



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Regulación de la señalización del ABA  
mediante mecanismos que controlan vida  
media y actividad de los receptores  
PYR/PYL**

Tesis doctoral realizada por:

María Ángeles Fernández López

Dirigida por:

Prof. Pedro Luis Rodríguez Egea

Y tutorizada por:

Prof. José Miguel Mulet Salort

Valencia, 2021



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, no sólo mediante sus aportaciones científicas sino también a través de su apoyo y ánimo.

En primer lugar agradezco a mi director de tesis el Prof. Pedro L. Rodríguez Egea por hacer posible que realizase la tesis doctoral en su laboratorio y haberme introducido en el mundo de la investigación, nunca pensé que cuando entré a formar parte de su grupo, gracias al programa JAE-TEC del CSIC en septiembre del 2010, terminaría realizando una tesis doctoral gracias a una ayuda del Ministerio para la Formación de Profesorado Universitario (FPU15/05677) y a la confianza depositada en mí por usted. ¡Gracias!

Gracias al Prof. José Miguel Mulet Salort por facilitarme el poder realizar prácticas docentes, gracias también por la frase de ánimo que me dedicó (“te va a salir bien”).

Gracias a mis compañeros del laboratorio, los cuales aportaron su contribución a la publicación del artículo que ha hecho posible terminar la tesis. Gracias Jorge por enseñarme los entresijos de la técnica del CRISPR-Cas9; Borja, José y Alberto o Alberto y José, el “tándem perfecto”, Lesia que, aunque en esta etapa ya no formaba parte del laboratorio también contribuyó a que el artículo fuese posible. Irene, gracias por estar ahí, la próxima en leer la tesis eres tú, ánimo (“todo va a salir bien”).

No quiero olvidarme de las personas que han hecho que las estancias realizadas en otros laboratorios, durante mi tesis, hayan sido una experiencia vital que nunca olvidaré.

Gracias al Dr. Marco Trujillo del Instituto Leibniz de Bioquímica Vegetal en Halle (Saale), a Kathrin Kowarschik, Ilona y Bushra Saeed, por haberme hecho sentir parte del laboratorio durante mi estancia, haber hablado conmigo, sobre todo haberme escuchado científicamente y aconsejado.

Gracias al Dr. Piers Hemsley del Instituto James Hutton (Dundee) Escocia por incluirme en sus correos como si fuese una más de su laboratorio, por sus sabios consejos científicos y por haber dedicado parte de su tiempo a enseñarme. Gracias a Lisa Logan, Kara y a Charlotte Hurst (me hiciste sentir como en casa, tu español era perfectamente entendible). Gracias también a Dionne Turnbull, por dedicar tu mañana a estar conmigo en el confocal.

Gracias a Francses y Araceli, Javi y Aroa, Brezo, Elena y Antonio, Vanessa, Cristina y Yessica gracias a todos por hacerme sentir como en casa en Dundee y por el apoyo moral que supusisteis para mí, que tanto necesitaba a las alturas en las que estaba de mi tesis, por la despedida tan maravillosa y la dedicatoria tan especial (“a veces los cambios son buenos”).

Gracias a Xema Escolanosoria, el profe de Valenciano de mi hermana Lola, por haberme ayudado en la traducción al valenciano del resumen y mostrarse tan fascinado, muchas gracias.

Gracias Rubén por tu apoyo incondicional todos estos años, por creer en mí, por todo en lo que me has ayudado en esta andadura, por tus comentarios de “nada es tan difícil”, “a ver que tenemos ahí”, “mira este artículo”, “está todo explicadísimo”, “la ciencia es transmisión del conocimiento, no decir tu no vales”, gracias por tu apoyo, sin ti no habría podido superar esta etapa. Daniela, gracias por entenderme y hacerme la vida tan fácil. Por estar esperándome cada viernes con una sonrisa a pesar de haberme perdido gran parte de tu infancia, cumpleaños y momentos importantes para las dos. A veces pensé tras mis largas ausencias, cuando eras un bebé, que cuando llegase a casa no me reconocerías, pero no ha sido así, tú siempre estabas para montar un mundo perfecto a mi alrededor. Esta tesis y todos mis esfuerzos en progresar para que te sientas orgullosa de mí, te la dedico a ti especialmente.

Gracias a mis padres (José Antonio y Lola) y a los padres de Rubén (Marcial y Piedad) por cuidar a mi hija para que yo alcanzase este objetivo y por quererme y apoyarme en todo momento, a mis hermanos (José, Juanma y Víctor) y en especial a mí única hermana Lola, a la que agradezco su apoyo para que me ría, un poquito, de la vida.



## **ABSTRACT**

Plant growth is affected by abiotic stress, for example drought, salinity or high temperature. Signal transduction of abiotic stress is crucial to generate an appropriated physiological response, which involves the participation of different plant hormones, being abscisic acid (ABA) the critical hormonal regulator in regulating the plant's response to situations of stress due to water deficit.

The ABA signaling pathway and the major components of the pathway are well characterized molecularly and biochemically. Pyrabactin Resistance 1 (PYR)/PYR1-LIKE (PYL)/Regulatory Component of ABA Receptor (RCAR) ABA receptors play an important role in quantitative regulation of ABA signaling both in seeds and vegetative tissues.

Although the biochemical function of the PYR/PYL/RCAR ABA receptors has been well established in recent years, little is known about other aspects with biological relevance, such as their post-translational modifications or the regulation of their half-life. One of the recent advances in this field has been the discovery of a new family of E3 ligases called RSL1/RFAs (RING-finger-ABA-related) that consists of at least 10 members, which are key regulators of the stability of PYR/PYL/RCARs in root and leaf tissues, and regulate the degradation of ABA receptors at different cellular locations. Further inspection of the gene family revealed that RSL1/RFAs are structurally characterized by the presence of three putative RING domains

in tandem, named as RING1-IN BETWEEN RING (IBR)-RING2, and accordingly they belong to the RBR-type E3 ligase family.

The E3 ligase RSL1 is a member of the family that is characterized by the presence of a transmembrane domain (TM) at its C-terminal end, its localization in plasma membrane and interaction with the receptors in the plasma membrane, being the ubiquitination of proteins in the membrane an internalization signal for the Endosomal/vacuolar degradation pathway.

Five members of the RSL1/RFA family, that is, RSL1 and RFA6-RFA9, contain a TM domain at the C-terminal end of the proteins, which suggests that RFA6-RFA9 are also localized in plasma membrane.

However, other members of this family of E3 ligases such as RFA1-RFA5 lack the C-terminal TM domain and their functional characterization, as well as their cellular location, has not been investigated yet.

In this study we show that the E3 ligase RFA1 is localized both in the nucleus and in the cytosol, while RFA4 shows a specific localization in the nucleus promoting the nuclear degradation of ABA receptors. Therefore, we members of the RSL1/RFA family interact with ABA receptors at the plasma membrane, cytosol and nucleus, targeting them for degradation via the endosomal/vacuolar pathway (in the case of RSL1) or the 26S- proteasome (for RFA1 and RFA4).

In addition, we provide information on the physiological function of these RBR-type E3 ligases, which are hardly explored in plants. Additionally, we

performed mutagenesis and biochemical assays to identify Cys361 in RFA4 as the active site cysteine, which is a distinctive feature of RBR-type E3 ligases.

We have shown by immunoblot analysis of the *rfa1rfa4* loss-of-function mutant that endogenous levels of ABA receptors PYR1 and PYL4 are increased compared to wild-type plants. On the other hand, we have identified an E2 enzyme, Ubiquitin Conjugating Enzyme 26 (UBC26), as the canonical nuclear enzyme E2 that interacts with the E3 ligase RFA4 and forms UBC26-RFA4-Receptor complexes, forming nuclear aggregates. We also generated loss-of function *ubc26* alleles that exhibited higher sensitivity to ABA and accumulation of ABA receptors compared to wild type. We have revealed a sophisticated ubiquitination system of ABA receptors in different subcellular locations carried out through the RBR-type RSL1/RFA family of E3 ligases.

On the other hand, we have proceeded with the biochemical and genetic study of the different members of the family. We have started biochemical tests to identify the S-acylation in the TM domain of RSL1. To this end, we have generated RSL1<sup>C334S</sup>, RSL1<sup>C55</sup> and RSL1<sup>C65</sup> by mutagenesis as well as RSL1ΔTM, a deletion of the TM domain. Initial studies have shown that Cys residues close to the TM domain are S-acylated.

Finally, we have also generated new combined mutants: *rsl1rfa1*, *rsl1rfa5*, *rfa1rfa5* and *rsl1rfa1rfa5* that may be used in future work to analyze possible connections between RSL1-mediated plasma membrane receptor

ubiquitination and other RFA proteins of the family that ubiquitinate to receptors in other subcellular locations.

## RESUMEN

El crecimiento de las plantas se ve afectado por el estrés abiótico, por ejemplo, sequía, salinidad o altas temperaturas. La transducción de señales de estrés abiótico es fundamental para generar una respuesta fisiológica adecuada, que implica la participación de diferentes hormonas vegetales, siendo el ácido abscísico (ABA) el regulador hormonal crítico en la regulación de la respuesta de la planta a situaciones de estrés por déficit hídrico.

La vía de señalización de ABA y los componentes principales de la vía están bien caracterizados molecular y bioquímicamente. Los receptores de ABA “Pyrabactin Resistance 1” (PYR)/ “PYR1-LIKE” (PYL)/ “Regulatory Component of ABA Receptor” (RCAR) juegan un papel importante en la regulación cuantitativa de la señalización ABA tanto en semillas como en tejidos vegetativos.

Aunque la función bioquímica de los receptores PYR/PYL/RCARs de ABA, está bien caracterizada en los últimos años, se conoce poco sobre otros aspectos con relevancia biológica, como sus modificaciones postraduccionales o la regulación de su vida media. Uno de los avances recientes en este campo ha sido el descubrimiento de una nueva familia de E3 ligasas llamadas RSL1/RFAs (“RING-finger-ABA-related”) que consta de al menos 10 miembros, que son reguladores clave de la estabilidad de los receptores PYR/PYL/RCAR de ABA en tejidos de raíces y hojas, regulando su degradación en diferentes ubicaciones celulares. Un estudio más detallado de esta familia génica reveló que RSL1/RFA se caracterizan estructuralmente por la

presencia de tres dominios RING putativos en tándem, denominados “RING1-IN BETWEEN RING-RING2” (RBR), y en consecuencia pertenecen a la familia de E3 ligasas de tipo RBR.

La E3 ligasa RSL1 es un miembro de la familia que se caracteriza por la presencia de un dominio transmembrana (TM) en su extremo C-terminal, con localización en la membrana plasmática e interacción con los receptores en la membrana plasmática, siendo la ubiquitinación de proteínas en la membrana una señal de internalización para la vía de degradación endosomal/vacuolar. Otros cinco miembros de la familia RSL1/RFA, es decir, RSL1 y RFA6-RFA9, contienen un dominio TM en el extremo C-terminal, lo que sugiere que RFA6-RFA9 también se localizan en la membrana plasmática. Sin embargo, otros miembros de esta familia de E3 ligasas como RFA1-RFA5 carecen del dominio TM C-terminal y su caracterización funcional, así como su ubicación celular, aún no ha sido investigada.

En este estudio mostramos que la E3 ligasa RFA1 se localiza tanto en el núcleo como en el citosol, mientras que RFA4 muestra una localización específica en el núcleo promoviendo la degradación nuclear de los receptores ABA. Por lo tanto, los miembros de la familia RSL1/RFA interactúan con los receptores ABA en la membrana plasmática, el citosol y el núcleo, dirigiéndolos a su degradación a través de la vía endosomal/vacuolar (en el caso de RSL1) o el proteosoma 26S (para RFA1 y RFA4).

También proporcionamos información sobre la función fisiológica de estas E3 ligasas de tipo RBR, apenas exploradas en plantas. Realizando tanto mutagénesis como ensayos bioquímicos para identificar la cisteína 361 (Cys361) en RFA4 como la Cys del sitio activo, que es una característica distintiva de las E3 ligasas de tipo RBR.

Hemos demostrado mediante análisis de inmunotransferencia del mutante con pérdida de función de *rfa1rfa4* que los niveles endógenos de los receptores de ABA PYR1 y PYL4 aumentan en comparación con las plantas de tipo silvestre. Por otro lado, hemos identificado una enzima E2, “Ubiquitin Conjugating Enzyme 26” (UBC26), como la enzima nuclear canónica E2 que interactúa con la E3 ligasa RFA4 y forma complejos UBC26-RFA4-Receptor, formando agregados nucleares. También generamos alelos *ubc26* con pérdida de función que mostraban una mayor sensibilidad a ABA y acumulación de receptores ABA en comparación con el tipo silvestre. En definitiva, hemos revelado un sofisticado sistema de ubiquitinación de receptores ABA en diferentes ubicaciones subcelulares llevado a cabo a través de la familia de E3 ligasas RSL1/RFA de tipo RBR.

Por otro lado, hemos continuado con el estudio bioquímico y genético de los diferentes miembros de la familia, iniciando pruebas bioquímicas para identificar la S-acilación en el dominio TM de RSL1. Para ello, hemos generado RSL1<sup>C334S</sup>, RSL1<sup>C5S</sup> y RSL1<sup>C6S</sup> mediante mutagénesis, así como RSL1ΔTM que presenta una delección del dominio TM. Los estudios iniciales

han demostrado que los residuos de Cys cercanos al dominio TM están S-acilados.

Finalmente, también hemos generado nuevos mutantes combinados: *rsl1rfa1*, *rsl1rfa5*, *rfa1rfa5* y *rsl1rfa1rfa5* que pueden usarse en trabajos futuros para analizar posibles conexiones entre la ubiquitinación del receptor de la membrana plasmática mediada por RSL1 y otras proteínas RFA de la familia que ubiquitinan a los receptores en otras ubicaciones subcelulares.

## RESUM

El creixement de les plantes es pot veure afectat per l'estrès abiòtic, per exemple, sequera, salinitat o altes temperatures. La transducció de senyals d'estrès abiòtic és fonamental per a generar una resposta fisiològica adequada, que implica la participació de diferents hormones vegetals, sent l'àcid abscísic (ABA) el regulador hormonal crític en la regulació de la resposta de la planta a situacions d'estrès per dèficit hídric.

La ruta de senyalització d'ABA i els components principals de la ruta estan ben caracteritzats molecularment i bioquímica. Els receptors "Pyrabactin Resistance 1" (PYR)/"PYR1-LIKE" (PYL)/"Regulatory Component of ABA Receptor" (RCAR) exerceixen un paper important en la regulació quantitativa en resposta a l'estrès tant en llavors com en planta.

Encara que la funció bioquímica dels receptors PYR/PYL/RCARs d'ABA, està ben caracteritzada en els últims anys, es coneix poc sobre altres aspectes amb rellevància biològica, com les seues modificacions postraduccionals o la regulació de la seua vida mitjana. Un dels avanços recents en aquest camp ha sigut el descobriment d'una nova família d'E3 ligases anomenades RSL1/RFAs ("RING-finger-ABA-related") que consta d'almenys 10 membres, que són reguladors clau de l'estabilitat dels receptors PYR/PYL/RCAR d'ABA en teixits d'arrels i fulles, regulant la seua degradació en diferents ubicacions cel·lulars. Un estudi més detallat d'aquesta família gènica va revelar que RSL1/RFAs es caracteritzen estructuralment per la presència de tres dominis

RING putatius en tàndem, denominats “RING1-IN BETWEEN RING-RING2” (RBR), i en conseqüència pertanyen a la família d'E3 ligases de tipus RBR.

L'E3 ligasa RSL1 és un membre de la família que es caracteritza per la presència d'un domini transmembrana (TM) en el seu extrem C-terminal, amb localització en la membrana plasmàtica i interaccions amb els receptors en la membrana plasmàtica, sent la ubiquitinació de proteïnes en la membrana un senyal d'internalització per a la via de degradació endosomal/vacuolar. Altres cinc membres de la família RSL1/RFA, és a dir, RSL1 i RFA6-RFA9, contenen un domini TM en l'extrem C-terminal, la qual cosa suggereix que RFA6-RFA9 també es localitzen en la membrana plasmàtica. No obstant això, altres membres d'aquesta família d'E3 ligases com RFA1-RFA5 manquen del domini TM C-terminal i la seua caracterització funcional, així com la seua ubicació cel·lular, encara no ha sigut investigada.

En aquest estudi vam mostrar que l'E3 ligasa RFA1 es localitza tant en el nucli com en el citosol, mentre que RFA4 mostra una localització específica en el nucli promovent la degradació nuclear dels receptors ABA. Per tant, els membres de la família RSL1/RFA interactuen amb els receptors ABA en la membrana plasmàtica, el citosol i el nucli, dirigint-los a la seua degradació a través de la via endosomal/vacuolar (en el cas de RSL1) o el proteosoma 26S (per a RFA1 i RFA4).

També proporcionem informació sobre la funció fisiològica d'aquestes E3 ligases de tipus RBR, a penes explorades en plantes. Realitzant tant mutagènesis com a assajos bioquímics per a identificar la cisteïna 361

(Cys361) en RFA4 com la Cys del lloc actiu, que és una característica distintiva de les E3 ligases de tipus RBR.

Hem demostrat mitjançant una anàlisi d'immuno-transferència del mutant amb pèrdua de funció de *rfa1rfa4* que els nivells endògens dels receptors d'ABA PYR1 i PYL4 augmenten en comparació amb les plantes de tipus silvestre. D'altra banda, hem identificat un enzim E2, "Ubiquitin Conjugating Enzyme 26" (UBC26), com l'enzim nuclear canònic E2 que interactua amb l'E3 ligasa RFA4 i forma complexos UBC26-RFA4-Receptor, formant agregats nuclears. També generem al·lels *ubc26* amb pèrdua de funció que mostraven una major sensibilitat a ABA i acumulació de receptors ABA en comparació amb el tipus silvestre. En definitiva, hem revelat un sofisticat sistema d'ubiquitinació de receptors ABA en diferents ubicacions subcel·lulars dut a terme a través de la família d'E3 ligases RSL1/RFA de tipus RBR.

D'altra banda, hem continuat amb l'estudi bioquímic i genètic dels diferents membres de la família, iniciant proves bioquímiques per a identificar la S-acilació en el domini TM de RSL1. Per a això, hem generat RSL1<sup>C334S</sup>, RSL1<sup>C55</sup> i RSL1<sup>C65</sup> mitjançant mutagènesis, així com RSL1ΔTM que presenta una delecció del domini TM. Els estudis inicials han demostrat que els residus de Cys pròxims al domini TM estan S-acilados.

Finalment, també hem generat nous mutants combinats: *rsl1rfa1*, *rsl1rfa5*, *rfa1rfa5* i *rsl1rfa1rfa5* que poden usar-se en treballs futurs per a analitzar possibles connexions entre la ubiquitinació del receptor de la membrana

plasmàtica mitjançant per RSL1 i altres proteïnes RFA de la família que ubiquitinen als receptors en altres ubicacions subcel·lulars.



