; LANDER, E.; GETZ, G.; RUBIN, M. & GARRAWAY, L.; 2013. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*, 44(6): 685-699.

BORGGREFE, T.; DAVIS, R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P. & KORNBERG, R. D.; 2002. A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem*, 277(46): 44202-44207.

BURROWS, J.; PEARSON, B. & SCOTT, I.; 2015. An in vivo requirement for the Mediator subunit Med14 in the maintenance of stem cell populations. *Stem Cell Reports* 4(4), 670-684.

CAI, G.; IMASAKI, T.; TAKAGI, Y.; ASTURIAS, F. J.; 2009. Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism. *Structure*, 17: 559-567.

CARRERA, I.; JANODY, F.; LEEDS, N.; DUVEAU, F. & TREISMAN, J. E.; 2008. Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105(18): 6644-6649.

CLOUGH, S. J & BENT, A. F.; 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16(6): 735-743.

CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; 2013. The Mediator complex and transcription elongation. *Biochimica et biophysica acta*, 1829: 69–75.

DAVIS, J. A.; TAKAGI, Y.; KORNBERG, R. D.; ASTURIAS, F. A, 2002. Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell*, 10: 409–415.

EBMEIER, C. C. & TAATJES, D.; 2010. Activator-Mediator binding regulates Mediator-cofactor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 11283-11288.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C. & THOMPSON, C.; 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, 19(6): 1349.

FIEDLER, S. & WIRTH, R.; 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem*, 170(1): 38-44.

GEISEL SCHOOL OF MEDICINE, 2016

<http://geiselmed.dartmouth.edu/myers/research/>

GRUNBERG, S. & HAHN, S.; 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*; 38: 603-611.

HOLSTEGE, F.; JENNINGS, E.; WYRICK, J.; LEE, T. I.; HENGARTNER, C.; GREEN, M.; GOLUB, T.; LANDER, E. & YOUNG, R.; 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eucaryotic genome. *Cell*, 95: 717-728.

HORIGUCHI, G.; KIM, G. T. & TSUKAYA, H.; 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 43(1): 68-78.

HUMBERT, A.; BOVIER, E.; SELLEM, C. H. & SAINSARD-CHANET, A.; 2015. Deletion of the MED13 and CDK8 subunits of the Mediator improves the phenotype deficient mutant of *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol*, 82: 228-237.

IMASAKI, T.; CALERO, G.; CAI, G.; TSAI, K. L.; YAMADA, K.; CARDELLI, F.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; BERGER, I.; KORNBERG, G. L.; ASTURIAS, F. J.; KORNBERG, R. D.; TAKAGI, Y.; 2011. Architecture of the Mediator head module. *Nature*, 475(7355): 240-243.

KÄMPJÄRVI, K.; KIM, N. H.; KESKITALO, S.; CLARK, A.; VON NANDELSTADH, P.; TURUNEN, M.; HEIKKINEN, T.; PARK, M. J.; MÄKINEN, N.; KIVINUMMI, K.; LINTULA, S.; HOTAKAINEN, K.; NEVANLINNA, H.; HOKLAND, P.; BÖHLING, T.; BÜTZOW, R.; BÖHM, J.; MECKLIN, J. P.; JÄRVINEN, H.; KONTRO, M.; VISAKORPI, T.; TAIPALE, J.; VARJOSALO, M.; BOYER, T. & VAHTERISTO, P.; 2016. Somatic MED12 mutations in prostate cancer and uterine leiomyomas promote tumorigenesis through distinct mechanisms. *The Prostate*, 76: 22-31.

KANEI, M.; HORIGUCHI, G. & TSUKAYA H.; 2012. Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in *Arabidopsis* by *ANGUSTIFOLIA3* and *HANABA TARANU*. *Development*, 139: 2436-2446.