# Contenido

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	25
<b>Ácido abscísico y componentes principales de la ruta de señalización</b> .....	26
<b>Cascada de señalización del ABA</b> .....	29
Receptores de ABA en Arabidopsis .....	30
Proteínas fosfatasas en Arabidopsis .....	35
Familia Protein Kinasa 2 relacionada con SNF1 (SnRK2) en Arabidopsis .....	38
Factores de transcripción implicados en la respuesta a ABA.....	40
<b>Regulación de los componentes principales de la ruta de señalización de ABA en Arabidopsis: modificaciones post-traduccionales</b> .....	44
Modificaciones post-traduccionales vía proteosoma 26S .....	45
El sistema ubiquitina en Arabidopsis .....	46
La proteína Ubiquitina .....	47
Principales dominios funcionales de Ubiquitina .....	48
Unión de la ubiquitina al sustrato.....	49
Mecanismos de conjugación de ubiquitina.....	53
Las proteínas E2 (UBCs).....	55
Proteínas E3 ubiquitina ligasas .....	59
Modificaciones post-traduccionales vía endosómica .....	81
Modificaciones post-traduccionales debidas a S-nitrosilación y nitración .....	83
Modificaciones post-traduccionales debidas a fosforilación.....	84
<b>OBJETIVOS</b> .....	88
<b>RESULTADOS I</b> .....	91
<b>Expresión de los genes RFA1-RFA5, estructura comparada con la rama RSL1 y localización subcelular de RFA1 y RFA4</b> .....	92
<b>La interacción de RSL1, RFA1 y RFA4 con los receptores de ABA se localiza en diferentes localizaciones subcelulares</b> .....	103

RFA1 y RFA4 promueven la ubiquitinación de PYR1 <i>in vitro</i> .....	110
RFA1 y RFA4 son ubiquitinadas <i>in vivo</i> .....	114
El residuo Cys361 de RFA4 afecta a su propia ubiquitinación y a su capacidad para ubiquitinar PYL4 .....	117
RFA1 y RFA4 promueven la degradación <i>in vivo</i> de los receptores ABA.....	122
Identificación de UBC26 como la enzima asociada E2 de localización nuclear que interactúa con la E3 ligasa RFA4 .....	125
El doble mutante <i>rfa1 rfa4</i> acumula más cantidad de receptores PYR1 y PYL4... 139	
<b>RESULTADOS II.....</b>	<b>149</b>
El dominio transmembrana de RSL1 es necesario y suficiente para determinar la localización en membrana plasmática .....	154
El mecanismo de S-acilación en RSL1 no se ve afectado por ABA. ....	157
Los residuos de Cys seleccionado del extremo C-terminal son fundamentales para la S-acilación de RSL1. ....	158
Localización subcelular de los mutantes para S-acilación RSL1C334S y RSL1C5S 160	
Obtención de líneas sobreexpresoras de HA-RSL1 y HA-RSL1ΔTM. ....	162
<b>RESULTADOS III.....</b>	<b>165</b>
Generación de dobles y triples mutantes de la familia RSL1/RFAs .....	166
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>184</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>188</b>
<b>Material bacteriológico y vegetal usado: manejo y condiciones de crecimiento.</b> 189	
<i>Escherichia coli</i> .....	189
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	190
Transformaciones.....	192
Preparación de medios de cultivo.....	193
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	194
Elaboración de bacterias competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	195

Transformación .....	195
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	196
Elaboración de competentes de levadura .....	196
Co-transformación de células competentes .....	197
Preparación de medios de cultivo.....	198
Líneas silvestre y mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	199
Preparación de medios de cultivo.....	200
Tratamientos de <i>A. thaliana</i> .....	201
Tratamientos en medios sólidos .....	202
Tratamientos en medios de cultivo líquido .....	203
Cultivo en invernadero.....	204
Realización de ensayos fisiológicos por pérdida de agua en <i>Arabidopsis</i> .....	209
Realización de ensayos de termografía infrarroja en <i>Arabidopsis</i> .....	210
<b>Métodos de extracción y análisis de ácidos nucleicos.</b> .....	211
Extracción de ADN plasmídico en bacteria <i>E. coli</i> .....	211
Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	212
Análisis de ADN por reacción de PCR.....	213
Polimerasas utilizadas .....	213
<b>Vectores de clonación utilizados.</b> .....	214
Vector de entrada .....	214
Clonación GATEWAY™ .....	214
pENTR221-RFA4 .....	215
pENTR201-UBC24 (PHO2) .....	215
pCR8-RFA4ΔC .....	216
Vectores destino .....	216
Para doble híbrido de levaduras (Y2H, Yeast-Two – Hybrid) .....	217
Construcciones para la expresión en estable en <i>Arabidopsis</i> .....	217

Construcciones para la expresión en transitoria <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	218
Construcciones para la purificación de proteínas en <i>E. coli</i> .....	219
<b>Extracción de ARN y análisis de la expresión del gen por PCR o PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).</b> .....	<b>220</b>
<b>Tecnología de proteínas.</b> .....	<b>221</b>
Inducción de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> .....	221
Purificación de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> .....	222
Cultivo y purificación de proteínas fusionadas a MBP .....	223
Tinción de Coomassie .....	224
Ensayos “Pull-Down” .....	224
Extracción de proteínas de plantas.....	225
SDS-PAGE Electroforesis .....	226
Inmunoanálisis de proteínas (“Western blot”) .....	227
<b>Ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H, “Yeast-Two – Hybrid”).</b> .....	<b>229</b>
<b>Visualización de proteínas en expresión transitoria con <i>Agrobacterium</i>.</b> .....	<b>230</b>
<b>Microscopía de láser confocal: ensayos de localización, BiFC y multicolorBiFC.</b> .	<b>232</b>
<b>Co-inmunoprecipitación (coIP).</b> .....	<b>233</b>
<b>Ensayo de reconstitución de luciferasa dividida (‘Split-LUC’).</b> .....	<b>234</b>
<b>Análisis de vida media de PYL4 y PYR1 en <i>Arabidopsis</i>.</b> .....	<b>235</b>
<b>Ensayo de ubiquitinación <i>in vitro</i>.</b> .....	<b>236</b>
<b>Ensayo de ubiquitinación <i>in vivo</i> en <i>N. Benthamiana</i>.</b> .....	<b>237</b>
<b>Ensayos de degradación de proteínas <i>in vivo</i> y <i>semi-in vivo</i>.</b> .....	<b>238</b>
<b>Ensayos de S-acilación de proteínas.</b> .....	<b>239</b>
<b>Estadísticas y análisis de colocalización.</b> .....	<b>241</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>243</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>279</b>



# INTRODUCCIÓN

---

## Ácido abscísico y componentes principales de la ruta de señalización.

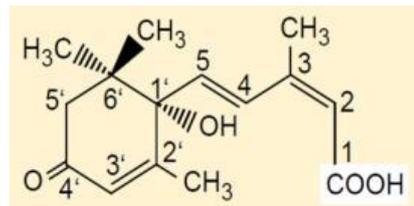
Hoy sabemos que el Ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal asociada a respuestas de estrés, tanto biótico como abiótico, y que también participa en la regulación del crecimiento y en el desarrollo de las plantas al estar implicado en diversos procesos fisiológicos tales como cierre estomático, hidrotropismo (Dietrich *et al.*, 2017), embriomorfogénesis, abscisión de hojas y maduración de frutos (vía etileno), en la maduración, dormición y crecimiento de las semillas, así como, en la síntesis y almacenamiento de proteínas y lípidos (Creelman *et al.*, 1987; Ingram & Bartels, 1996; Koornneef *et al.*, 1989). A pesar de las numerosas implicaciones que posee el ABA sobre diferentes respuestas y procesos en la planta, hasta 2009 no se identificaron sus receptores mediante estudios independientes en los laboratorios del Dr. Cutler, Dr. Grill, Dr. Rodríguez y Dr. Schroeder. Históricamente, fueron los estudios de Hemberg, los que llegaron a la conclusión de que en el agua debía de existir una sustancia con carácter inhibitorio, la cual era crítica para el mantenimiento de la dormancia de semilla tanto de plantas de patata como de *Fraxinus* (Hemberg, 1949a, 1949b). Años más tarde, en 1963, Philip Wareing aisló un inhibidor del crecimiento de plántulas en *Acer pseudoplatanus* al que denominó dormidina (Eagles & Wareing, 1963). Trabajos de Frederick Addicott determinaron que, la abscisina II era una sustancia que controlaba la abscisión de los frutos del algodón, (Ohkuma *et al.*, 1963). El laboratorio de Addicott obtuvo resultados que abalaban que

esta sustancia, la abscisina II, promovía la abscisión de hojas en plántulas de algodón e inhibía al ácido indolacético.

Estudios posteriores validaron que la dormidina y la abscisina II se trataban realmente del mismo compuesto químico, y se decidió denominarlo ácido abscísico (ABA) (Addicott *et al.*, 1968; Cornforth *et al.*, 1965) (Figura 1).

Aunque en un principio, se pensaba, que la promoción de la abscisión por parte del ABA era un efecto indirecto llevado a cabo por los cambios en los niveles de etileno (Cracker & Abeles, 1969), estudios recientes demuestran

que es el ABA quien promueve la senescencia foliar independientemente de los niveles de etileno (Ogawa *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016). En las últimas cuatro décadas los componentes de la vía principal de biosíntesis y de la señalización



**Figura 1.** Representación de la estructura molecular del ABA en 1D. La fórmula representa el enantiómero S o + del C1' asimétrico, el doble enlace adyacente al grupo carboxilo está r en configuración *cis*.

del ABA han sido identificados mediante rastreos genéticos en mutantes vivíparos de maíz y de *Arabidopsis thaliana*, así como en mutantes que presentaban insensibilidad al azúcar, sal y desarrollo de la germinación con ABA. Uno de los primeros componentes identificados de la ruta de señalización fueron las proteínas fosfatasa tipo 2C (PP2C) de clase A, "ABA INSENSITIVE1" (ABI1) y ABI2 y los factores centrales de la transcripción como ABI3, ABI4 y ABI5 (Finkelstein, 1994; Finkelstein & Lynch, 2000; Giraudat *et al.*, 1992; González-Guzmán *et al.*, 2002; Koornneef *et al.*, 1984; Laby *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 1994, 1997; McCarty, 1995; Meyer *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998). Otro componente de la señalización hallado mediante estudios

bioquímicos de activación de protein quinasa en *Vicia faba* fue la Ser/Thr quinasa codificada por el gen *AAPK* (“ABA ACTIVATED SERINE THREONINE PROTEIN KINASE”) que se encuentra en células oclusivas regulando el cierre estomático. La mutación puntual de  $AAPK^{Lys43Ala}$  provoca que esta proteína pierda la sensibilidad inducida por ABA al cierre estomático (Li & Assmann, 1996).

Los componentes de la ruta que más tardaron en identificarse, debido a la redundancia funcional que presentan, fueron los receptores del ABA. No fue hasta 2009 cuando el laboratorio del Dr. Sean Cutler y colaboradores, realizaron un rastreo de genética química, buscando mutantes insensibles a un agonista sintético específico para ciertos receptores de ABA, la pirabactina, el resultado de estas investigaciones fue el descubrimiento de “Pyrabactin Resistance 1” (PYR1) y 13 genes similares denominados PYR1 (PYR1-LIKE (PYL)) a los que llamaré en lo sucesivo PYLs (Park *et al.*, 2009).

Trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Erwin Grill permitieron descubrir, al mismo tiempo, los genes RCAR (“Regulatory Component of ABA Receptor”), mediante la técnica de doble híbrido de levadura, (Ma *et al.*, 2009). Igualmente, en el grupo del Dr. Pedro L. Rodríguez, utilizando como cebo la proteína HAB1 en un ensayo de doble híbrido, se encontraron diferentes interactores de las fosfatasa 2C, entre ellos los receptores PYR/PYL/RCAR y subunidades del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF formado por la ATPasa BRAHMA (Saez *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2009a).

La función como receptores de ABA de toda la familia de proteínas PYR/PYL/RCARs se validó mediante ensayos de transfección de protoplastos y reconstrucción del núcleo de señalización del ABA (Fujii & Zhu, 2009), lo que unido con las evidencias genéticas y estructurales permitió establecer el núcleo de señalización de la hormona (González-Guzmán *et al.*, 2012; Melcher *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2018; Miyazono *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009a, 2009b; Yin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018).

## Cascada de señalización del ABA.

Para que la planta responda ejerciendo las diversas funciones activadas por la señalización mediada por ABA, éste debe ser primero reconocido por sus receptores específicos (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Los receptores se unen al ABA formando un complejo ternario junto con las PP2Cs de clase A, lo que permite liberar la inhibición de protein quinasas SnRK2s (“SNF1-related kinases”) (Fujii & Zhu, 2009; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2009). Por otra parte, las SnRKs se activan por autofosforilación o bien pueden sufrir transfosforilación y ser activadas por otras quinasas, por ejemplo, las MAKKKs (“Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases”) de tipo Raf (“Rapidly Accelerated Efibrosarcoma”) subfamilia B2 ,B3 y B4, RAF10 y ARK (“Raf Like Kinases”) parecen ser críticas para la activación de las SnRK2s y sus posteriores respuestas a estrés y a ABA (Hwang *et al.*, 2018; Katsuta *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2019; Saruhashi *et al.*, 2015; Shinozawa *et al.*, 2019; Soma *et al.*, 2020; Stevenson

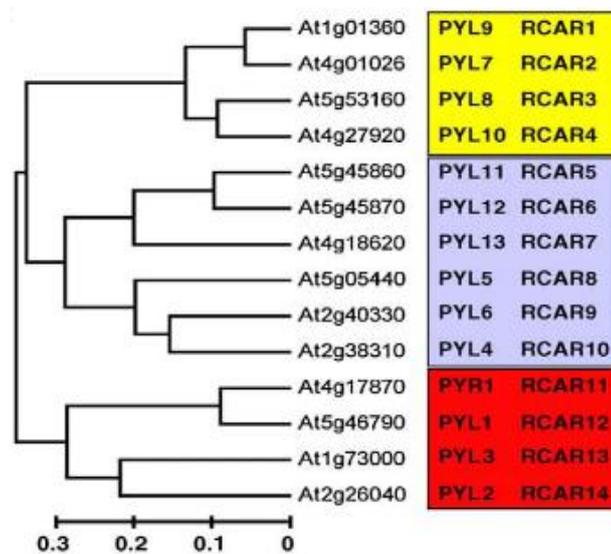
*et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2020). Las SnRK2s regulan múltiples respuestas fisiológicas fosforilando a otros sustratos como canales iónicos, factores de transcripción y gran cantidad de transportadores (Umezawa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). En ausencia de ABA, las SnRK2s se encuentran inhibidas por las PP2Cs y de esta forma la señalización de ABA ésta bloqueada.

## Receptores de ABA en Arabidopsis.

En Arabidopsis la familia de receptores PYR/PYL/RCAR, forma parte de una superfamilia de proteínas solubles de unión a ligando caracterizada por un dominio (“Star-related lipid-transfer”) START con un plegamiento en forma de bolsillo hidrofóbico central (Iyer *et al.*, 2001). Es también llamada superfamilia BetV1 en reconocimiento a un dominio conservado que se identificó en abedul (*Betula verrucosa*). Está constituida por 14 miembros (PYR1/PYL1-13), 13 de los cuales (PYR1/PYL1-12) activan la ruta de señalización de ABA a través de la inhibición de las PP2Cs clado A y, por lo tanto, de la activación de la cascada a través de la fosforilación de sustratos por las SnRK2s (Fujii *et al.*, 2009; Fujii & Zhu, 2009; He *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). Por otra parte, PYL13 resulta controvertido, ya que resultados iniciales indicando su falta de unión al ABA han sido rebatidos por Fuchs *et al.*, (2014).

De los 14 receptores (Figura 2), PYR1, PYL1 y PYL2 son diméricos en solución siendo su afinidad por el ABA menor a la del resto de receptores, necesitando mayores concentraciones de esta hormona para su activación. Por otra parte, PYL4, PYL5, PYL6, PYL7, PYL8, PYL9 y PYL10 son monoméricos

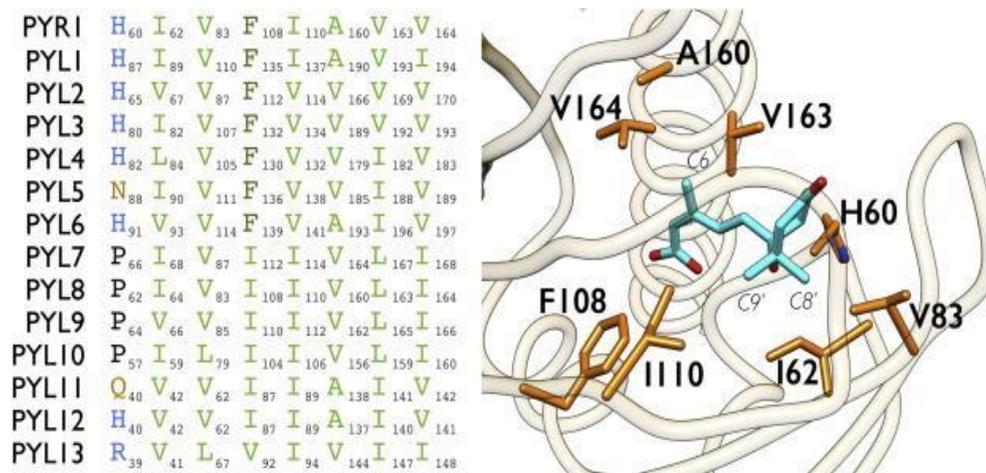
teniendo una alta afinidad por el ABA, lo que les permite unir la hormona incluso a bajas concentraciones. Los receptores monoméricos podrían interactuar con las PP2Cs cuando hay bajos niveles de ABA, lo que no es posible para los receptores diméricos (Dupeux *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2011).



**Figura 2** Árbol filogenético de receptores RCAR/PYL1/PYL1 (proteínas de unión a ABA) de Arabidopsis. Las proteínas se pueden agrupar en tres subfamilias I, II y III resaltadas en amarillo, azul y rojo, respectivamente. (Adaptada de Raghavendra *et al.*, 2010).

Mutaciones generadas en PYR1 que afectan a la unión tanto a ABA como a las PP2Cs han sido seleccionadas para estudiar la interacción entre PYR1 y HAB1. Se generaron al menos 29 mutantes de PYR1 que tienen mutaciones localizadas en 10 residuos diferentes (H60, V83, I84, L87, A89, M158, F159, T162, L166, y K170) siendo capaces de interactuar con HAB1 en ausencia de ABA (Mosquna *et al.*, 2011). Entre estas, las mutaciones V83L e I84K en PYL2 permiten que se comporte como un PYL monomérico con actividad parcialmente independiente de ABA (Hao *et al.*, 2011). También se han identificado cambios en PYL7-9 (H60P e I84K), en PYL10 (H60P, V83L e I84K), en PYL11 (L166F) y en PYL13 (H60R, V83L, L87F y L166Y) (Figura 3). La

existencia de estos cambios, así como la de los mutantes estudiados, explica parcialmente los diferentes niveles de respuesta de actividad en estados basales, siendo más alta para los PYLs monoméricos y PYL13 en ausencia de ABA, además de poder dar una explicación sobre los diferentes estados oligoméricos de estos PYLs.



**Figura 3.** Residuos de aminoácidos variables dentro de los bolsillos de unión a ligando de los receptores PYR/PYL/RCAR de *Arabidopsis thaliana*. A la derecha se muestra la representación de los residuos en PYR1. Adaptada de Jonathan *et al.*, 2016

Sí nos basamos en sus propiedades bioquímicas y estructurales y en la diversidad de patrones de expresión, lo esperable, es una versatilidad funcional entre los distintos miembros de la familia PYR/PYL/RCARs. Ejemplos de esta versatilidad se observa en el estudio del mutante simple *pyr1-1*, el cual es insensible a pirabactina en germinación, pero no muestra un fenotipo de insensibilidad a ABA porque otros receptores tales como PYL4 pueden percibir el ABA e inhibir la germinación. La pirabactina actúa como agonista además de en PYR1, en PYL1 o PYL3, siendo más evidente esta inhibición en PYR1 debido a que su expresión es mayor en semillas (Park

*et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). En la Tabla 1, se muestra un resumen de algunos receptores PYLs, así como de las respuestas más relevantes en las que participan y han sido identificadas en *Arabidopsis*.

Tabla 1. Receptores PYL/PYR/RCARs y respuestas asociadas a ABA

Receptor	Respuestas en las que están implicados	Referencias
<b>PYR1</b>	Muestra insensibilidad a pirabactina, un agonista de ABA. Es fundamental para mediar el papel de ABA en respuesta a estrés biótico e inmunidad	Park <i>et al.</i> , 2009 García-Andrade <i>et al.</i> , 2020
<b>PYL2</b>	Contribuye especialmente al cierre estomático	Dittrich <i>et al.</i> , 2019
<b>PYL3</b>	Responde a ácido faseico, un catabolito del ABA	Weng <i>et al.</i> , 2016.
<b>PYL4/PYL5</b>	Contribuyen especialmente en respuesta estomática inducida por alto CO <sub>2</sub>	Dittrich <i>et al.</i> , 2019
<b>PYL8</b>	Los mutantes de pérdida de función <i>pyl8</i> son insensibles a la inhibición de crecimiento de raíz por alto ABA. Se estabiliza por ABA	Antoni <i>et al.</i> , 2013 Zhao <i>et al.</i> , 2014 Belda-Palazon <i>et al.</i> , 2018
<b>PYL9</b>	Importante papel en senescencia foliar inducida por ABA	Zhao <i>et al.</i> , 2019

Como se ha comentado previamente, la familia de receptores PYLs posee redundancia génica. Este hecho, dificulta el estudio individual de los distintos receptores, ya que la pérdida de función por mutación simple puede tener poco efecto fenotípico, debido a que otros receptores de la familia pueden suplir la función del receptor mutado. Por ello, se han generado diversos mutantes múltiples para examinar el efecto del bloqueo de la señalización del ABA. Estos mutantes múltiples de pérdida de función se han generado y estudiado en diversos trabajos, permitiendo obtener información sobre la relación entre la combinación de los diferentes receptores con el grado de insensibilidad a ABA observado como resultado

de la combinación de los receptores afectados (Tabla 2). De esta forma se observa que, a mayor número de receptores afectados el grado de insensibilidad es mayor. También se determinó, gracias a estos trabajos, cómo la pérdida de función de determinados receptores (PYR1, PYL1,8) es más importante para observar diferencias fenotípicas frente a otros receptores (PYL3,7,9,11,12).

**Tabla 2.** Mutantes múltiples PYR/PYL/RCARs y grado de insensibilidad asociada a ABA donde un punto indica que es insensible a [ABA]  $\leq 0.5 \mu\text{M}$ , 2 puntos que es insensible a [ABA]  $\leq 3 \mu\text{M}$ , 3 puntos indica que es insensible a [ABA]  $> 50 \mu\text{M}$  en germinación.

Mutante PYR/PYLs	Grado de insensibilidad a ABA	Observaciones	Referencias
Doble <b>613</b>	●	Interviene en respuestas de germinación mediada por ABA	Fuchs <i>et al.</i> , 2014
Cuádruple <b>1124</b>	●●	Muestra insensibilidad a ABA, aunque todavía hay respuesta a la hormona	Park <i>et al.</i> , 2009
Quíntuple <b>3791112</b>	-	No se encontró diferencia con el silvestre en respuesta a ABA	Zhao <i>et al.</i> , 2018
Séxtuple <b>112458</b>	●●●	Prácticamente ciego a la hormona. Muestra defectos en crecimiento, desarrollo y producción de semillas	González-Guzmán <i>et al.</i> , 2012
Séptuples <b>1124578/1124589</b>	●●●●	Son insensibles a la inhibición de formación de raíces laterales en respuesta a ABA	Orman-Ligeza <i>et al.</i> , 2018
Dodecacuple <b>112345789101112</b>	●●●●●	Muestra defectos en crecimiento, desarrollo de flores, producción de semillas, cierre estomático, senescencia de hojas, y regulación global de la expresión génica.	Zhao <i>et al.</i> , 2018

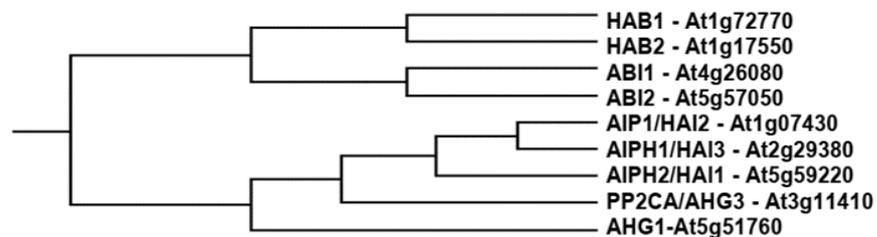
## Proteínas fosfatasas en Arabidopsis.