- KELLEHER, R.; 3rd, FLANAGAN, P. & KORNBERG, R. D.; 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell*, 61:1209-1215
- KULAK, N. A.; PICHLER, G.; PARON, I.; NAGARAJ, N. & MANN, M.; 2015. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods*, 11: 319-324.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.; 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- LOCASCIO, A.; BLÁZQUEZ, M. A.; ALABADÍ, D.; 2013. Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol*, 54(8): 1229-1237.
- MALIK, S. & ROEDER, R. G.; 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet.*; 11: 761–772.
- MENG, L. S.; 2015. Transcription coactivator Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3 modulates anthocyanin accumulation and light-induced root elongation through transrepression of Constitutive Photomorphogenic1. *Plant Cell Environ*, 38(4): 838-851.
- MENG, L. S. & YAO, S. Q.; 2015. Transcription co-activator Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of YODA (YDA). *Plant Biotechnol J*, 13(7): 893-902.
- PEIRSON, S. N. & BUTLER, J. N.; 2007. Quantitative polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 362: 349-362.
- PLANK, J. L. & DEAN, A.; 2014. Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together. *Mol. Cell*, 55: 5-14
- POSS, Z.; EBMEIER, C. C. & TAATJES, D.; 2013. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 48: 575–608
- RISLEY, M.; CLOWES, C.; YU, M.; MITCHELL, K. & HENTGES, K.; 2010. The Mediator complex protein Med31 is required for embryonic growth and cell proliferation during mammalian development. *Developmental Biology*, 342: 146-156.
- ROCHA, P.; SCHOLZE, M.; BLEISS, W. & SCHREWE, H, 2010. Med12 is essential for early mouse development and for canonical Wnt and Wnt/PCP signalling. *Development* 137, 2723-2731.
- TAKETO, A.; 1988. DNA transfection of Escherichia coli by electroporation. *Biochim Biophys Acta*, 949(3): 318-324.
- THOMPSON, C. & YOUNG, R.; 1995. General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4587-4590.
- THOMPSON, C.; KOLESKE, A. J.; CHAO, D. & YOUNG, R.; 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell*, 73: 1361-1375.

TSAI, K. L.; SATO, S.; TOMOMORI-SATO, C.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; ASTURIAS, F. J.; 2013. A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nat Struct Mol Biol*, 20(5): 611-619.

TSAI, K. L.; TOMOMORI-SATO, C.; SATO, S.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; ASTURIAS F. J.; 2014. Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell*, 157(6): 1430-1444.

WANG Y. H.; 2008. How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *J Biochem Tech*, 1(1): 11-20.

WANG, C.; YAO, J.; DU, X.; ZHANG, Y.; SUN, Y.; ROLINS, J. & MOU, Z.; 2015. The Arabidopsis Mediator complex subunit 16 is a key component of basal resistance against the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiology*, 169: 856-872.

XU, R. & LI, Y. H.; 2011. Control of final organ size by Mediator complex subunit 25 in Arabidopsis thaliana. *Development* 138, 4545-4554.

XU, R. & LI, Y. H.; 2012. The Mediator complex subunit 8 regulates organ size in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior* 7(2), 182-183.

ZHANG, X.; ZHOU, Y.; DING, L.; WU, Z.; LIU, R. & MEYEROWITZ, E. M.; 2013. Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 family genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(1): 83-101.

ZHANG, Y.; HUILAN, W.; WANG, N.; FAN, H.; CHEN, C.; CUI, Y.; LIU, H. & LIN, H. Q.; 2014. Mediator subunit 16 functions in the regulation of iron uptake gene expression in Arabidopsis. *New Phytologist* 203, 770-783.

ZHAO, Y.; MEDRANO, L.; OHASHI, K.; FLETCHER, J. C.; YU, H.; SAKAI, H. & MEYEROWITZ, E. M.; 2004. HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16(10): 2586-2600.

ZHENG, Z.; GUAN, H.; LEAL, F.; GREY, P & OPPENHEIMER, D.; 2013. Mediator subunit 18 controls flowering time and floral organ identity in Arabidopsis. *PLoS One* 8(1).

ZHU, Y.; ZHAO, H. F.; REN, G. D.; YU, X. F.; CAO, S. Q. & KUAI, B. K.; 2005. Characterization of a novel developmentally retarded mutant (*drm1*) associated with the autonomous flowering pathway in Arabidopsis. *Cell Research*, 15(2): 133-140.