La regulación mediante la fosforilación y desfosforilación de proteínas es fundamental para mantener el balance apropiado para control de crecimiento mediado por ABA dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta (Shi *et al.*, 2018; Yang & Guo, 2018; Zhu, 2016). Las proteínas fosfatasas (PPs) tienen actividad de fosforilación de otras proteínas en residuos de Serina/Treonina (Ser/Thr fosfatasas). Además, dependiendo de la especificidad de sustrato pueden tener actividad tirosina(Tyr) fosfatasa y defosforilación dual (Luan, 2003).

Las PPs se subdividen en los siguientes grupos principales dependiendo de la presencia de subunidades regulatorias (además de catalíticas) y la necesidad de cationes metálicos que necesitan para ejercer su acción (Cohen, 1989; Das *et al.*, 1996). Las de Tipo1 o protein fosfatasa 1 (PP1) que actúan desfosforilando la subunidad  $\beta$  de la fosforilasa quinasa (PHK). Las de Tipo2 o protein fosfatasa 2A (PP2A) que desfosforilan la subunidad  $\alpha$  de las PHK, y no necesitan la presencia de cationes metálicos para ejercer su acción, las PP2A están formadas por tres subunidades A, B y C, siendo la subunidad C, la subunidad catalítica que forma complejo con A dando lugar al núcleo de esta holoenzima, a ambas se une la subunidad B que actúa regulando al complejo anterior. Además, las PP2A, presentan una mayor sensibilidad al ácido okadaico (siendo una característica distintiva del resto de PPs) (Luan, 2003). Las de Tipo2B (PP2B) necesitan la presencia de cationes

Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina para ejercer su acción (no existen en plantas) y por último las de Tipo2C (PP2C) que son Mg<sup>2+</sup> dependientes.

La familia de fosfatasa PP2Cs está constituida por 76 proteínas clasificadas en 10 clases de la A-J en función del dominio catalítico (Schweighofer *et al.*, 2004). En la Figura 4 mostramos el grupo A, el cual está implicado en la señalización del ABA.



**Figura 4.** Árbol filogenético de la subfamilia PP2Cs de clase A, en función de la similitud de aminoácidos en su dominio catalítico. Adaptada de Regina *et al.*, 2011.

Para una revisión sobre otras funciones asociadas al resto de grupos de proteínas PP2C, véase Fuchs *et al.*, (2013). El extremo N-terminal de las PP2Cs de clase A presenta baja similitud de secuencia y longitud variable, y está intrínsecamente desordenado, por lo que se puede pensar que es la parte de la proteína que se une a sustratos, segundos mensajeros u otras proteínas reguladoras (Meinhard *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 1998).

Estas PP2Cs de clase A se localizan subcelularmente tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fujita *et al.*, 2009). Bajo condiciones de estrés hídrico los PYLs forman un complejo ternario (receptor-ABA-fosfatasa) junto a las PP2Cs de clase A, lo que libera la inhibición de las SnRK2s, permitiendo la activación de la respuesta a estrés (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). El análisis de mutantes de pérdida de función en las PP2Cs ha permitido

dilucidar funciones específicas o redundantes en cada una de ellas dentro de su participación en la ruta de señalización del ABA (Kuhn *et al.*, 2006; Leonhardt *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2009; Saez *et al.*, 2004, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). La caracterización de mutantes simples con pérdida de función de ABI1, HAB1 y PP2CA, revelan fenotipos hipersensibles a la hormona en procesos de germinación, crecimiento, cierre estomático y expresión de genes sensibles a ABA. Esto sugiere que son reguladores clave de la señalización de ABA tanto en semillas como en tejidos de plantas (Kuhn *et al.*, 2006; Leonhardt *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2004, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). La caracterización del mutante doble *hab1-1 abi1-2* que produce una respuesta más fuerte de hipersensibilidad a ABA que los mutantes simples por separado, nos lleva a pensar en una redundancia funcional de ambas fosfatasa, (Saez *et al.*, 2006). Del mismo modo, el doble mutante *ahg1-1 ahg3-1* también exhibe un fenotipo de hipersensibilidad más fuerte. Se pueden observar diferencias, como la eficiencia de la germinación o la latencia de las semillas, cuando se analizan los mutantes individuales por separado (Kuhn *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2007; Saez *et al.*, 2004).

Las PP2Cs de clase E, denominadas “clade-E growth-regulating” (EGR) 1/2/3 suprimen parcialmente el crecimiento de las plantas a través de la desfosforilación del residuo Ser<sup>670</sup> de proteínas MASP1 (“Mannose-Associated Serine Protease 1”) asociadas a microtúbulos, desestabilizando los microtúbulos que se requieren para niveles apropiados de crecimiento bajo estrés osmótico (Bhaskara *et al.*, 2017). Recientemente se ha

descubierto que, en ausencia de estrés por frío, EGR2 está localizada en membrana plasmática debido a su N-miristoilación, lo que permite interaccionar con e inhibir OST1 (Ding *et al.*, 2019). En cambio, el frío suprime la N-miristoilación de EGR2, lo que evita su interacción con OST1 y libera a la quinasa para mediar la respuesta a frío.

## Familia Protein Kinasa 2 relacionada con SNF1 (SnRK2) en Arabidopsis.

En Arabidopsis existen 38 protein quinasas que están relacionadas con SNF1 (“Sucrose non-fermenting-1”) de levadura y se denominan SnRKs. Las SnRKs tienen un tamaño promedio de aproximadamente 40 kDa y presentan como característica distintiva la presencia de aminoácidos ácidos en su dominio C-terminal (Halford *et al.*, 2000). Se clasifican en base a la similitud estructural y de secuencia, en tres subgrupos: SnRK1 (3 miembros), SnRK2 (10 miembros, calcio independientes) y SnRK3 (26 miembros, calcio dependientes, también conocidas como CIPKs) (Hrabak *et al.*, 2003).. En Arabidopsis encontramos 10 genes *SnRK2s* designados como *SnRK2.1-10* (Hrabak *et al.*, 2003) de los que tres de ellos son fuertemente activados por ABA, *SnRK2.2* (también llamado *SRK2D*), *SnRK2.3* (*SRK2I*) y *SnRK2.6/OST1* (*SRK2E*) (Boudsocq *et al.*, 2004). *AtOST1* (*SnRK2.6/SRK2E*) se seleccionó de entre una muestra de mutantes que mostraban una capacidad reducida de cierre estomático frente al de tipo silvestre, en respuesta a estrés por sequía (Mustilli *et al.*, 2002; R. Yoshida *et al.*, 2002). El análisis de *OST1/SnRK2.6* con quinasas estrechamente relacionadas, *SnRK2.2* y *SnRK2.3*, proporcionaron la

evidencia del importante papel que desempeñan esta familia de SnRK2s en la mediación de la señalización de ABA durante las distintas etapas del desarrollo de la planta, así como en la regulación de la expresión de genes en respuesta a esta hormona (Fujii *et al.*, 2007). Debido a la redundancia funcional entre *SnRK2.2* y *SnRK2.3*, los mutantes simples no tenían un fenotipo claro de respuesta a ABA, pero el doble mutante *snrk2.2 snrk2.3* mostró un fenotipo fuertemente insensible a ABA en latencia de semillas, germinación e inhibición del crecimiento radicular, así como disminución de genes inducibles por ABA. Por ejemplo, las semillas de dobles mutantes *snrk2.2 snrk2.3* pudieron germinar después de dos días de siembra sin el tratamiento de estratificación y en etapas posteriores fueron capaces de continuar su desarrollo de raíz incluso a concentraciones de 50  $\mu$ M ABA en las cuales los mutantes simples y semillas de tipo silvestre no podían crecer (Fujii *et al.*, 2007). Sin embargo, presentó una escasa pérdida de agua en hoja en comparación con el tipo silvestre (Fujii *et al.*, 2007; Fujii & Zhu, 2009). El análisis del triple mutante recesivo *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* mostraba fenotipos de insensibilidad extrema en ABA, lo que hace suponer que estas SnRK2s son reguladores positivos centrales en la señalización ABA (Fujii & Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009). Tres estudios fosfoproteómicos han identificado posibles sustratos de SnRK2 *in vivo*, (Kline *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). Estos estudios confirman que los factores de transcripción AREB/ABF son los principales sustratos de las SnRKs. Además de SnRK2, se han identificado quinasas de tipo 1 relacionadas con SNF1 (SnRK1) asociadas a PP2Cs de clase A (Rodrigues *et al.*, 2013). SnRK1s

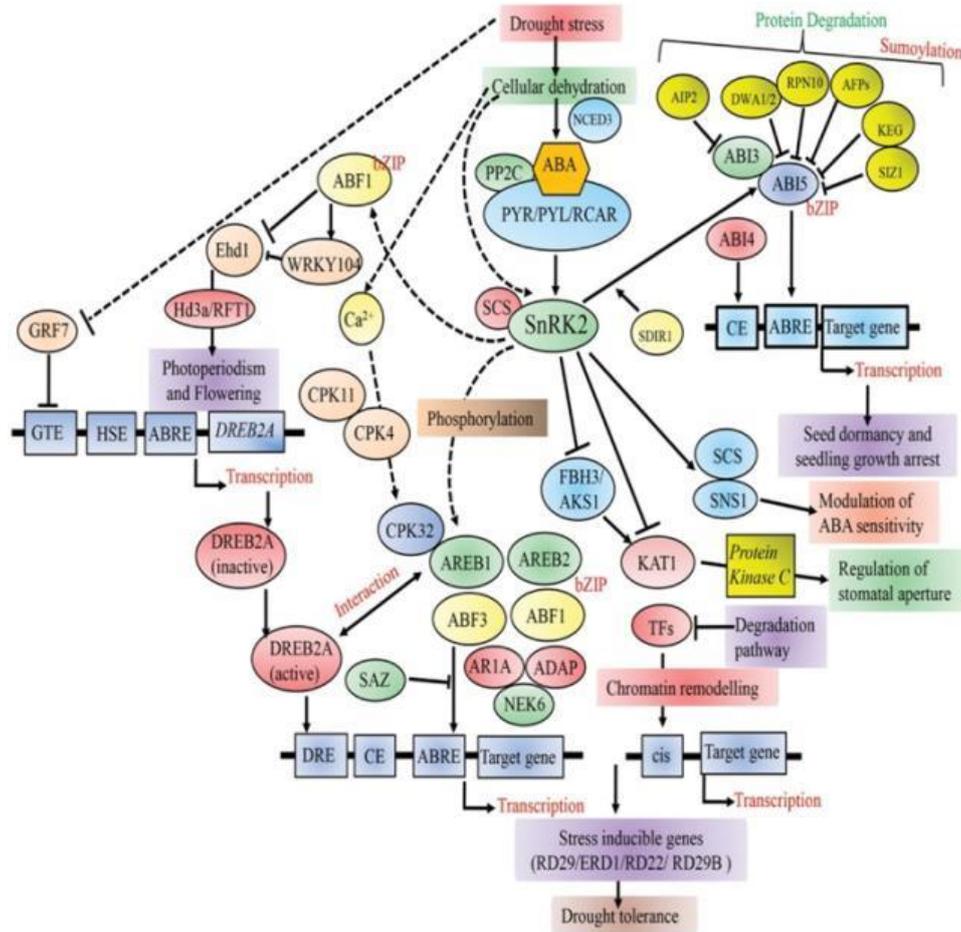
(SnRK1.1 (KIN10)/1.2 (KIN11)/1.3) en Arabidopsis. Estas quinasas son también reguladores centrales que vinculan el crecimiento y el desarrollo con los nutrientes y estado de energía del carbono (Robaglia *et al.*, 2012; Smeekens *et al.*, 2010). De este modo, la quinasa TOR (“Target Of Rapamycin”) aumenta su actividad en planta en respuesta a los altos niveles de azúcar (Deprost *et al.*, 2007), mientras que la actividad de SnRK1 aumenta dramáticamente durante un déficit de azúcar (Baena-González, 2010). También existe evidencia molecular, genética y fisiológica para el papel de dos PP2Cs de clase A, ABI1 y PP2CA (AHG3), como reguladores negativos de la señalización de SnRK1 en Arabidopsis a través de su interacción directa con la subunidad catalítica  $\alpha$  SnRK1, su desfosforilación e inactivación posterior (Rodrigues *et al.*, 2013). En consecuencia, la represión SnRK1 se observa en mutantes dobles y cuádruples de pérdida de función de las PP2Cs, provocando hipersensibilidad al azúcar durante el desarrollo temprano de las plántulas de manera similar a la sobreexpresión de SnRK1.

## Factores de transcripción implicados en la respuesta a ABA.

Los factores de transcripción (TFs) son proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN regulando la expresión génica. Genes que son inducidos por ABA se unen a elementos sensibles en su secuencia promotora ABRE (PyACGTGG/TC), y las proteínas de unión a ABRE son reconocidas por factores de transcripción que reciben el nombre de “ABRE binding factors” (ABFs) (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000).

Los ABF forman parte de una familia de 9 miembros en *Arabidopsis*, denominados factores de transcripción bZIP, de los cuales ABF2, ABF3 y ABF4 son altamente inducibles por ABA y estrés osmótico en tejidos vegetativos (Choi *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2005; Uno *et al.*, 2000; Takuya Yoshida *et al.*, 2010). Experimentos en plantas con el mutante cuádruple *abf1 abf2 abf3 abf4* muestran que estos TFs controlan la mayor parte de respuesta génica posterior a ABA (Yoshida *et al.*, 2015). Experimentos con el mutante simple *abi5* mostraron su papel clave como un regulador positivo de la señalización ABA durante el desarrollo de la semilla, maduración, germinación y crecimiento precoz de plántulas (Lopez-Molina *et al.*, 2001, 2002; Lopez-Molina & Chua, 2000). Además, la expresión de *ABI5* se reduce drásticamente en mutantes triples de las quinasas, lo que sugiere una regulación similar de los ABF (Nakashima *et al.*, 2009). Hay otras regiones reguladoras que son reconocidas por otros TFs relacionados con ABA, como los elementos de respuesta a la sequía “dehydration responsive element binding protein” (DRE) que son reconocidos por la familia de TFs que incluyen a *ABI4* y “*APETALA2*” (*AP2*) (Finkelstein *et al.*, 1998). Las plantas del mutante simple *abi4* son insensibles a ABA (Söderman *et al.*, 2000). El TF *ABI4* es versátil ya que interviene en la regulación de respuestas en numerosas vías, integra la señalización redox de sacarosa, ABA y jasmonato (*JA*) (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Kerchev *et al.*, 2011), y modula la ramificación de raíz en presencia de nitrato (Signora *et al.*, 2001). *ABI3* es otro TF involucrado en la señalización de ABA. Pertenece a la familia B3 que reconoce regiones *ABRE* de una manera dependiente de ABA y regiones

RY/Sph de manera independiente (Ezcurra *et al.*, 2000). Los TFs ABI3, ABI4 y ABI5 se coexpresan durante la maduración y germinación de semillas. Sin embargo, después de estas etapas, los niveles de estos TFs disminuyen (Finkelstein *et al.*, 2011). Otros TFs involucrados son WRKY40 (Shang *et al.*, 2010) y WRKY63 (Ren *et al.*, 2010) de la familia WRKY que reconoce secuencias de W-box, o MYC2 y MYB2 relacionadas con bHLH (Abe *et al.*, 2003). Otros TFs adicionales que juegan papeles cruciales en respuesta a la señalización ABA en plantas son los TFs NAC (He *et al.*, 2016) como SNAC-1, que está involucrado en respuesta a la sequía en *O. sativa* (Li *et al.*, 2019b) o TFs NF-Y (Wang *et al.*, 2019), como NF-YC9, que interactúa con ABI5 y facilita su función en *Arabidopsis* (Bi *et al.*, 2017) (Figura 5).



**Figura 5. Modelo esquemático de la regulación transcripcional de diferentes TF que juegan papeles clave en estrés hídrico en plantas.** El complejo PP2C-PYR/PYL/RCAR regula positivamente la vía AREB/ABF-SnRK2. Los SnRK2 modulan otros TF aguas abajo, incluidos AREB/ABF, FBH3/AKS1 y SNS1 durante el estrés, así como la maduración de la semilla. Los TF de AREB/ABF fosforilados, AREB1, AREB2, ABF3 y ABF1 se unen a la región promotora de genes diana y activan su expresión en respuesta al estrés hídrico. GRF7 suprime la expresión de DREB2A, que es un TF clave en la expresión génica independiente de ABA. Las líneas discontinuas indican posibles roles. PP2C-PYR/PYL/RCAR, resistencia a la pirabactina1/componentes similares a PYR1/reguladores de los receptores ABA; PP2C, proteína fosfatasa 2C; CE, elemento de acoplamiento; GTE, elemento cis dirigido a GRF7; HSE, elemento de choque térmico; TF, factores de transcripción. (Joshi *et al.*, 2016)

## Regulación de los componentes principales de la ruta de señalización de ABA en Arabidopsis: modificaciones post-traduccionales.

En un principio los estudios de los componentes principales de la ruta de señalización de ABA estaban encaminados al conocimiento detallado de sus mecanismos genéticos, moleculares y bioquímicos (González-Guzmán *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2018; Nishimura *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Santiago, Dupeux, *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009b; P. Yin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015a; Zhao *et al.*, 2018). Más recientemente se emprende un nuevo camino en busca de los factores que regulan la “*vida media*” de los componentes de la ruta de señalización de ABA. La concentración celular de cada clase de proteína es consecuencia del equilibrio entre su síntesis y su degradación. El recambio proteico protege también a las células de la acumulación de proteínas anómalas. Numerosos procesos fisiológicos dependen tanto de las reacciones de síntesis como de degradación oportunas. Un ejemplo destacado es el control del ciclo celular eucariota. Las fases del ciclo celular están reguladas mediante las etapas de síntesis y degradación. En los últimos años se ha realizado un gran avance en la determinación de los mecanismos que controlan el recambio proteico derivado de esos ciclos de síntesis y degradación. Las proteínas se degradan mediante enzimas proteolíticas que se encuentran distribuidas por toda la

célula. La ubiquitinación de proteínas se puede encajar dentro del proceso de mantenimiento basal debido a un sistema de marcaje de proteínas a través de moléculas de Ubiquitina (Ub). Mediante este sistema, se reciclan las proteínas dirigiéndolas hacia degradación por dos vías alternativas, la vía del proteosoma 26S o la vía endosómica (Yu & Xie, 2017). Junto a este mecanismo principal mediado por Ub, también se han descrito la participación de otras modificaciones post-traduccionales (MPTs) tales como la fosforilación, nitración y S-nitrosilación que participan en el mantenimiento de los niveles basales de proteínas y que también han sido descritos para los principales componentes de la vía de señalización del ABA (Castillo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Yu & Xie, 2017).

### Modificaciones post-traduccionales vía proteosoma 26S.

La degradación de proteínas por la vía del proteosoma 26S es una MPT de carácter reversible. Esta MPT se basa en la unión de moléculas de Ub sobre determinados residuos de proteínas diana que provoca su identificación y reconocimiento por el sistema proteosoma 26S.

Este sistema de ubiquitinación de proteínas fue descrito por el grupo del Dr. Ciechanover, cuyo descubrimiento le hizo ser merecedor de un premio Nobel en Química en 2004.

### *El sistema ubiquitina en Arabidopsis*

Aproximadamente el 6% del genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica elementos que constituyen el sistema ubiquitina del proteosoma 26S (UPS). Se trata, por lo tanto, de un sistema extremadamente grande y complejo. Numerosos datos en los últimos años relacionan sus funciones como reguladores intracelulares, en la señalización de hormonas, en regulación de la estructura y transcripción de la cromatina, en la adaptación de la morfogénesis, en respuestas a desafíos ambientales y también interviene en auto-reconocimiento y lucha contra patógenos (Vierstra, 2009).

El UPS implica una intrincada constelación de enzimas y complejos enzimáticos dependiente de ATP, entre los que destacan la propia Ub; la enzima activadora de Ub (E1); la enzima conjugadora de Ub (E2); enzimas ubiquitin ligasas (E3), que conjugan ubiquitina a sustratos específicos; y el proteosoma 26S formado a su vez por un complejo enzimático que consta del proteosoma 20S, el cual contiene los lugares activos de proteólisis, y dos partículas reguladoras 19S compuestas por varias subunidades, designadas como RPT (“regulatory particle triple A-ATPase”) (Rubin *et al.*, 1998). Estas partículas reguladoras son las encargadas de reconocer las proteínas poliubiquitinadas, puesto que para que una proteína diana se degrade a través del proteosoma parece ser requisito fundamental que esté marcada con al menos 4 moléculas de ubiquitina, que se ensamblan, principalmente, a partir de K48 (Wilkinson *et al.*, 2000, Smalle & Vierstra, 2004). Posteriormente, la Ub unida a estos sustratos es escindida por proteínas

desubiquitinantes (DUB) (Clague *et al.*, 2013) y reciclada. Los sustratos modificados por Ub también son susceptibles de sufrir reciclaje.

El UPS, puede a su vez ser bloqueado mediante el uso de distintos inhibidores como, por ejemplo, la Ub-aldehído que actúa bloqueando a las enzimas desubiquitininas de las proteínas reguladoras, produciendo como consecuencia directa la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas. Otros inhibidores como, MG132, MG115 y la epoxomicina, producen una acumulación de las proteínas diana, al bloquear las actividades proteolíticas llevadas a cabo por el proteosoma.

### *La proteína Ubiquitina*

El nombre de ubiquitina viene dado por el significado del adjetivo ubicuo (existente o estar en todas partes al mismo tiempo; continuamente encontrado...). La ubiquitina se trata de un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado con modificaciones tan sólo en 2 ó 3 residuos de aminoácidos, que se encuentra en eucariotas (animales, plantas y hongos) pero no en procariontes (Callis & Vierstra, 1989).

En relación a su estructura se trata de una proteína de plegamiento comprimido  $\beta$ , que consta de 3,5 vueltas de una hélice  $\alpha$  anfipática y una hélice corta con una lámina  $\beta$  de cinco cadenas con siete vueltas inversas (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Posee un gran núcleo hidrofóbico y un extenso enlace de hidrógeno que le confieren estabilidad estructural. En condiciones normales, cuando se fracciona mediante sistemas SDS-PAGE esta proteína de 8,5 kDa migra con un peso molecular de 5,5 kDa, inusual para una

proteína hidrofóbica (Ciechanover *et al.*, 1980), que podría estar relacionado por sus propiedades termoestables. El extremo amino posee una cadena  $\beta$  en la que el azufre de la metionina 1 (M1) está unido al nitrógeno del residuo 63 del esqueleto por un puente de hidrógeno, produciendo rigidez. Los dos residuos carboxi terminales no se visualizan en las estructuras cristalinas, indicando flexibilidad, o bien reflejando probablemente el requisito de minimizar el impedimento estérico tras la unión covalente del extremo C-terminal a otras proteínas.

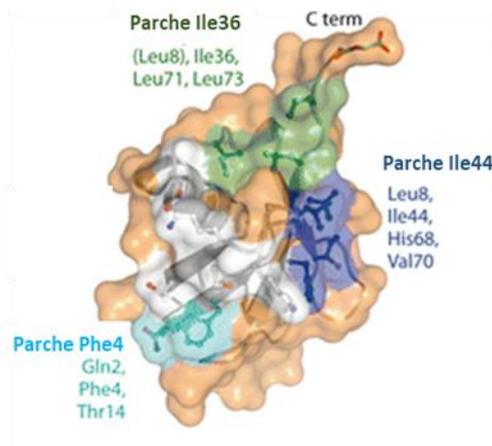
El alto grado de conservación de la secuencia de ubiquitina podría explicarse por las múltiples funciones en las que se encuentra envuelta.

### *Principales dominios funcionales de Ubiquitina*

1. Interacciona con otras proteínas adoptando diferentes conformaciones a través de la Leu<sup>8</sup> (situada en el primer bucle) (Lange *et al.*, 2008).
2. El denominado parche hidrofóbico constituido por Ile<sup>44</sup>, Leu<sup>8</sup>, Val<sup>70</sup> e His<sup>68</sup>, interactúa con el proteosoma mediante la Ile<sup>44</sup>, así como, con otras proteínas que se unen a ubiquitina.
3. La región formada por los residuos situados alrededor de Phe<sup>4</sup>, incluidos los residuos Thr<sup>12</sup> y Gln<sup>2</sup>, interactúa con el dominio DUB de proteasas de Ub a través de Phe<sup>4</sup> (Hu *et al.*, 2002).

Aunque podrían existir interacciones adicionales que no sean tan esenciales, aún no se han descubierto. Lo que sí se sabe, es que existen múltiples

superficies y conformaciones de ubiquitina que proporcionan diversas interacciones, dando lugar a los diferentes resultados (Figura 6).



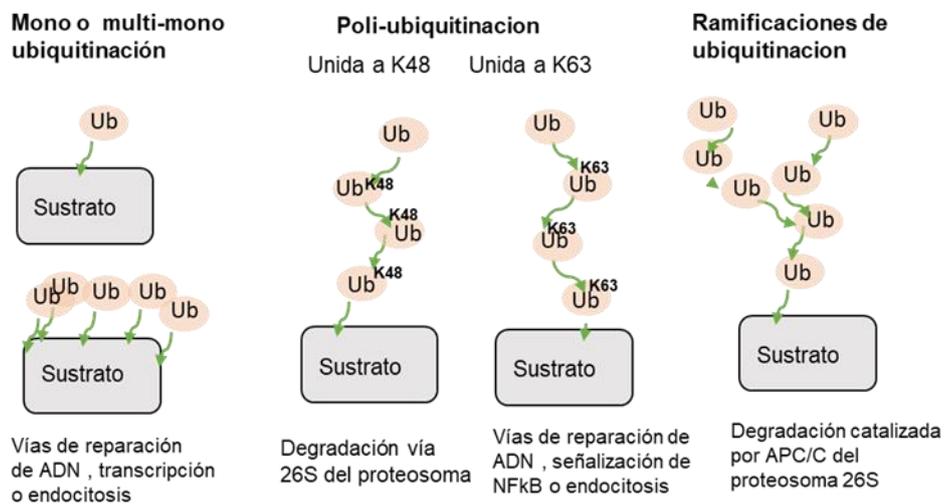
**Figura 6.** Representación de dominios funcionales de Ubiquitina. Se muestran los residuos de aminoácidos más importantes de los distintos dominios. Adaptada de Komander & Rape 2012.

### *Unión de la ubiquitina al sustrato*

El carbono terminal de la ubiquitina puede unirse por una única modificación de la proteína a su sustrato (monoubiquitinación), por modificación de una ubiquitina en múltiples sitios de un mismo sustrato (multi-monoubiquitinación), o bien, covalentemente a otra ubiquitina a través de uno de los siete grupos lisilo  $\epsilon$ -amino o su grupo amino N-terminal, formando cadenas de ubiquitina (poliubiquitinación).

Además del número de moléculas de Ub unidas al sustrato, también podemos diferenciar distintos tipos de cadenas en función de que los enlaces Ub-Ub formen conformaciones distintas. De esta forma podemos distinguir conformaciones homotípicas en las que las cadenas de ubiquitina

comprenden un sólo tipo de enlace, es decir, las distintas Ub que forman las cadenas se unen mediante el mismo residuo de Lys para crear la cadena; y heterotípicas en las que las cadenas de Ub contienen enlaces mixtos dentro del mismo polímero pudiendo incluso ramificarse *in vivo*, encontrándose cadenas de Ub con enlaces mediante diferentes residuos de Lys (Meyer & Rape, 2014) (Figura 7).



**Figura 7. Conjugación de ubiquitina.** Una sola molécula (mono-ubiquitinación) o múltiples (multimono-ubiquitina) pueden unirse al sustrato. Las cadenas pueden ser homogéneas ligadas a único residuo o bien a K48 o a K63, cuando están unidas a diferentes sitios aceptores en una sola molécula de ubiquitina se denominan heterogéneas. Los diferentes enlaces de ubiquitina varían en estructura y, por lo tanto, reclutan a otras proteínas asociadas que interactúan para producir señales únicas aguas abajo. Adaptada de Buetow & Huang, 2016.

Las moléculas de ubiquitina también pueden modificarse por medio de diversos tipos de modificaciones post-traduccionales, incluida la acetilación (Ohtake *et al.*, 2015) y la fosforilación (Kane *et al.*, 2014; Kazlauskaitė *et al.*, 2014; Koyano *et al.*, 2014; Ordureau *et al.*, 2014; Swaney *et al.*, 2015). Estas MPTs representan una capa adicional de regulación de la señalización y/o diversificación de la ubiquitina (Herhaus & Dikic, 2015). Durante muchos

años, la investigación de ubiquitina se limitó a los polímeros más abundantes *in vivo* de K48 y K63. Pero gracias a las nuevas tecnologías, a finales del 2000 fue posible la realización de estudios más detallados sobre cadenas de ubiquitina en otros residuos atípicos como K11 y Met1, encontrando que ejercían su papel en el control del ciclo celular humano y la señalización de citosina, respectivamente (Shimizu *et al.*, 2015; Wickliffe *et al.*, 2011). Otros residuos de unión de ubiquitina son K33, K6 y K29 (Kim *et al.*, 2013; Maor *et al.*, 2007). El residuo K27 es una lisina no superficial que está expuesta (Kim *et al.*, 2013) de la que aún en *Arabidopsis* no se tienen datos, pero se han identificado enlaces Ub-Ub a través de K27 en células de levadura y mamíferos (Meierhofer *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009), gracias a cambios conformacionales que permiten la exposición de este residuo. Las cadenas lineales de Ub (unidas a través del grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>) no se vieron en los estudios proteómicos de ubiquitina en *Arabidopsis*, ya que utilizan un conjunto distinto de proteínas que interactúan aguas abajo que "interpretan" las diversas señales de Ub, indicando este hecho que, el patrón de ubiquitinación dicta eventos posteriores. La poliubiquitinación, especialmente ligada a K48, promueve la degradación vía proteosoma 26S, mientras que la monoubiquitinación promueve la internalización de proteínas de membrana plasmática. La poliubiquitinación ligada a K63 puede promover el tráfico vía endosomal, así la presencia de Ubs unidas en K63 presentan mayor avidez a adaptadores de unión a Ub que aumentan las tasas de endocitosis (Galan & Hagenauer-Tsapis, 1997; Paiva *et al.*, 2009; Romero-Barrios & Vert, 2018; Sato *et al.*, 2009; Sims *et al.*, 2009; Yu & Xie,

2017). Aunque una única Ub es suficiente para activar el reconocimiento por parte de adaptadores de internalización endocíticos similares a Epsin/Eps15 que interactúan con clatrina (Haglund *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 2002). Una vez se produce la internalización de proteínas ubiquitinadas, éstas son sometidas a reciclaje, pudiendo producirse desubiquitinación, o bien, proceder hacia la degradación por medio de la vía lisosomal/vacuolar. La ubiquitinación/desubiquitinación es un proceso clave para el tráfico intracelular (Tanno & Komada, 2013; Tian & Xie, 2013).

Otro de los objetivos con el que se pretende ahondar en el conocimiento es mediante el estudio del funcionamiento del sistema más allá de las cadenas de poliubiquitinación o de las vías de degradación, es decir, la identificación de proteínas susceptibles de ubiquitinación, así como los sitios de ubiquitinación dentro de ellas. Para intentar arrojar luz en esta materia, se han llevado a cabo análisis proteómicos cuyos resultados han sido la identificación de una serie de proteínas sustrato del sistema ubiquitina (Kim *et al.*, 2013; Manzano *et al.*, 2008; Maor *et al.*, 2007; Saracco *et al.*, 2009). Hasta el momento, se ha conseguido revelar 216 sitios de ubiquitinación distintos, permitiendo la identificación de secuencias consenso conservadas que permiten predecir los residuos de lisilo susceptibles de ser los residuos de unión de la ubiquitina (Kim *et al.*, 2013).

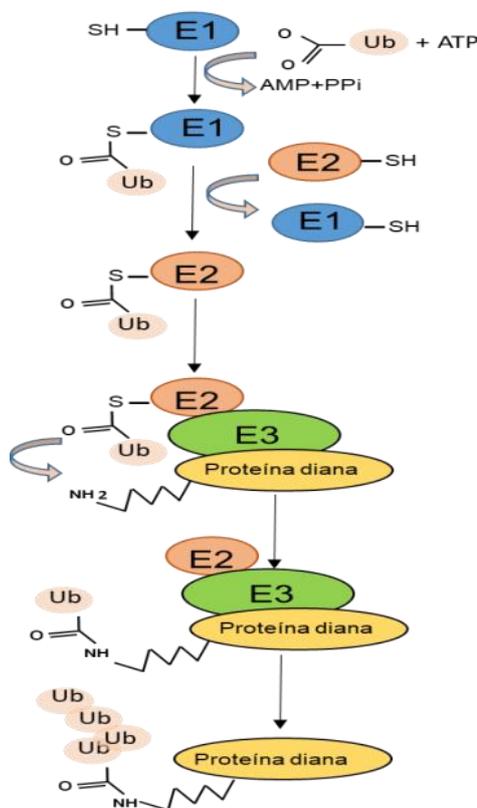
En *Arabidopsis* existen doce genes que codifican ubiquitina. El primero que fue identificado es el gen *UBQ1* (At3g52590), también llamado “Early Responsive to Dehydration” (*ERD16*) ya que fue aislado como un ARN

mensajero (ARNm) inducido en hojas después de 1 hora de tratamiento de sequía (Kiyosue *et al.*, 1994). Otro de los genes *UBQ2* (At2g36170), codifica la misma fusión de polipéptidos de ubiquitina. De los genes de poliubiquitina, el que tiene una mayor expresión constitutiva es *UBQ10* (Sun & Callis, 1997), siendo su expresión hasta cuatro veces mayor que el resto de genes de ubiquitina (en el 98% de las muestras, según datos de [www.geneinvestigator.com](http://www.geneinvestigator.com)) (Zimmermann *et al.*, 2004). El promotor de *UBQ10* se ha incorporado a los vectores de expresión de plantas para la expresión constitutiva de genes (Chen *et al.*, 2011; Grefen *et al.*, 2010) y se considera más o menos equivalente en expresión al promotor 35S en *Arabidopsis* (Norris *et al.*, 1993).

### *Mecanismos de conjugación de ubiquitina*

El proceso de unión de Ub, conlleva una cascada ordenada en tres pasos secuenciales (Figura 8). **Paso 1** interviene la enzima llamada “**enzima activadora**” de ubiquitina (E1). En *Arabidopsis*, la E1 interviene en un proceso dependiente de ATP. El AMP generado tras la ruptura, se liga al carboxilo terminal de la ubiquitina, formando un adenilato de ubiquitina que permanece unido de forma no covalente a E1 y libera pirofosfato. **Paso 2**, la ubiquitina se transfiere a un residuo cisteína del sitio activo, de E1 intercambiando el enlace anhídrido de acil fosfato de alta energía con AMP mediante un enlace tioéster. Posteriormente el AMP se libera. Por último, mientras una ubiquitina permanece unida formando el enlace tioéster a E1, se forma otro adenilato de ubiquitina, que llena el sitio de unión de adenilato

de ubiquitina que queda vacante después del paso dos. El **Paso 3** no es necesario para la activación de la ubiquitina, pero en condiciones fisiológicas, principalmente existe E1 como un complejo ternario de ATP, ubiquitina y E1~ubiquitina (Haas & Rose, 1982; Haas *et al.*, 1983)

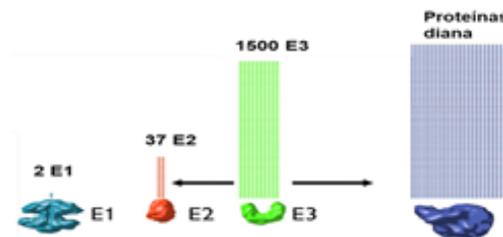


**Figura 8.** Esquema de activación y transferencia de Ub. Se muestran la participación sucesiva de las distintas enzimas (E1, E2 y E3) implicadas en el transporte y unión de Ub hasta la proteína diana.

La actividad E1 está codificada en Arabidopsis por dos genes relacionados, “UBIQUITIN ACTIVATING 1” (*UBA1*, At2g30110) y *UBA2* (At5g06460) (Hatfield *et al.*, 1997). Tanto *UBA1* como *UBA2* activan la ubiquitina y la transfieren a varias E2 diferentes con la misma eficacia en ensayos *in vitro* (Hatfield *et al.*, 1997). Por último, las encargadas de transferir la ubiquitina al sustrato son las E3 ligasas. Son los elementos más abundantes y diversos en la maquinaria de ubiquitinación.

El genoma de Arabidopsis contiene más de 1400 genes que codifican distintas E3s, ya sean E3 ligasas monoméricas o E3 ligasas formadas por múltiples subunidades

denominadas también multiméricas (Figura 9). A través de su interacción, permiten la unión y ubiquitinación de dianas específicas (Mazzucotelli *et al.*, 2006).

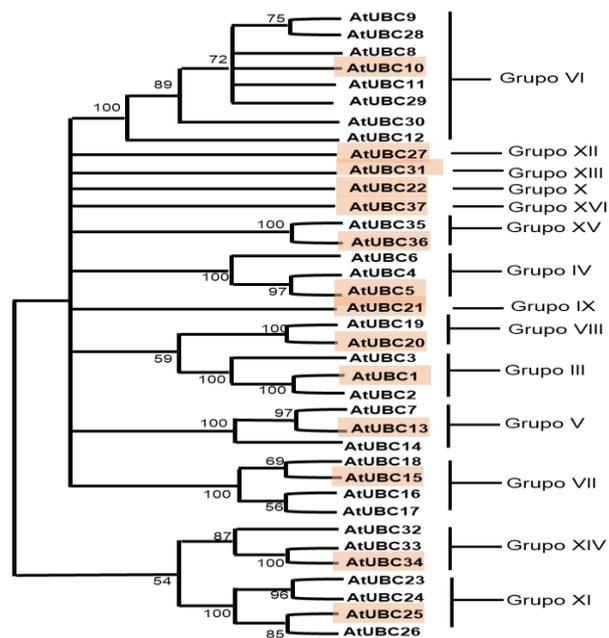


**Figura 9.** Representación de la cantidad proporcional de enzimas E1, E2 y E3 encargadas de realizar el proceso de ubiquitinación en Arabidopsis.

### Las proteínas E2 (UBCs)

Las E2 o UBCs (“Ubiquitin Conjugating Enzymes”) presentan un residuo de Cys que acepta la Ub unida a las E1 y posteriormente la transfiere a la proteína diana (ayudada por una E3) o bien a un residuo de Cys de E3 ligasas (de los de tipo HECT o RBR) siendo estas E3 las que finalmente transfieren la Ub al sustrato. Los E2 contienen una región conservada para Ub de aproximadamente 140 a 200 aminoácidos llamada dominio UBC. El residuo de cisteína requerido para la formación de tioéster está contenido dentro de esta región. Las E2 de Arabidopsis poseen siete proteínas con una variación de la enzima E2 denominados E2v o AtUEVs que carecen del residuo de cisteína del sitio activo. UEV modula la actividad E2 para catalizar la formación de tipos específicos de enlaces o longitud de la cadena (Andersen *et al.*, 2005). Se han descrito 37 proteínas E2 en Arabidopsis, en este punto la pregunta que subyace es si sólo se conocen dos E1, cómo es posible que

hay 37 E2. La respuesta más sencilla es pensar que las múltiples E2 tienen funciones bioquímicas especializadas. Análisis filogenéticos realizados entre E2 de varias especies indican que hay siete familias de enzimas E2 en todas las eucariotas, pero en *Arabidopsis* y humanos, existen unas siete familias adicionales, por lo que su subconjunto es de 14 “tipos” (Michelle *et al.*, 2009) (Figura 10).



**Figura 10. Análisis filogenético y clasificación de las enzimas E2 *Arabidopsis*.** Las 37 UBCs (E2) de *Arabidopsis* se alinearon usando el algoritmo ClustalW (gap-open 10; gap-extension 0.1) y se mostraron usando MEGA7 software. Se usaron secuencias alineadas para construir un árbol filogenético basado en el método de unión después del análisis bootstrap para 1000 repeticiones. Los E2 representativos de cada uno de los 14 grupos están marcados en fondo rosa. Adaptada de Ahn *et al.*, 2018.

No parece que hallan subfamilias específicas de plantas, aunque algunas subfamilias de E2 de *Arabidopsis* pueden tener funciones especializadas, como en la subfamilia XI (UBC23-26; At2g16920, At2g33770, At3g15355,

At1g53020, respectivamente) que parece tener una función biológica única. Los mutantes con pérdida de función del *FOSFATO 2(pho2/ubc24)* hiperacumulan fosfato inorgánico en las hojas que conducen a la necrosis, este fenotipo se vio reflejado en la sobreexpresión constitutiva del micro-ARN en concreto miR399 (Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006). Los sitios de unión de micro ARN en *PHO2* indican que su regulación recíproca es directa. *PHO2* se localiza en membranas e interactúa con *PHO1*, un translocador transmembrana de  $P_i$  que se hiperacumula en el mutante de pérdida de función *pho2* (Liu *et al.*, 2012). Si bien hay dos E2 similares a *PHO2*, sus mutantes de pérdida de función no tienen alteración de la acumulación de  $P_i$  (Eifler, 2010). Se han descrito otras E2 que también tienen funciones más especializadas en estrés en plantas. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las principales E2 descritas de plantas.

**Tabla 3.** E2 con diferentes funciones conocidas adaptada de Weigang Liu *et al.*, 2020.

Enzima E2	Especie	Descripción de funciones generales	Referencias
<i>NtUBC1</i>	<i>N. tabacum</i>	Tolerancia al cadmio	Bahmani <i>et al.</i> , 2017
<i>LeUBC1</i>	<i>L. esculentum</i>	Choque térmico y cloruro de cadmio	Feussner <i>et al.</i> , 1997
<i>VrUBC1</i>	<i>Mung Bean</i>	Salinidad / ABA / estrés por sequía	Chung <i>et al.</i> , 2013
<i>AtUBC1</i>	<i>A. thaliana</i>	Regula el tiempo de floración	Xu <i>et al.</i> , 2009
<i>OgUBC1</i>	Arroz	Ácido salicílico / resistente a <i>Botrytis cinerea</i> y Radiación UV-B	Jeon <i>et al.</i> , 2012
<i>Ubc2/Rad6p</i>	Levadura y plantas	(Degradación asociada a RE)/histona/ubiquitinación /tiempo de floración /sal y tolerancia a la sequía	Wijk & Timmers, 2010 Qin, 2013 Cao <i>et al.</i> , 2008 Imura <i>et al.</i> , 2015 Popovic <i>et al.</i> , 2014

INTRODUCCIÓN

Continuación

<b>AhUBC2</b>	Plantas de cacahuete deshidratadas	Tolerancia a estrés hídrico	Wan, X. <i>et al.</i> , 2011
<b>GmUBC2</b>	Soja	Tolerancia a la sal y la sequía / homeostasis de iones	Zhou <i>et al.</i> , 2010
<b>TaU4</b>	Trigo	Defensa frente a <i>Septoria</i>	Millyard <i>et al.</i> , 2016
<b>Ubc7</b>	-----	ERAD	Cohen <i>et al.</i> , 2015
<b>OsUBC13</b>	Arroz	Estrés biótico y abiótico / PRR sin errores (reparación posterior a la replicación)	Zang <i>et al.</i> , 2012
<b>AtUBC13</b>	<i>A. thaliana</i>	DDT sin errores (tolerancia al daño del ADN)	Wen <i>et al.</i> , 2006 Li <i>et al.</i> , 2010
<b>ShUbc13</b>	<i>S. histriomuscorum</i>	Respuesta al daño del ADN	Grisvard <i>et al.</i> , 2010
<b>Fni3/SI-Ubc13-2</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inmunidad en plantas	Mural <i>et al.</i> , 2013
<b>RCE1(UBC12)</b>	<i>A. thaliana</i>	Respuesta a auxinas	Del Pozo & Estelle, 1999
<b>UBC18</b>	<i>A. thaliana</i>	Respuestas a la sequía y al estrés salino	Cheng <i>et al.</i> , 2017
<b>UBC21/PEX4</b>	<i>A. thaliana</i>	Desarrollo de raíz	Zolman <i>et al.</i> , 2005
<b>UBC22</b>	-----	Fuerte E3 Actividad independiente para formar cadenas de Ub	Kraft <i>et al.</i> , 2005 Wiborg <i>et al.</i> , 2008
<b>UBC24/PHO2</b>	<i>A. thaliana</i>	Homeostasis de fosfato	Bari <i>et al.</i> , 2006
<b>TaUBC28</b>	Trigo	Desarrollo de espigas	Hong & Seo, 2014
<b>AtUBC32</b>	<i>A. thaliana</i>	Sequía / oxidativo / estrés salino / ERAD	Ahn <i>et al.</i> , 2018 Cui <i>et al.</i> , 2012 Liu <i>et al.</i> , 2020 Chen <i>et al.</i> , 2016
<b>AtUBC33</b>	<i>A. thaliana</i>	Estrés por sequía	Ahn, M.Y. <i>et al.</i> , 2018
<b>AtUBC34</b>	<i>A. thaliana</i>	Estrés por sequía	Ahn, M.Y. <i>et al.</i> , 2018

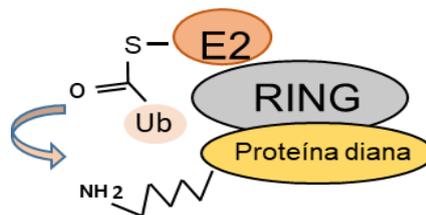
### *Proteínas E3 ubiquitina ligasas*

Como se ha indicado anteriormente, las E3 ligasas de Ub, son enzimas que se caracterizan por su capacidad de transferir la Ub activa (unidas mediante enlaces tioéster a Cys) a sus sustratos correspondientes. En base al mecanismo de transferencia, tradicionalmente las E3 ligasas han sido clasificadas como RING/U-box, HECT y RING-in-between RING (RBR) tras la identificación de estas últimas E3 ligasas (Smit & Sixma, 2014; Wenzel *et al.*, 2011).

También pueden clasificarse según el tipo de dominio que participa en la interacción con la E2-Ub (Stone, 2019) del siguiente modo tipo RING, tipo HECT y tipo U-box.

Para este trabajo adoptaré la clasificación tradicional de RING/U-box, HECT y RBR.

1. Las de tipo RING (RING/U-box), forman un complejo junto con la E2 y el sustrato, mediando la transferencia de Ub desde la E2 hasta el sustrato (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema representativo de una E3 tipo RING/Ubox

2. Las E3 tipo HECT forman un estado intermedio de transferencia por unión covalente con la Ub, antes de unir el sustrato y cederle la Ub (Figura 12).

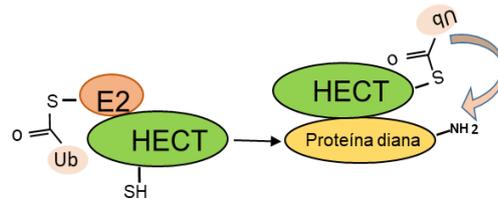


Figura 12. Esquema representativo de una E3 tipo HECT

3. Las E3 de tipo RBR utilizan un modo híbrido de transferencia de Ub entre las E3s de tipo RING y las de tipo HECT, en ellas, la E2 se une al RING1 cediéndole la Ub hacia el RING2 y desde aquí lo transfiere hasta el sustrato (Wenzel & Klevit, 2012; Wenzel *et al.*, 2011) (Figura 13).

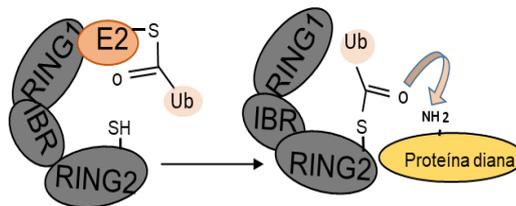
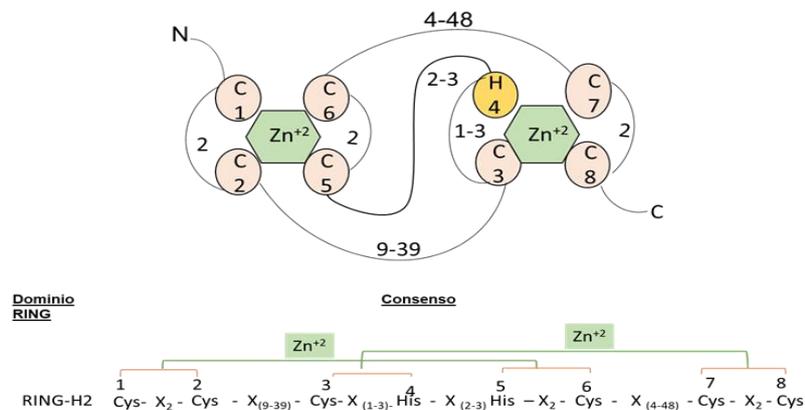


Figura 13. Esquema representativo de una E3 tipo RBR.

### E3 ligasas tipo RING

Las E3 ligasas de tipo RING (“Really Interesting New Gene”) se caracterizan por compartir el dominio RING. Este dominio consta de una región de aproximadamente 40-60 aminoácidos que contiene un octeto de residuos de cisteína e histidina espacialmente conservados que unen dos átomos de zinc (Zn). Estos dominios RING difieren estructuralmente de los factores de transcripción de dedo de Zinc, en el espaciamiento de los residuos Cys/His,

donde no hay un orden lineal de quelantes metálicos(ml). Numerados desde el N-terminal hasta el C-terminal de la cadena de polipéptidos ml1 y ml2 junto con ml5 y ml6 se unen al primer átomo de zinc, mientras que ml3 y ml4 junto con ml7 y ml8 se unen al segundo ion de zinc (Figura 14), formando lo que se denomina un refuerzo cruzado de la estructura secundaria típico de estos RING (Stone *et al.*, 2005).



**Figura 14.** Se muestra la estructura de enlaces de Zinc característicos de las E3 ligasas tipo RING. Adaptada de Eshaies, & Joazeiro, 2009

El genoma de *Arabidopsis* contiene unas 490 proteínas con dominios RING las cuales presentan variaciones del dominio canónico RING por lo que aumenta aún más la diversidad de estos tipos de RING (Stone *et al.*, 2005). La mayoría de los RING se presentan como dominios únicos, pero existen subgrupos que contienen dominios adicionales que facilitan la interacción con el sustrato como las repeticiones Ankyrin, Breast Dominio de carboxilo terminal (BRCT), factor de von Willebrand tipo A (vWA) y repeticiones WD40 o bien formando complejos con otras proteínas.

### La familia E3 ligasa de tipo RING Dominio Ligasa (RGLG)

Las E3 ligasas RGLG presentan además del RING el dominio adicional factor von Willebrand tipo A (Stone *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020) (Figura 15).



Figura 15. Dominio vWA característico de las E3 ligasas RGLG.

Estas E3s ligasas en planta están relacionada con señalización de auxina, respuesta a estrés por sequía y procesos de señalización de Jasmónico (JA) (Cheng *et al.*, 2012; Li & Schmidt, 2010; Nagels *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012, 2015b)

La familia RGLG está formada por cinco miembros RGLG1–5 de los cuales RGLG1 (At3g01650), RGLG2 (At5g14450) y RGLG5 (Atg67800) se clasifican en una rama diferente a RGLG3 (At5g63970) y RGLG4 (At1g79380) (Xu Zhang *et al.*, 2012). RGLG1/2/5 interactúan con las enzimas E2 UBC35/36 formando cadenas de poliubiquitina unidas a K63 (Li & Schmidt, 2010), cuyo sustrato principal es la proteína PIN2 relacionada con señalización de auxinas (Leitner *et al.*, 2012). Por otra parte, RGLG1 y RGLG2 producen poliubiquitinación ligada a K48 del FACTOR DE RESPUESTA DE ETILENO 35 (ERF35) (Cheng *et al.*, 2012). En lo que respecta a respuestas de estrés abiótico tales como frío, estrés osmótico y salino, así como frente a ABA, RGLG1 está altamente inducido, aunque esta respuesta no se observa en RGLG2. Las plantas sobreexpresoras RGLG1 son hipersensibles a ABA ya que aumentan la

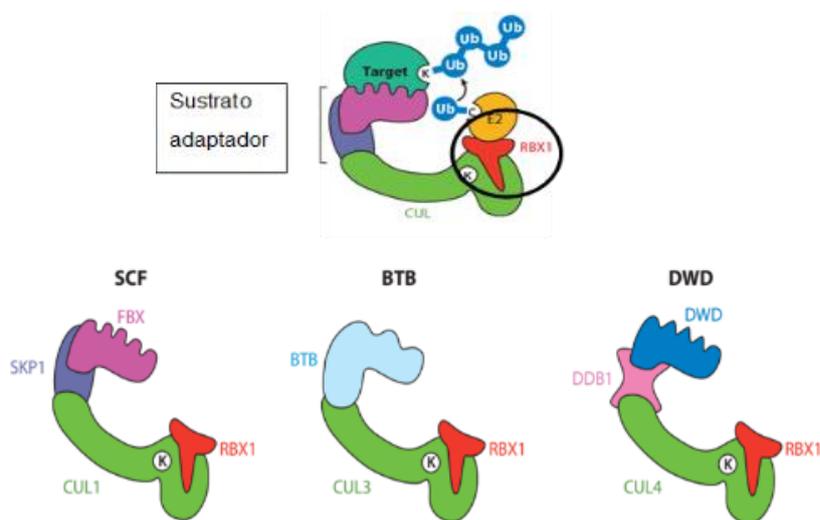
degradación de PP2CA (Wu *et al.*, 2016). Por el contrario, RGLG2 es un inhibidor de respuesta a sequía (Cheng *et al.*, 2012). Tanto RGLG1 como RGLG2 presentan miristoilación en el extremo N-terminal (Yin *et al.*, 2007), y ambas se encuentran asociadas a membranas. En estudios realizados por Belda-Palazon *et al* en 2019 se describe como el ABA inhibe la miristoilación de RGLG1 a través de la regulación negativa de miristoiltransferasa 1 (NMT1) que modifica la localización subcelular de RGLG1, promoviendo su interacción nuclear con PP2CA. Estudios realizados en nuestro laboratorio y en colaboración con el Profesor An (Universidad de Pekín) muestran que el ABA induce la degradación de PP2CA a través de las E3 ligasas RGLG1/5 vía proteosoma 26S, y en condiciones *in vivo* el ABA actúa mejorando la interacción de RGLG1/5 con PP2CA lo cual es reforzado por la interacción simultánea con los PYR/PYL/RCARs que se describe en (Belda-Palazon *et al.*, 2019).

### E3 ligasas multiméricas basadas en CULINAS (CRL) y complejo APC

Hasta ahora, hemos descrito proteínas E3 ligasas monoméricas (formadas por una única subunidad que incluye todos los dominios funcionales para ejercer la actividad E3 ligasa). Sin embargo, existe la posibilidad de que las E3 ligasas necesiten de múltiples subunidades para ejercer su actividad, presentando una subunidad con un dominio de tipo RING que se enlaza a E2-Ub. Las E3 ligasas basadas en CULINA realizan la unión al sustrato mediante una proteína alargada que sirve de andamio de diferentes

subunidades de proteínas que se encargan de que la unión y el reconocimiento del sustrato sea adecuada y precisa (Hua & Vierstra, 2011). Están representadas en Arabidopsis por medio de seis proteínas similares a Culina, CULLIN1 (CUL1: At4g02570), CULLIN2 (en adelante, CUL1b: At1g02980 para evitar confusión con Cul2 humano), CULLIN3a (CUL3a: At1g25830), CULLIN3b (CUL3b: At1g69470), CULLIN470: At5g46210) y COMPLEJO PROMOTOR DE ANAFASE2 (APC2: At2g04660) (Choi *et al.*, 2014) derivadas de las 3 familias principales CUL1, CUL3, CUL4, difiriendo básicamente en el modo de ensamblaje de las distintas subunidades (Gingerich *et al.*, 2005). La región C-terminal de las CUL contiene 2 dominios helicoidales que crean una hendidura en forma de V. Esta hendidura queda fuertemente ocupada por la hélice N-terminal de RBX1 (proteína RING RBX1a de ~16 kDa (“RING BOX 1”, At5g20570)) (Gray *et al.*, 2002; Lechner *et al.*, 2002) para crear un núcleo catalítico estable CUL/RBX1. El dominio RING en RBX1 proporciona una plataforma de acoplamiento para enzimas E2 cargados con ubiquitina activada y la unión del E2-Ub a este bolsillo promueve alostéricamente la transferencia de la ubiquitina desde esa E2 directamente al sustrato (Kleiger *et al.*, 2009). Los mutantes de pérdida de función de RBX1 en las plantas no son viables, por lo que indica que se trata de un gen esencial (Lechner *et al.*, 2002). Además, CUL presenta en la región C-terminal una Lys que sirve de unión a NEDD8/RUB1 (“NEURONAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTARY DOWNREGULATED8/RELATED TO UBIQUITIN”), péptido relacionado con la Ub que se encuentra en todos los eucariotas, (Duda *et al.*, 2008; Saha & Deshaies, 2008) y que

interviene en la regulación de la actividad de los complejos CRL. Cuando el péptido NEDD8/RUB se une a CUL produce un cambio conformacional entre la CUL y la proteína RBX1 que promueve el reclutamiento de las E3 y su aproximación al sustrato a ubiquitinar. El proceso de unión del péptido NEDD8/RUB1 se denomina nedilación, una vez se ha producido el proceso de ubiquitinación del sustrato se produce el denominado proceso de denedilación llevado a cabo por el complejo signalosoma COP9 (CSN) (Chamovitz *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1994) que consigue separar a NEDD8/RUB de la CUL y la desunión del complejo formado inactiva a CUL hasta un nuevo suceso de activación por nedilación. En la posición N-terminal se encuentra una zona hidrofóbica/polar que crea un bolsillo que sirve como adaptadores de sustrato. En plantas se han descrito tres complejos SKP1-Cullin-1-F-box (SCF), CRL3 BTB y CRL4 DWD (Figura 16).



**Figura 16.** Organización de subunidades de Culina –RING ligasas (CRL) encontradas en plantas y diversas configuraciones de adaptador de sustrato, SCF, BTB y DWD, que se ensamblan con las isoformas CUL1, 3 y 4 respectivamente. Adaptada de Hua & Viestra, 2011.

En los procesos de regulación de los componentes principales de la ruta de señalización, E3 ligasas multiméricas como CUL3 (CLR3) y CLR4 tiene como su diana a PP2CA y receptores (PYL4, PYL8 y PYL9), respectivamente (Irigoyen *et al.*, 2014; Julian *et al.*, 2019).

Las **CRL3** tienen como adaptadores de unión a sustrato proteínas que contienen dos dominios conservados, el dominio BTB/POZ y el dominio MATH (Figura 18) siendo el primer dominio el de unión a CUL3 (Genschik *et al.*, 2013; Lechner *et al.*, 2011), y el segundo actúa como sitio de reconocimiento de secuencias consenso de péptidos en varios sustratos (tales como proteínas fosfatasa, FT e Histonas) (Zhuang *et al.*, 2009). Por este motivo las E3 ligasas CRL3-BTB también pueden ser llamadas CRL3<sup>BPM</sup> que es la denominación que voy a adoptar para designarlas. Las BPM en Arabidopsis está formada por una familia de proteínas constituida por seis miembros, BPM1 a BPM6. BPM3, BPM4 y BPM5 fueron identificadas en ensayos de espectrofotometría de masas co-inmunoprecipitadas con PP2CA. (Lechner *et al.*, 2011). En nuestro laboratorio, se ha demostrado que las proteínas adaptadoras de sustrato BPM3 y BPM5 reconocen a PP2CA y a otras fosfatasas claves para la señalización del ABA (Julian *et al.*, 2019) provocando su degradación y actuando probablemente como un mecanismo de desensibilización en respuestas a estrés.

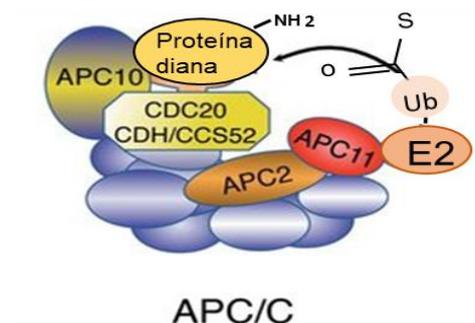
Las **CRL4** tienen como adaptador de sustrato proteínas denominadas ("DAMAGED DNA BINDING PROTEIN1") DDB1 que se asocian a proteínas ("CUL4-ASSOCIATED FACTORS") DCAF. Las proteínas DCAF se han

relacionado con repeticiones WD40 (estas repeticiones contienen de 40 a 60 aminoácidos y presentan un dipéptido triptófano-ácido aspártico (WD) en su C-terminal, (Higa & Zhang, 2007; van Nocker & Ludwig, 2003)). DCAF proporciona la especificidad de sustrato a los CRL4 (Bernhardt *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Un rasgo característico de la mayoría de las proteínas DCAF que se asocian con DDB1 es la presencia del motivo DWD (se conoce también como WDxR o DxR). El motivo DWD proporciona un sitio distintivo único de unión para DDB1 y consta de 16 aminoácidos, de los cuales 4 son residuos altamente conservados: Asp<sup>7</sup>, Trp<sup>13</sup>, Asp<sup>14</sup> y Arg<sup>16</sup> (He *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). En Arabidopsis se conocen 85 proteínas que contienen DWD. Independientemente de si se ha confirmado o no su asociación con CRL4, las proteínas DWD se encuentran a menudo como componentes de complejos proteicos multiméricos adicionales que desempeñan funciones clave en eventos nucleares esenciales.

La proteína adaptadora DDB1 también puede interactuar con “CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC10” (COP10) (La proteína COP10 es una enzima E2 modificada carente del residuo de Cys de unión a Ub y por tanto no tiene actividad de E2 pero facilita la actividad de las enzimas E2 canónicas) y “DE-ETIOLATE1” (DET1), que no presentan repeticiones WD40, formando un complejo estable denominado (“COP10-DET1-DDB1 complex”) CDD (Bernhardt *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2002; Yanagawa *et al.*, 2004) el complejo CDD puede actuar a su vez como adaptador facilitando el reconocimiento del sustrato, se han identificado más componentes de este complejo como la proteína “DET1, DDB1-

ASSOCIATED 1" DDA1 que interviene en respuesta a señales de desarrollo y estrés cuando se une a receptores de ABA PYL4, PYL8 y PYL9 facilitando la degradación vía proteosoma 26S (Irigoyen *et al.*, 2014; Pick *et al.*, 2007)

Otro tipo de ligasa E3 multimérica, son las **APC/C** (complejo promotor de anafase/ciclosoma) (Figura 17). En plantas, el APC/C consta de al menos 11 subunidades centrales, cada una de ellas está codificado por un único gen, excepto APC3. La APC2, una proteína similar a CUL y funciona como el andamio del complejo, mientras que el dominio RING es proporcionado por APC11 con cierta similitud a RBX1 (Fülöp *et al.*, 2005). El núcleo del complejo APC/C y sus activadores juegan papeles importantes en el crecimiento y desarrollo en plantas (Xu *et al.*, 2019). Se requiere APC8 para la meiosis masculina, pero en general no hay mucha información sobre este tipo de E3s ligasas multiméricas en plantas, aunque hay estudios que demuestran los receptores de ABA de *O. sativa* son dirigidos por el complejo APC/C (Lin *et al.*, 2015).



**Figura 17.** E3 ligasas multimérica APC/C, que requiere proteínas activadoras WD40 (CDC20/FZ y CDH1/FZR/CCS52) y muy probablemente también la subunidad DOC1/APC10 para reclutar sus sustratos. La subunidad del dedo RING-H2 APC11 (rojo) interactúa con una enzima conjugadora de ubiquitina E2 para estimular la reacción de ubiquitinación. Adaptada de Genschik *et al.*, 2013

### E3 ligasas U-box

El motivo U-box consta de aproximadamente 70 aminoácidos que sirve de sitio de acoplamiento a la E2. La estructura tridimensional de una proteína U-box de Arabidopsis, PLANT U-BOX 14 (PUB14, At3g54850), revelaron un pliegue de proteína que se parece mucho a un dominio RING, pero los residuos de cisteína e histidina que conforman la estructura de RING que quelan  $Zn^{+2}$  son reemplazados por una red de enlaces de hidrógeno utilizando cadenas laterales de cisteína, serina y glutamato. La estructura terciaria también se estabiliza mediante interacciones hidrófobas y puentes salinos (Andersen *et al.*, 2004). Actualmente han sido descritas bajo esta estructura unas 64 U-box también nombradas como PUB.

La mayoría de los PUB contienen uno o más dominios adicionales fácilmente identificables. Inicialmente se organizaron en cinco tipos según el dominio (Azevedo *et al.*, 2001), pero esta organización inicial se ha ampliado a trece tipos (Yee & Goring, 2009). De las 63 ligasas de tipo U-box 41 de ellos contienen un número variable de repeticiones de armadillo (ARM), mientras que los otros 15 contienen un dominio quinasa. *PUB49* (At1g66160) tiene actividad de ubiquitinación *in vitro* y actividad de isomerasa cis-trans peptidil-prolil. Los PUB están involucrados en procesos de autoincompatibilidad, respuestas hormonales, defensa y respuestas al estrés abiótico (Yee & Goring, 2009). Ejemplos de estas E3 ligasas en respuestas principalmente a estrés son las U-box PUB12/13. Estas tienen su diana en la fosfatasa ABI1 de la señalización de ABA. El nivel de ARNm para

varios PUB aumenta en respuesta a ABA, así *PUB19* aumentó después de 3-5 horas en 50  $\mu$ M ABA, en un orden de 160 veces (Hoth *et al.*, 2002). Las plantas con pérdida de función para *pub18 pub19* mostraron hipersensibilidad a ABA, mientras que las plantas sobreexpresoras para *PUB18* y *PUB19* mostraron insensibilidad a ABA (Liu *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012). En respuesta a estrés, un ejemplo son las E3 ligasas U-box *PUB22/23* que degradan el receptor *PYL9* (Zhao *et al.*, 2017).

### E3 ligasas tipo HECT

Los E3 ligasa de tipo HECT (Homóloga E6-AP Carboxi Terminal) reciben este nombre por el dominio conservado de aproximadamente 50 aminoácidos presente en la proteína humana E6-AP (proteína asociada a E6) que fue la primera en analizarse. Hay siete proteínas HECT en *Arabidopsis* divididas en cuatro (Downes *et al.*, 2003) o cinco (Marín, 2013) subfamilias dependiendo de la identidad de aminoácidos. Las proteínas HECT se denominan LIGASAS DE PROTEÍNA DE UBIQUITINA (UPL) en *Arabidopsis*. *UPL1* (At1g55860) y *UPL2* (At1g70320) son proteínas similares en un 85% y poseen un gran tamaño, aproximadamente 3700 aminoácidos. Usando ensayos de ubiquitinación *in vitro* independientes del sustrato, el dominio HECT de *UPL1* fue activo sólo con la E3 genérica *UBC8*; las E2 *UBC1*, *UBC4* y *UBC7* en ensayos en paralelo, no estuvieron activas (Bates & Vierstra, 1999).

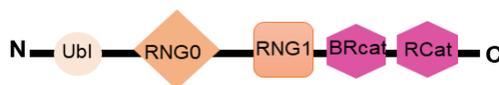
Existen otras E3 ligasas HECT como *UPL5* la cual regula la senescencia en hojas uniéndose al factor de transcripción *WRKY53* (Zentgraf *et al.*, 2010). En

*Brassica rapa* hay descritos 10 genes HECT, que responden en condiciones de estrés por salinidad y en sequía (Alam *et al.*, 2019).

### E3 ligasa de tipo RBR

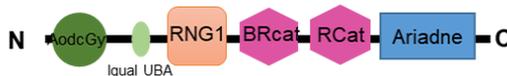
A diferencia de las ligasas E3 tradicionales de tipo RING o HECT, todas las ligasas RBR identificadas hasta la fecha son proteínas complejas multidominio. Las RBR más estudiadas son las humanas, se sabe que existen al menos 14 RBRs, aunque sólo se han estudiado en detalle a 3 de ellas.

**1. Parkin** (Figura 18) cuyas funciones principales son la intervención en procesos de homeostasis y las mutaciones en el gen de *parkin* están asociadas a la enfermedad del Parkinson infantil (Kitada *et al.*, 1998; Pickrell & Youle, 2015).



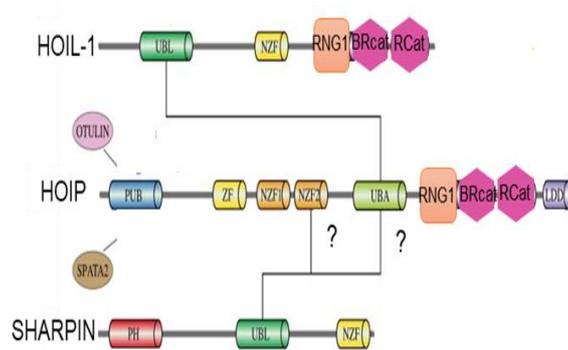
**Figura 18.** Esquema que muestra dominios principales de Parkin. Se observa los tres dominios RBR, RING y el dominio inhibitorio Ubi. Adaptada de Spratt *et al.*, 2014

**2. HHARI** (Figura 19) también conocida como **ARIH1** (“Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1”) sus funciones se asocian a procesos celulares tales como regulación de procesos del desarrollo, traducción de proteínas y proliferación celular (Dove *et al.*, 2017; Elmehdawi *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2003).



**Figura 19.** Esquema que muestra dominios principales de HHARI los tres dominios RBR dominio inhibitorio Ariadne y los dominios AodcGy e igual a UBA, en distintos tonos de verde. Adaptada de Spratt *et al.*, 2014.

**3. HOIP** que se trata de una subunidad del complejo LUBAC (Complejo Lineal de Ensamblaje de Ubiquitina), la complejidad de esta última se muestra en la Figura 20. Se han relacionado con múltiples funciones celulares como respuestas inmunitarias, en la inflamación, apoptosis y cáncer (Ikeda *et al.*, 2011; Rittinger & Ikeda, 2017; Tokunaga *et al.*, 2011).



**Figura 20.** Complejo LUBAC. Esquema de la composición del dominio de HOIP, HOIL-1L y SHARPIN. Se resaltan los dominios que median la interacción entre subunidades. El dominio UBL de HOIL-1L se une al dominio UBA de HOIP, mientras que la interacción entre SHARPIN y HOIP está menos definida y puede incluir los dominios NZF2 o UBA de HOIP, como lo indican los signos de interrogación. Adaptada de Rittinger & Ikeda, 2017

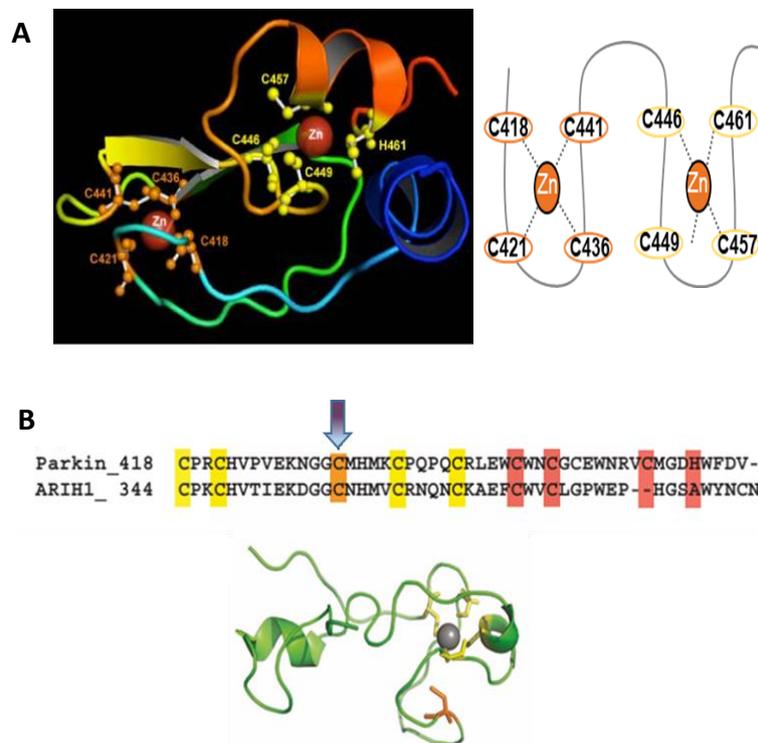
#### *Dominios característicos de RBR*

En un principio se sugirió que dos de los anillos contenían múltiples residuos de cisteína utilizados para coordinar iones de zinc que se ajustaban a la secuencia consenso de E3 ligasas tipo RING (RING1 y RING2) (Marín & Ferrúst, 2002; Marín *et al.*, 2004). Se identificó también, un tercer dominio denominado IBR (“In Between RING”) con los característicos residuos de cisteína que se encontraban en las secuencias RING, (Morett & Bork, 1999). Así nació la nomenclatura RBR. Estudios posteriores (Capili *et al.*, 2004; Hristova *et al.*, 2009; Maruyama *et al.*, 2000), determinaron que el “RING2” no se ajustaba a la estructura canónica de una E3 ligasa de tipo RING ya que presenta una cisteína que podría actuar como una cisteína activa para la

unión de Ub, y que podía ser transferida a proteínas diana y se sugiere una nominación más correcta como dominio Rcat (requerido para la catálisis), el dominio RING1 es el único que presenta la secuencia consenso de tipo RING y actuaría en realidad como una E3 ligasa de tipo RING uniendo E2-Ub. Por último, el dominio IBR, según los nuevos datos ya no estaría situado entre dos RING, sino que se ha observado que adopta el mismo pliegue que el dominio Rcat, mientras carece del residuo de cisteína activo y la actividad de ubiquitinación, por lo que, este dominio puede llamarse más apropiadamente BRcat (catalítico-benigno) (Spratt *et al.*, 2014). Por ello estas E3 se pueden encuadrar en un mecanismo único de transferencia de Ubiquitina ya que combina aspectos de la función de E3 ligasas de tipo RING y E3 ligasas de tipo HECT (Imai *et al.*, 2000; Moynihan *et al.*, 1999).

En Parkin el dominio RING2 posee 6 cisteínas altamente conservadas donde solamente 4 de ellas formaban uniones con  $Zn^{+2}$  quedando 2 cisteínas libres. Tras las mutaciones realizadas en una de estas dos cisteínas libres, concretamente la de la posición 431, sustituyéndola por un residuo de Ser, se observó que se interrumpía la transferencia de ubiquitina mediada por esta E3 ligasa. En estudios posteriores se realizó un cambio sistemático de todas las Cys conservadas del dominio a Ala, y se observó que producían la insolubilidad de la proteína, con la excepción del mutante Cys431Ala, sugiriendo este hecho que el residuo de Cys<sup>431</sup> no forma parte de la red de coordinación de  $Zn^{+2}$  en Parkin (Capili *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2000). También se ha identificado la cisteína de HHARI en posición 357 como la cisteína del sitio activo (Capili *et al.*, 2004; Hristova *et al.*, 2009). Esta cisteína

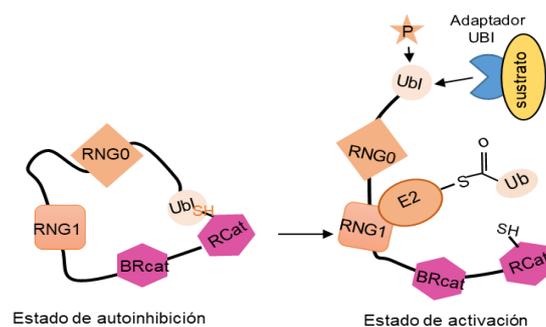
se encuentra también libre de enlaces de coordinación de  $Zn^{+2}$ , aunque la unión a estos enlaces puede diferir entre Parkin y HHARI, por este motivo Rankin y sus colaboradores propusieron un modelo del RING2 de Parkin con dos sitios de unión a  $Zn^{+2}$  compuestos de residuos C418, C421, C441, C436 y C446, C449, H461, C457 (Hristova *et al.*, 2009; Rankin *et al.*, 2011). Este modelo deja a la Cys<sup>431</sup> libre para formar un enlace tioéster con ubiquitina (Figura 21).



**Figura 21. A.** Modelo predictivo que explica los que dos iones de zinc pueden estar unidos en el RING2. Los residuos en los sitios de unión de zinc mostrados en naranja constituyen el primer sitio de unión y en amarillo el segundo sitio de unión. Adaptado de Rankin *et al.*, 2011. **B.** Comparativa del RING2 de HHARI y el RING2 de Parkin. Alineamiento de secuencias usando CLUSTALW. Se observan los residuos de cisteína que coordinan con  $Zn^{+2}$  en cada uno de los sitios predichos en Rankin *et al.*, 2011 en amarillo el sitio uno y en naranja el sitio dos, la cisteína del sitio activo se encuentra señalada mediante una flecha azul. Abajo se muestra la estructura del RING2 de HHARI donde en amarillo se muestran los residuos de cisteína que coordinan con  $Zn^{+2}$  (color azulado) en naranja se muestra el residuo de cisteína del sitio activo (PDB ID 1WD2). Adaptada de Wenzel & Klevit, 2012.

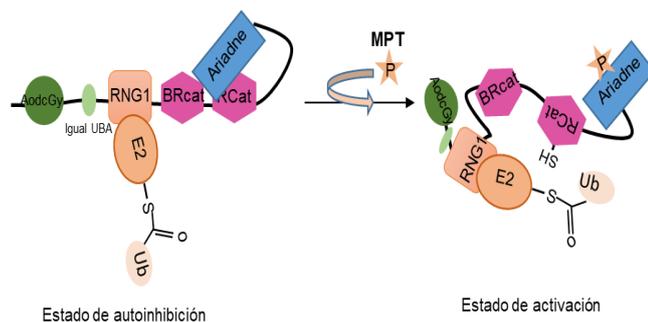
### Dominios inhibitorios

Aunque se tiende a pensar que las E3 ligasas son constitutivamente activas, estudios recientes indican que tanto E3 ligasas de tipo HECT como las de tipo RING están sujetas a regulaciones mediante fosforilación, la existencia de sustratos adaptadores en las de tipo Cullina o autoinhibición de la actividad catalítica como ocurre con la E2 *Smurf2* sobre las E3 ligasas de tipo HECT (Duda *et al.*, 2008; Kee & Huibregtse, 2007; Saha & Deshaies, 2008; Wiesner *et al.*, 2007). En la RBR de Parkin (Chaugule *et al.*, 2011). El dominio Ubl que se encuentra en posición N-terminal (Figura 22), se ha demostrado que es un dominio autoinhibitorio, ya que mutaciones en esta región hacen que Parkin sea constitutivamente activa. Staropoli y colaboradores demostraron previamente que existían formas de regulación de estas proteínas, mediante su unión a otras E3 ligasas de tipo CRL que se encontraban formando complejos necesarios para su activación.



**Figura 22.** Estado inactivo de la E3 ligasa RBR Parkin a través a través del dominio Ubl y su posterior activación debido a cambios en su conformación inicial por fosforilación (representada mediante una estrella naranja) o unión mediante un adaptador (representada en azul) al dominio Ubl. Adaptada de Duda *et al.*, 2013.

En HHARI el dominio autoinhibitorio se encuentra en el dominio C-terminal denominado Ariadne (Figura 23) el cual actuaría obstruyendo la cisteína del centro activo (Dove *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017).



**Figura 23.** Estado inactivo de la E3 ligasa RBR de HHARI a través del dominio Ariadne y su posterior activación debido a cambios en su conformación inicial por fosforilación (representada mediante una estrella naranja). Adaptada de Duda *et al.*, 2013.

### Ubiquitinación de sustrato

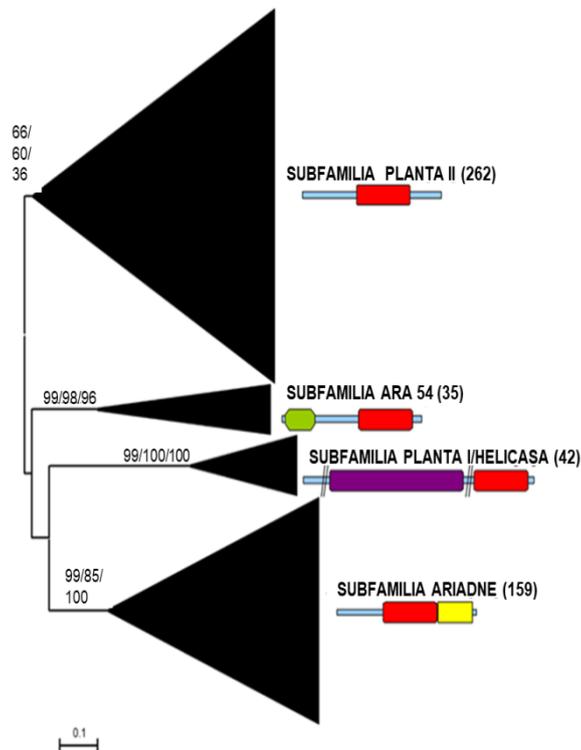
Es razonable pensar que tanto en las E3 ligasas de tipo HECT como en la RBR la especificidad de enlace de la Ub sea llevado a cabo por ellas mismas y no por la enzima E2 como ocurre con las E3 ligasas de tipo RING. La existencia del dominio tripartito flexible en RBR permite que estas E3 ligasas presenten, además múltiples niveles de regulación.

En cuanto a la especificidad de enlace de Ub con el sustrato llevado a cabo por el RING2 de las RBR se sabe que HOIP produce una ubiquitinación mediante cadenas lineales, debido al complejo LUBAC. Esta actividad requiere una región específica de HOIP que se une al aceptor ubiquitina, el LDD, que está parcialmente integrado en RING2 (Lechtenberg *et al.*, 2016; Müller-Rischart *et al.*, 2013; Stieglitz *et al.*, 2012, 2013). Parkin produce cadenas de poliubiquitina tanto en Lys<sup>48</sup> como en Lys<sup>63</sup>, así como monoubiquitinación y multimonoubiquitinación (Kumar *et al.*, 2017) y

HHARI puede producir monoubiquitinación de sustratos cuando se asocia a E3 de tipo Culina, pero también puede mediar síntesis de la cadena de poliUb en ensayos de autoubiquitinación. Hasta la fecha, no se ha descrito que las E3 ligasas de tipo HECT construyan cadenas lineales de poli-ubiquitina, lo que pueden ser una propiedad distintiva de RBR (Dove *et al.*, 2017; Kellsall *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017).

### E3 ligasas RBR de Arabidopsis.

Las proteínas que contienen dominios RBR se encuentran divididas en plantas en 4 subfamilias (Planta II, ARA54, Planta I/Helicasa y Ariadne) (Marín, 2010) (Figura 24).



**Figura 24.** Resultado básico para los análisis generales que incluyen 498 secuencias de RBR de plantas. Se indican las ramas principales que corresponden a las cuatro subfamilias. Los números por encima de esas ramas corresponden al soporte de arranque, en porcentajes. Los números entre paréntesis se refieren al número de secuencias de proteínas que se incluyen en una rama. También se indican las estructuras típicas de las proteínas en las subfamilias (rojo: supradominio RBR; verde: dominio RWD/GI; púrpura: dominio helicasa DEAD/DEAH; amarillo: dominio Ariadne). Las barras en la proteína que contiene Helicasa se incluyen para reflejar que estas proteínas suelen ser mucho más largas de lo que se muestra aquí, para más detalles de estas estructuras. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011579.g001>. Adaptada de Marín, 2010.

En *Arabidopsis* se han registrado 42 proteínas que contienen dominios RBR, generadas probablemente por duplicaciones en tándem. Los datos de microarrays indican que la mayoría de estos nuevos genes tienen patrones de expresión bajos y sólo a veces son específicos de sustratos (Marín, 2010). Pocos datos existen aún sobre la función biológica de las E3 ligasas RBR en *Arabidopsis*. Se han realizado estudios *in vitro* en ARI8 (At1g63450) de la subfamilia ARIADNE en planta, para intentar esclarecer si presentan la autoinhibición característica, como en HHARI, por la presencia del dominio Ariadne, estos estudios revelaron que se seguía detectando actividad en planta indicando que si bien este dominio es inhibitorio en planta su inhibición es incompleta o bien no puede detectarse por este tipo de ensayos *in vitro*, quizás debido al uso de una E2 UBC8 inadecuada para el estudio (Kraft *et al.*, 2005). Otros miembros de la misma Subfamilia ARIADNE, ARI12 y ARI14 se han relacionado en señalización y fertilización UV-B, respectivamente (Lang-Mladek *et al.*, 2012; Ron *et al.*, 2010), pero el resto de la familia apenas se ha caracterizado. La E3 ligasa RSL1 (“Ring finger Seed Longevity”)/RFA (“Ring Finger ABA-related”) pertenecen al clado A de la subfamilia Planta II, y se ha demostrado que RSL1 se dirige a los receptores PYR1 y PYL4 de ABA en la membrana plasmática (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Bueso *et al.*, 2014a; Bueso *et al.*, 2014b).

En los últimos 10 años se han descubierto una importante cantidad de E3 ligasas que actúa sobre distintos componentes de la ruta de señalización del ABA en *Arabidopsis*, que a modo de resumen presento en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de diferentes E3 ligasas que interactúan con distintos componentes de la ruta de ABA.

	Enzima E3	Tipo	Sustrato	Descripción de funciones generales	Referencias
R E C E P T O R E S	CRL4/CDDD (COP10DET1- DDB1-DDA1)	Multiméricas basadas en CUL	PYL4 /PYL5/PYL8	ABA actúa desestabilizando el complejo de CRL4 y los receptores aumentan de concentración regulando la respuesta a sequía	Irigoyen <i>et al.</i> , 2014
	RSL1	RING (RBR)	PYR1/PYL4	Disminuyen la sensibilidad a ABA regulando la tolerancia a sequía	Bueso <i>et al.</i> , 2014
	RIFP1	SKP1-Cullin- 1-F-box (SCF)	PYL8	Se expresa en semilla y regula la inhibición de ABA en germinación y desarrollo de la planta	Li <i>et al.</i> , 2016
	At RAE 1	CUL4-DDB1 con adaptador DWD	PYL9	Disminuyen la sensibilidad a ABA regulando la tolerancia a sequía	Li <i>et al.</i> , 2017
	PUB22	U-box	PYL9/PYL5/ PYL7/PYL8	Regulan la tolerancia a sequía	Li <i>et al.</i> , 2018
	PUB23	U-box	PYL9	Regulan la tolerancia a sequía	Li <i>et al.</i> , 2018
F O S F A T A S A S	PUB12/ PUB13	U-box	ABI1	Promueve la degradación de la fosfatasa ABI interviene regulando las respuestas a estrés por sequía	Kong <i>et al.</i> , 2015
	RGLG1/ RGLG5	RING con dominio vW	PP2CA ABI2 HAB2	Regulador positivo de respuesta a ABA  El ABA promueve la deslocalización nuclear de RGLG1	Wu <i>et al.</i> , 2016
	PIR1/PIR2	RING ligase	PP2CA	Los mutantes dobles de pérdida de función muestran insensibilidad a ABA	Baek <i>et al.</i> , 2019
	BPM3 /BPM5	CRL3 con adaptador  BPM	PP2CA/ABI1/ ABI2/HAB1	Aceleran la degradación en presencia de ABA de fosfatasas e inhiben la sensibilidad a ABA  Intervienen en respuesta a estrés hídrico.	Julian <i>et al.</i> , 2019

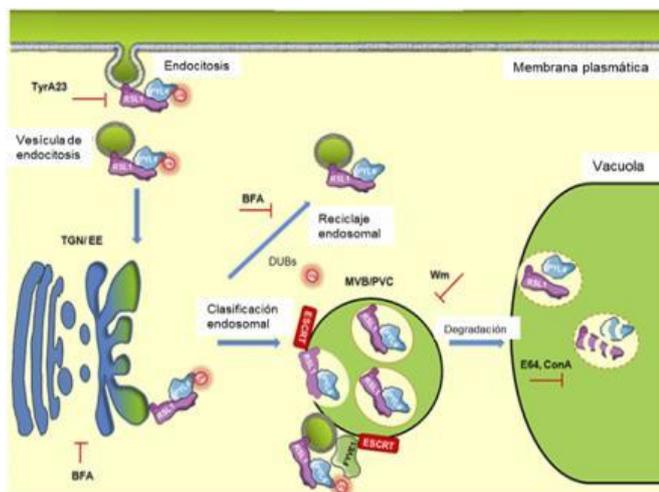
Continuación

P R O T E I N Q U I N A S A S	AtPP2- B11	RING Cullin/F- box/SKP1	SnRK2.3	El ABA induce la expresión de AtPP2-B11, lo que sugiere que el ABA puede promover la degradación de SnRK2.3 y atenuar la señalización mediada por ABA	Cheng <i>et al.</i> , 2017
	RGLG1/RGLG2	RING con dominio vW	ERF53	Modulan la respuesta a ABA	Cheng <i>et al.</i> , 2012
	ARIA	CUL3-RBX1-BTB	ABF2	Los mutantes de pérdida de función <i>aria</i> presentan insensibilidad a ABA y a glucosa.	Kim <i>et al.</i> , 2004
	AIP2	RING	ABI3	Actúa como un regulador negativo de la respuesta a ABA	Zhang <i>et al.</i> , 2005
T R A N S C R I P C I O N	KEG (KEEP ON GOING)	RING	ABI5	ABI5 se acumula en semillas cuando son tratadas con inhibidores del proteosoma 26S	Liu & Stone, 2010
	DWA1/ DWA2/ ABD1	CUL4 con distintos adaptadores	ABI5	Los mutantes de pérdida de función de estas E3 ligasas producen respuestas de hipersensibilidad e interviene por tanto en la regulación de respuestas a estrés por sequía	Lopez –Molina <i>et al.</i> , 2001 Smalle <i>et al.</i> , 2003

## Modificaciones post-traduccionales vía endosómica.

Se trata de una MPT que generalmente regula la actividad de proteínas localizadas en membrana plasmática, la respuesta que desencadena esta regulación se produce por una mono-ubiquitinación provocando una señal de endocitosis. Con relación a la ruta de señalización de ABA debemos destacar a la proteína FYVE1, cuyo nombre lo recibe de la primera letra de las cuatro proteínas iniciales donde se descubrió un motivo de unión de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) característico de estas proteínas (Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1) (Gaulhier *et al.*, 1998; Lemmon, 2008; Stenmark *et al.*, 1996). FYVE1 fue identificada por Gao y colaboradores en la búsqueda de proteínas que podían tener una función relacionada con la clasificación endosómica, demostrando que la proteína FIVE1 podía unirse tanto a Ub como a PI3P y que interactuaba con Vps23A (“Vacuolar Protein Sorting 23”) para incorporarse al complejo ESCRT-I (“ENDOSOMAL SORTING COMPLEXES REQUIRED FOR TRANSPORT-I”) por tanto estaba asociada al tráfico endosomal, trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio muestran que FYVE1 es necesaria para el reconocimiento e internalización de PYL4, el cual interactúa uniéndose a RSL1 en vesículas intraluminales (ILV) (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Bueso *et al.*, 2014b) (Figura 25). Aunque se ha supuesto que la ruta ESCRT está reservada para las proteínas integrales de membrana, los receptores del ABA pueden aparecer también en estos compartimentos debido a que se encuentran estableciendo interacciones con proteínas de

membrana, como por ejemplo a través de la familia de proteínas (“C2 domain ABA–Related”) CAR. Las proteínas CAR se unen transitoriamente a los fosfolípidos de membrana en presencia de calcio, lo que provoca el aumento de PYR/PYL/RCARS en la membrana plasmática (Rodríguez *et al.*, 2014). Otra proteína implicada en estos mismos procesos es la proteína VPS23 (Yu *et al.*, 2016). Trabajos más recientes llevados a cabo con “CALG-2 INTERACTING PROTEIN-X” (ALIX), una proteína asociada a ESCRT-III han demostrado que tanto FYVE1 como VPS23A interactúan con ALIX que se une directamente a los receptores de ABA en los endosomas tardíos, promoviendo su degradación. Cambios en las funciones de ALIX conducen a una alteración de la vía endosomal provocando una mayor acumulación de receptores de ABA. Los mutantes de pérdida parcial de función *alix-1* muestran hipersensibilidad a ABA durante el crecimiento y provocan el cierre estomático (García-León *et al.*, 2019).



**Figura 25.** Modelo propuesto del tráfico endosómico de los receptores ABA y el papel de FYVE1 en el reclutamiento de PYL4 ubiquitinada. La ubiquitinación de PYL4 en la membrana plasmática por RSL1 actúa como desencadenante de endocitosis. FYVE1 reconoce PYL4 ubiquitinada en el complejo RSL1-PYL4 y lo recluta a la vía ESCRT, promoviendo la clasificación degradativa de PYL4 en MVB/PVC. Los MVB adquieren competencia para fusionarse con la vacuola, donde el complejo RSL1-PYL4 se degrada. Adaptada de Belda-Palazon *et al.*, 2016

## Modificaciones post-traduccionales debidas a S-nitrosilación y nitración.

La S-nitrosilación y la nitración son MPTs relacionadas con el incremento del estrés oxidativo. Durante el estrés oxidativo se forman radicales libres como el  $\text{NO}\cdot$  y el  $\cdot\text{O}_2$ , los cuáles reaccionan entre sí para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Beckman, 1994; Crow & Beckman, 1995), altamente tóxico debido a su elevada capacidad oxidante. La nitración produce la unión irreversible de  $\text{NO}\cdot$  en residuos de tirosina (Tyr) de proteínas conduciéndolas irremediablemente a procesos de degradación y resíntesis. La S-nitrosilación marca con  $\text{NO}\cdot$  de forma reversible residuos de cisteína (Cys) de las proteínas (Fares *et al.*, 2011; Lozano-Juste & León, 2010; Malik *et al.*, 2011) se ha demostrado que los receptores PYR/PYL/RCARs se encuentran tanto nitrados como S-nitrosilados. El receptor PYR1 mostró nitración en residuos de Tyr<sup>58</sup> y Tyr<sup>120</sup>, PYL4 en el residuo Tyr<sup>80</sup> y PYL8 en Tyr<sup>60</sup> y Tyr<sup>158</sup>, produciendo una reducción de su actividad, sugiriendo que el  $\text{NO}\cdot$  es un mecanismo que limita rápidamente la señalización de ABA en condiciones de estrés oxidativo debido a que los receptores podrían poliubiquitinarse y degradarse vía proteosoma 26S. Sin embargo, los receptores S-nitrosilados no muestran esta reducción (Castillo *et al.*, 2015).

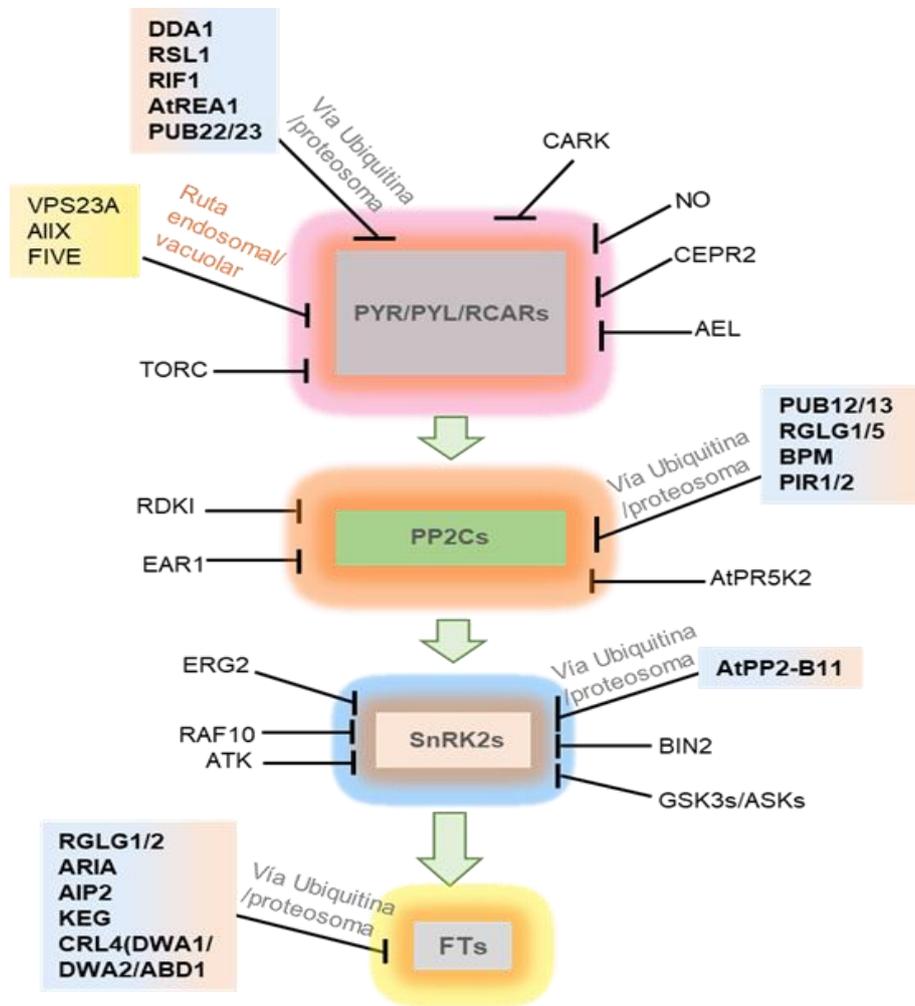
El  $\text{NO}\cdot$  actúa también reprimiendo la señalización de ABA en otros componentes de la ruta debido a la S-nitrosilación en el residuo de Cys<sup>137</sup> de SnRK2.6 (Wang *et al.*, 2015a). Aunque los receptores PYR/PYL/RCARs son esenciales para la activación mediada por ABA de las SnRK2s, también están

involucrados en la regulación antagonista de activación de SnRK2s durante el estrés osmótico (Zhao *et al.*, 2018).

## Modificaciones post-traduccionales debidas a fosforilación.

La fosforilación es una forma de regulación proteica con alta frecuencia de aparición en las proteínas. Una de cada ocho proteínas se encuentra fosforilada en varios residuos, mediante la adición de un grupo fosfato donado del ATP al grupo –OH de la cadena lateral de Serina (Ser), Treonina (Thr) o Tyr de estas proteínas. Esta MPT es rápida y reversible con acciones mediadas tanto por proteínquinasas como por fosfatasas. Los receptores PYR/PYL/RCARs son fosforilados por múltiples proteínquinasas incluyendo entre otras a TOR, que fosforila a PYL4 inactivándolo en un residuo conservado correspondiente a la Ser<sup>114</sup> (Wang *et al.*, 2018). La quinasa AEL fosforila al receptor PYR1 en residuos parcialmente conservados de Ser<sup>109</sup> y Ser<sup>152</sup> promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación (Chen *et al.*, 2018). El receptor localizado en la membrana CEPR2, fosforila a PYL4 en el residuo conservado de Ser<sup>54</sup> y promueve su degradación (Yu & Xie, 2017). Otro receptor citosólico CARK1, fosforila a PYR1 y PYL1/2/3/8 en un residuo menos conservado correspondiente a Thr<sup>78</sup> provocando respuestas de hipersensibilidad a ABA (Li *et al.*, 2019a; Zhang *et al.*, 2018). El ABA activa a CARK1, pero la capacidad de CARK1 de ser activado por cambios ambientales o por otras hormonas aún se desconoce (Zhang *et al.*, 2018). Aunque todavía no está claro cómo CEPR2 y AEL responden a cambios ambientales u otras

hormonas, la fosforilación de los receptores por ambos disminuye después del tratamiento con ABA, sugiriendo que la actividad y la abundancia de los receptores PYR/PYL/RCARs están estrechamente controladas bajo condiciones sin estrés, para prevenir la supresión del crecimiento mediada por ABA (Wang *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019). Estas quinasas parecen ser críticas para la activación de las SnRK2s y sus posteriores respuestas a ABA (Huang *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2019; Saruhashi *et al.*, 2015; Shinozawa *et al.*, 2019; Stevenson *et al.*, 2016). La fosforilación de SnRK2.2/3 con especificidad en el residuo Thr<sup>180</sup> de SnRK2.3 (Cai *et al.*, 2014) es producida por proteínas que intervienen reprimiendo la señalización por brasinosteroides (BR), BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) y glucógeno sintasa quinasa 3s (GSK3s)/Shaggy-like kinases (ASKs), produciendo una mejora de la señalización de ABA. Las fosfatasa ABI1 y ABI2 también se encuentran reguladas por esta MPT (Baek *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2017) por medio del receptor de superficie celular AtPR5K2 y la proteína de membrana RECEPTOR DEAD KINASE 1 (RDK1) cuya expresión se encuentra inducida por ABA. En la Figura 26 se muestra un esquema de las proteínas que interviene en las MPT mostradas y sus sustratos.



**Figura 26. Regulaciones de los componentes principales de señalización ABA.** Los componentes principales de señalización ABA están firmemente regulado por múltiples reguladores. Los PYL están fosforilados por múltiples proteínas quinasas incluyendo TOR, AEL y CARK1. Los TOR fosforilados inactivan a los PYLs, mientras que AEL y CEPR2 fosforilan PYLs y promueven su degradación. CARK1 fosforila PYL y puede mejorar su actividad, mientras que NO inactiva PYLs por nitración de Tyr. La degradación de las PYL está regulada tanto por DDA1, RSL1, RIF, PUB22/23 a través del sistema ubiquitina-proteosoma, y por el ESCRT-I componentes VPS23A y ALIX a través de la vía endosomal/vacuolar. Ocupaciones de PP2Cs puede potenciarse con EAR1 y la quinasa PR5K2, mientras que RDK1 puede reducir su actividad. Las PP2Cs son degradadas vía proteosoma 26S a través PUB12/13, RGLG1/5 y con BPM. Los SnRK2 se pueden activar por varias otras quinasas, RAF10 y BIN2. Además del clado A PP2Cs, el clado E PP2C EGR2 también inhibe SnRK2s. Aunque las PYLs son esenciales para activación mediada por ABA de SnRK2, también están involucrados en la regulación antagonista de Activación de SnRK2 durante el estrés osmótico. Los factores de transcripción (FTs), Se encuentran regulados vía proteosoma 26S por RGLG1/2, ARIA, AIP2, KEG y las CUL4 con adaptadores DWA1/DWA2/ABD1



# OBJETIVOS

---

## OBJETIVOS

Como objetivo principal se planteó la caracterización de la familia RSL1/RFAs de proteínas E3 ligasas de tipo RBR como reguladores de la vida media de receptores PYR/PYL/RCARs. Para ello se abordaron y desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización bioquímica y genética de la familia RSL1/RFA de proteínas E3 ubiquitín ligasas en la regulación de la señalización del ácido abscísico y su posible función como regulador de la vida media de los receptores.
2. Identificación de la proteína E2 necesaria para la actividad bioquímica de las proteínas RFA regulando la actividad de las RFAs en la ruta de señalización del ABA.
3. Identificación y caracterización de la modificación post-transduccional S-acilación de RSL1.

La utilidad de esta investigación reside en el papel central del ácido abscísico en la resistencia de las plantas a la sequía. Aumentar nuestros conocimientos en este campo supone aumentar nuestras posibilidades de producción en un mundo donde el cambio climático nos lleva a un inexorable estrés hídrico. Esta investigación podría dar lugar a métodos novedosos para disminuir los requerimientos hídricos de las plantas de cultivo.

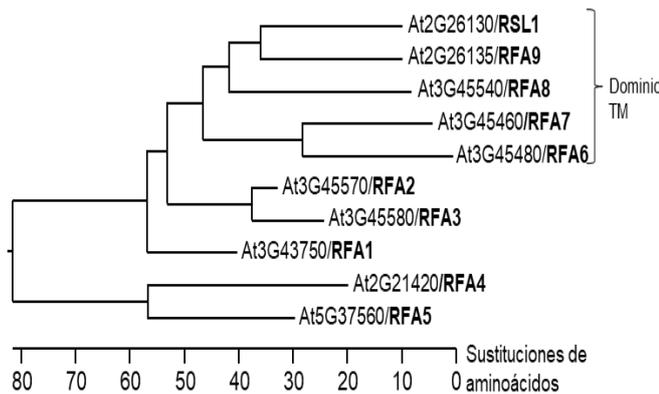


# RESULTADOS I

---

## Expresión de los genes RFA1-RFA5, estructura comparada con la rama RSL1 y localización subcelular de RFA1 y RFA4.

La familia de proteínas E3 ligasas de tipo RBR (“RING-in-between RING”) RSL1 (“Ring finger Seed Longevity”)/RFAs (“Ring Finger ABA-related”) está constituida por 10 miembros (Figura 27).



**Figura 27.** Cladograma de la familia de genes semejantes a RSL1. La familia está compuesta por 10 miembros que fueron obtenidos realizando un BLAST sobre la base de datos TAIR para un valor de  $p < 10^{-60}$ .

Estos miembros se pueden clasificar en dos ramas, una de las ramas está formada por las proteínas RSL1 y RFA6 - RFA9, todas ellas poseen un dominio C-terminal transmembrana (TM) que sugiere una posible localización subcelular en la membrana plasmática, como se ha demostrado para RSL1 en dos trabajos (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Bueso *et al.*, 2014b). Otra rama de esta familia de E3 ligasas, estaría constituida por el conjunto de proteínas de RFA1 a RFA5, las cuales carecen de ese dominio C-terminal TM. La Figura 28, muestra el alineamiento de las secuencias de los componentes de la familia RSL1/RFA. En ella se destaca la presencia de los dominios RING1, IBR y RING2, característicos de esta familia.

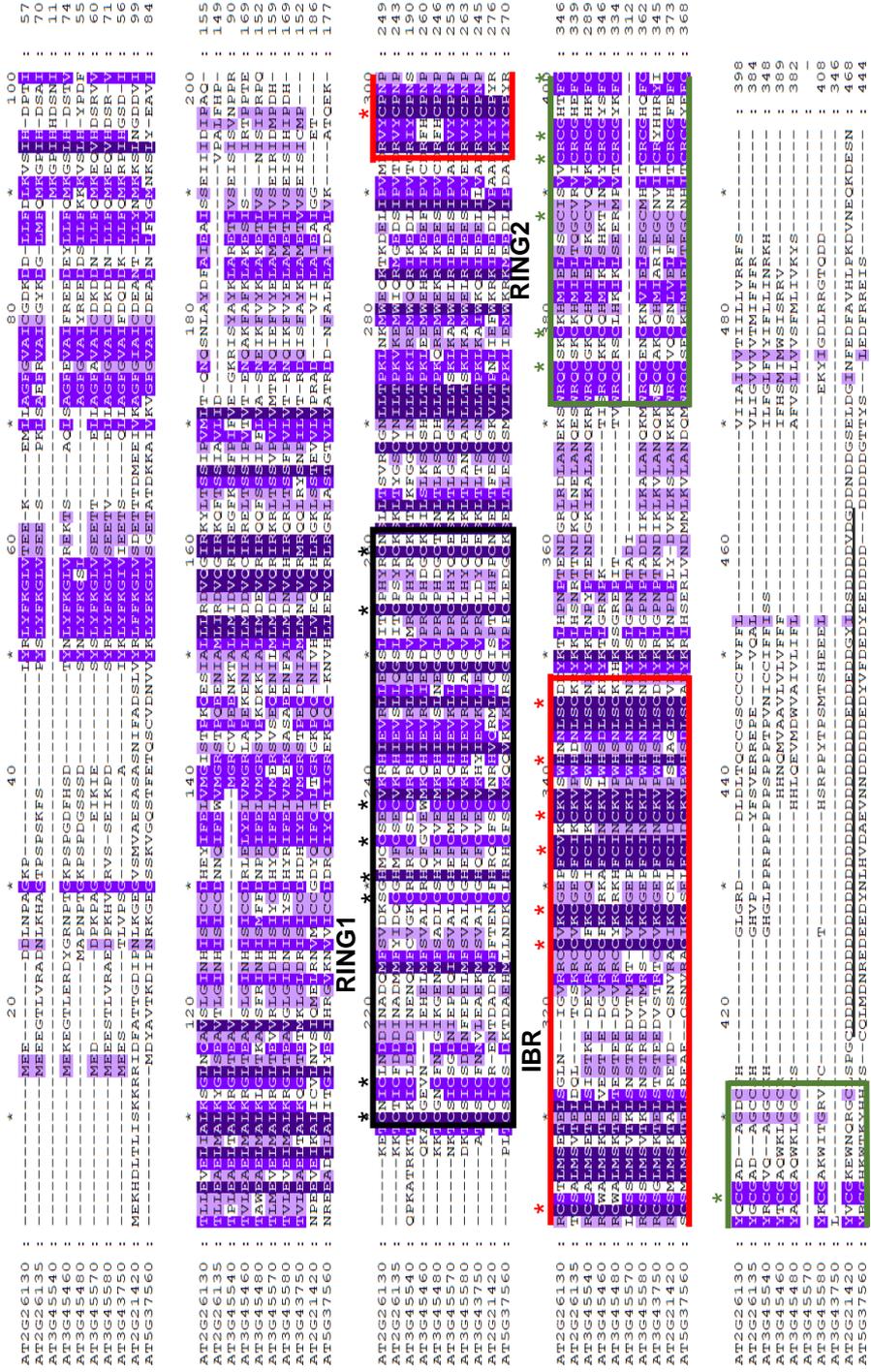


Figura 28. Alineamiento de las secuencias de E3-ligasas RSL1/RFAs. Alineamiento obtenido usando el método CLUSTALW. En la representación gráfica se identifican los dominios característicos de la familia RBR: RING1 (cuadro negro), IBR (cuadro rojo) y RING2(cuadro verde). Los asteriscos indican los residuos de cisteínas e histidinas altamente conservados en los respectivos dominios indicados.

Dado que el estudio de RSL1 nos ha proporcionado información de cuales podrían ser las posibles funciones de RFA6-RFA9, y siendo estas E3 ligasas las que poseen dominio TM en el C-terminal. Parte de nuestro interés en este trabajo ha sido profundizar en la caracterización de otros miembros de la familia de E3 ligasas RFA, centrándonos en proteínas de la familia pertenecientes a la rama que carece del dominio TM, en particular las proteínas RFA1 y RFA4. Además, hemos iniciado estudios, mediante la generación de mutantes combinados, que nos ayuden a demostrar la posible conexión entre la rama RSL1 (con dominio TM) y la rama carente del dominio TM. La elección de las proteínas RFA1 y RFA4 para la realización de este trabajo, se ha realizado atendiendo al análisis de diferentes bases de datos de expresión génica. Los niveles de expresión del ARNm para los genes *RFA1* y *RFA4* son más altos que los niveles de expresión del ARNm para los genes *RFA2/3*, en los diferentes tejidos estudiados y en distintas etapas de desarrollo, mientras que, si los comparamos con los niveles de expresión del ARNm de *RFA5*, sus niveles son relativamente más cercanos a *RFA1* y *RFA4* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; Waese *et al.*, 2017). En la Figura 29 mostramos la expresión de los genes de las distintas *RFAs* en aproximadamente 350 microarrays disponibles en (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> y los comparamos con los datos existentes para la expresión de genes de diferentes *PYR/PYLs*. Gracias a esos datos, hemos podido observar la existencia de unos perfiles de expresión similares para los genes *RFA1/4/5* y los genes *PYR/PYL*.

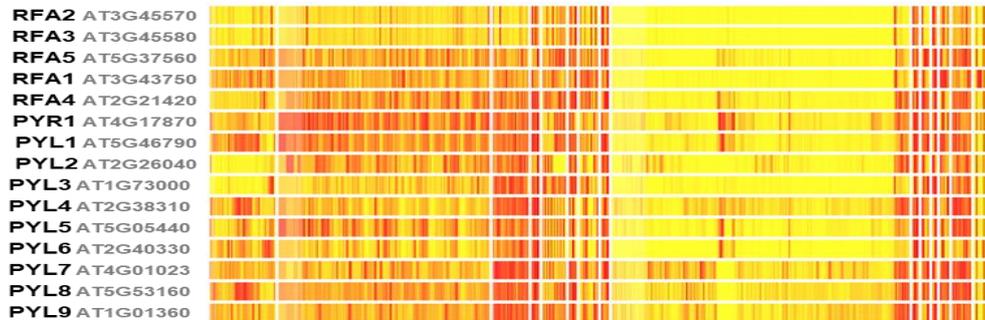


Figura 29. Mapa de calor de las distintas RFAs y de diferentes receptores de ABA. Se aprecia un patrón de expresión a nivel de tejidos y etapas de desarrollo.

Adicionalmente, el cribado de bases de datos nos permitió analizar la expresión de *RFA1* y *RFA4* en plántulas sometidas a diferentes estreses abióticos (Goda *et al.*, 2008). Como resultado encontramos que la regulación de la expresión de *RFA4* presentaba un incremento en el tejido aéreo en respuestas al frío, estrés osmótico, sal, sequía y estrés por calor, mientras que la expresión de *RFA1* estaba menos afectada por estos tipos de estrés abióticos (Figura 30).

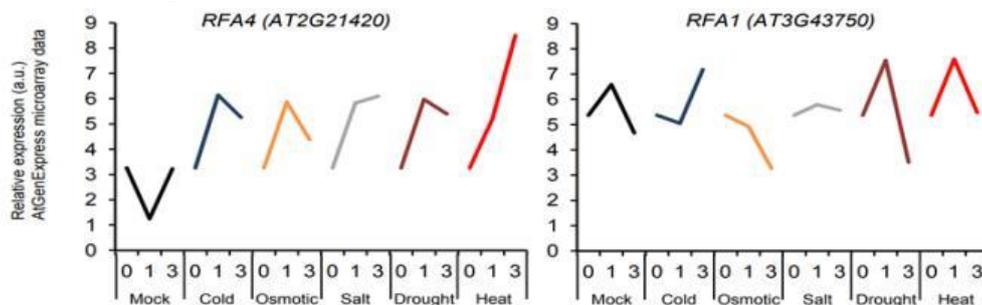


Figura 30. Expresión relativa de *RFA4*(dcha.) y *RFA1*(izqda.) Muestras extraídas con el Kit QIAGEN RNeasy. Los datos de expresión se generaron en el RZPD de Berlín utilizando el chip Affymetrix ATH1 en respuesta a diferentes tipos de estrés. Todas las muestras se tomaron de plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 de 18 días donde se separó tejido de hojas y de raíz después de ser tratadas a distintos tiempos. El tratamiento de estrés por frío ("Cold") consistió en 30 min a 4° C de las muestras, el tratamiento de estrés osmótico ("Osmotic") y salino ("Salt") consistió en añadir manitol a 300mM y NaCl 150mM, el estrés por sequía ("Drought") consistió en un tratamiento de 15 min en una corriente de aire (que causa aproximadamente el 10% de pérdida de peso fresco) y el estrés por calor ("Heat") consistió en 3 h a 38° C seguidas de 9 horas de recuperación a 25° C (en los tratamientos de estrés por calor se usaron muestras de células de plántulas de 16 días) todas las muestras de los experimentos se realizaron el mismo día, en el mismo instituto y cámaras de crecimiento como un experimento. Goda *et al.*,2008

En contraste a la observación anterior, el análisis de datos de microarrays en células guarda bajo diferentes tratamientos tales como ABA, alto nivel de CO<sub>2</sub>, oscuridad o baja humedad, no reveló cambios significativos en la expresión de *RFA1* y *RFA4* (Gen Expression Omnibus, GSE41054 y GSE118520; (Dittrich *et al.*, 2019). También observamos que la expresión de *RFA4* era más alta en las primeras etapas del desarrollo de silícula y en las fases de embrión globular, corazón y torpedo, mientras que la expresión de *RFA1* aumentó desde la etapa de bastón del embrión hasta la etapa de cotiledones (Figura 31). Datos que también se corroboran en la expresión de *RFA5* como se mencionó anteriormente.

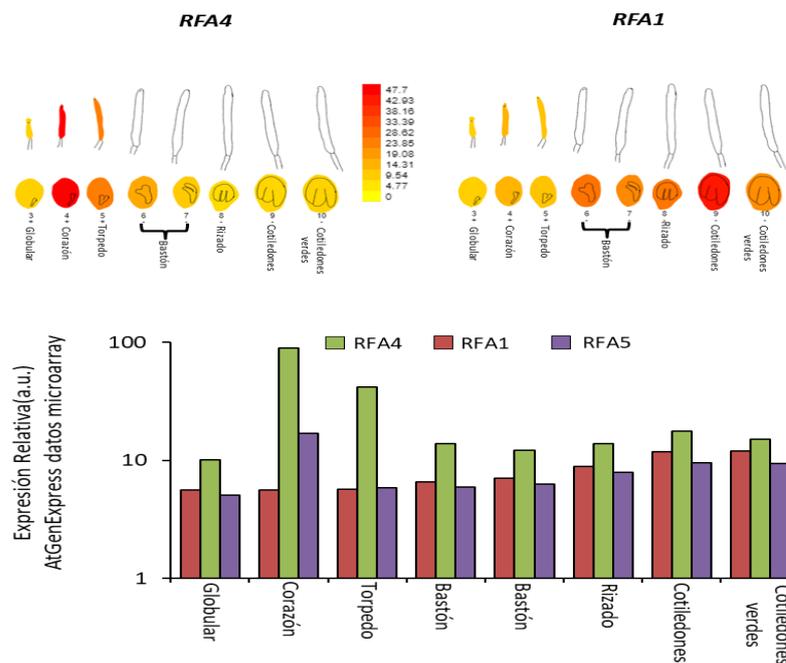
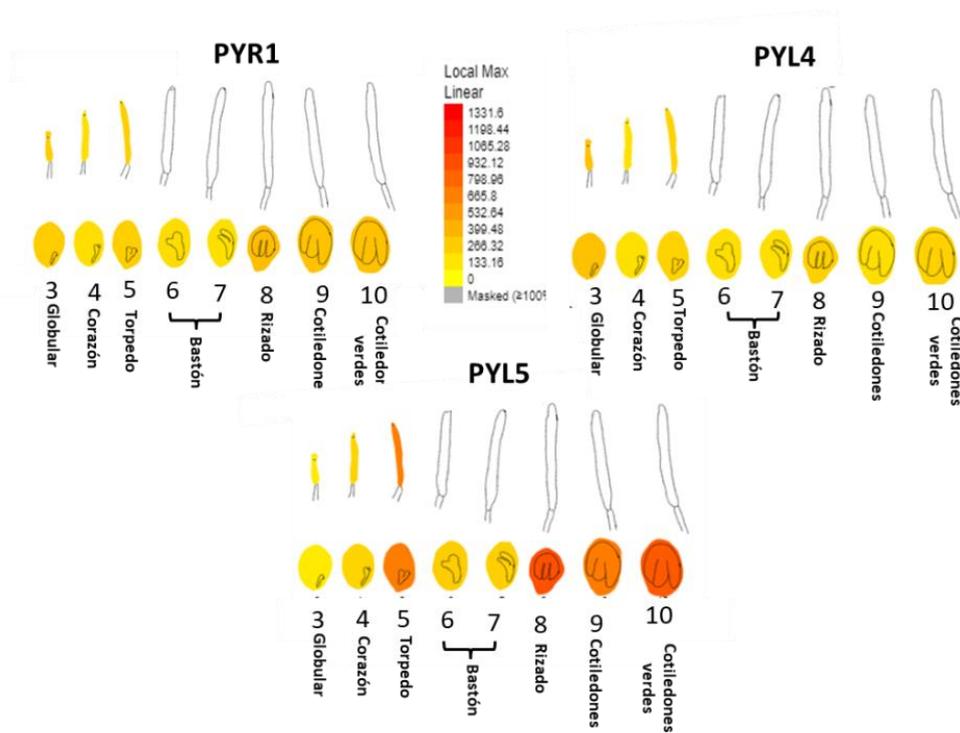


Figura 31. Datos expresión relativa expresados en escala logarítmica de los genes de *RFA4*, *RFA1* y *RFA5* en silícula y en diferentes etapas del desarrollo embrionario de la semilla. Los datos de expresión se obtuvieron de experimentos descritos en la base de datos pública AtGenExpress (Goda *et al.*, 2008) utilizando microarrays de Affymetrix para *Arabidopsis* y visualizados mediante la herramienta de visualización AtGenExpress ubicada en <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.

Al comparar los datos de desarrollo en semilla con los de la expresión para receptores PYR/PYL, observamos que estos presentan dos picos de mayor expresión (Figuras 32 y 33). Por ejemplo, en *PYR1*, *PYL4* y *PYL5*, se observa un aumento de expresión durante el desarrollo de la semilla y la silícula (Figura 32, abajo), el cual se produce en los estadios en los cuales *RFA1* y *RFA4* mostraban los niveles más altos.



**Figura 32.** Datos de expresión de *PYR1*, *PYL4* y *PYL5*. Los datos de expresión se obtuvieron de experimentos descritos en la base de datos pública AtGenExpress (Goda *et al.*, 2008) utilizando microarrays de Affymetrix para *Arabidopsis* y visualizados mediante la herramienta de visualización AtGenExpress ubicada en <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

Este solapamiento entre la expresión de los genes *RFA1/4* y los genes *PYL*, nos sugiere que pudieran estar implicados muy directamente en la regulación de los receptores en estas fases del desarrollo (Figura 33).

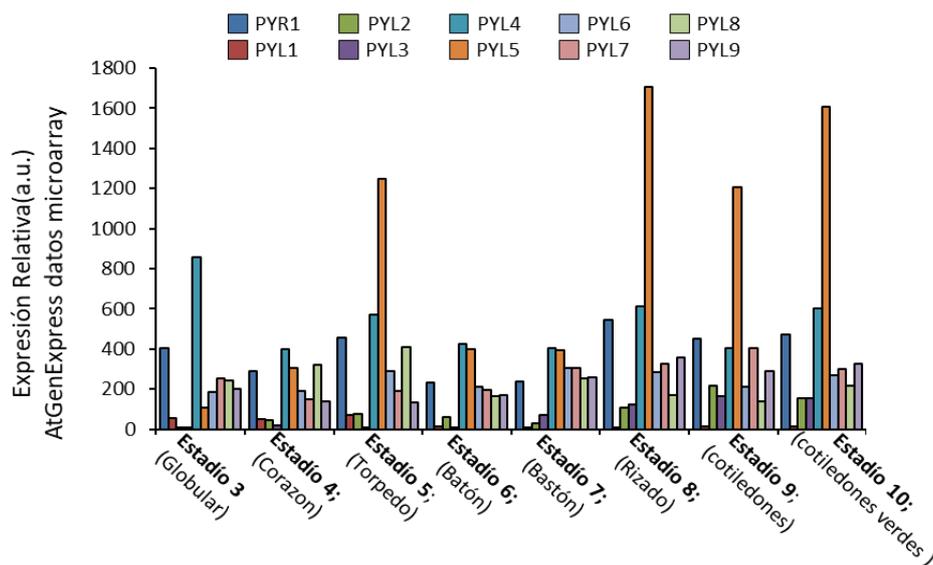


Figura 33. Datos de expresión de genes de PYR1-PYL9 en diferentes etapas del desarrollo de semilla. Los datos de expresión se obtuvieron de experimentos descritos en la base de datos pública AtGenExpress (Goda *et al.*, 2008) utilizando microarrays de Affymetrix para Arabidopsis y visualizados mediante la herramienta de visualización AtGenExpress ubicada en <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

El alineamiento de secuencias de aminoácidos entre RSL1, RFA1 y RFA4 de la Figura 34 extraídos de la Figura 28 (Bueso *et al.*, 2014b) muestra en mayor detalle que además de la formación en tándem de los dominios RING1-IBR-RING2, para el caso de RFA4, después del RING2, existe un dominio C-terminal muy ácido que contiene más de 40 residuos de Asp. Esta E3 posee, además, una señal de localización nuclear, NLS, localizada en el extremo N-terminal. Por su parte, el alineamiento de RFA1 muestra que carece tanto



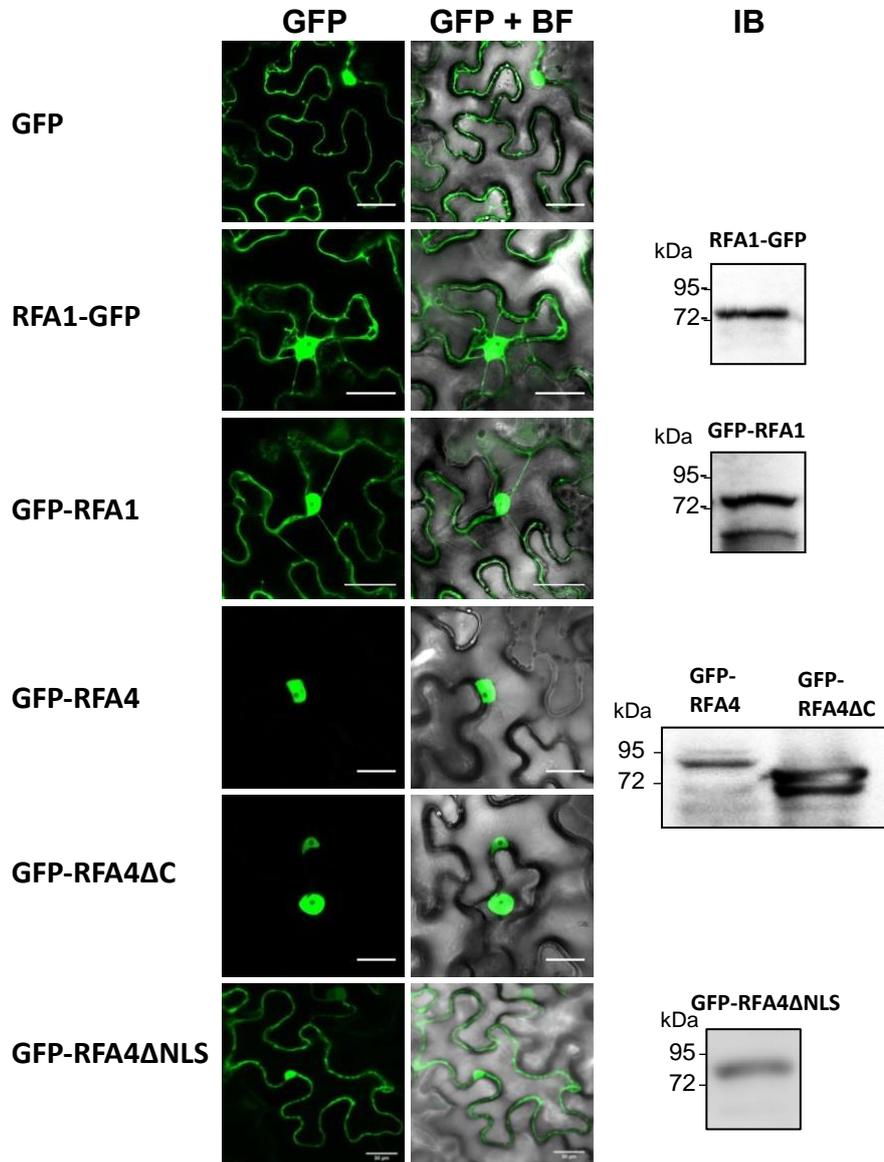
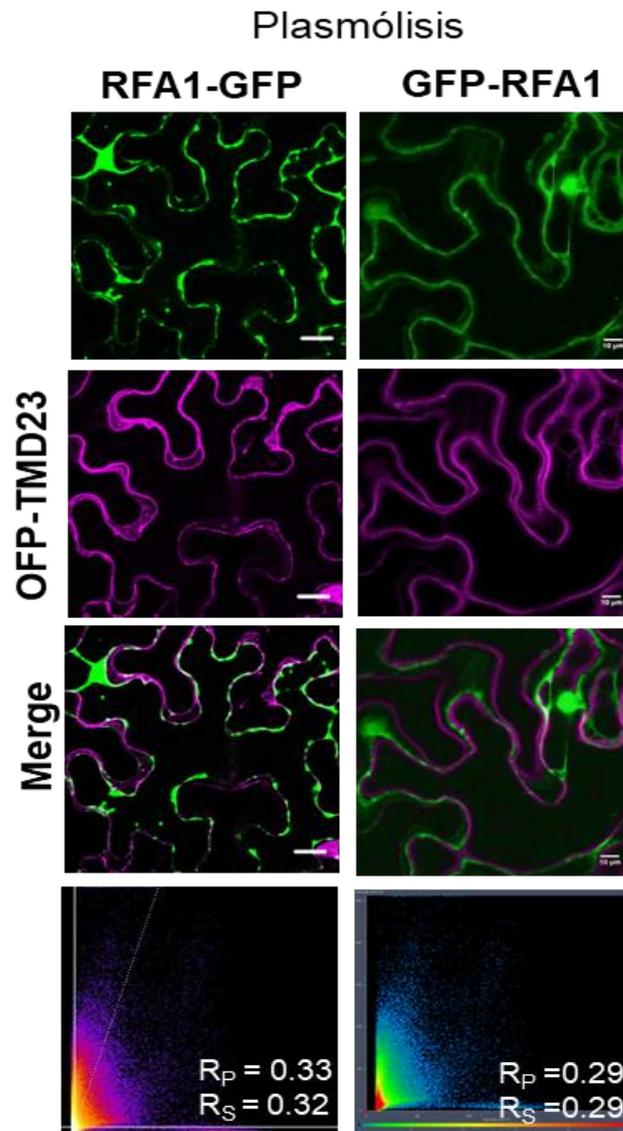


Figura 35. Se muestran imágenes de confocal de células epidérmicas transformadas que expresan en transitoria las construcciones para GFP, RFA1-GFP, GFP-RFA1, GFP-RFA4, GFP-RFA4ΔC o GFP-RFA4ΔNLS. GFP-BF muestra la superposición de la expresión del canal para GFP y la imagen en campo visible del microscopio. Se muestra así la localización subcelular de RFA1 la cual se localiza en el núcleo y el citosol mientras que RFA4 se localiza en el núcleo bajo una expresión transitoria en células foliares de *N. benthamiana*. IB representa la imagen de western blot de la expresión de las proteínas.

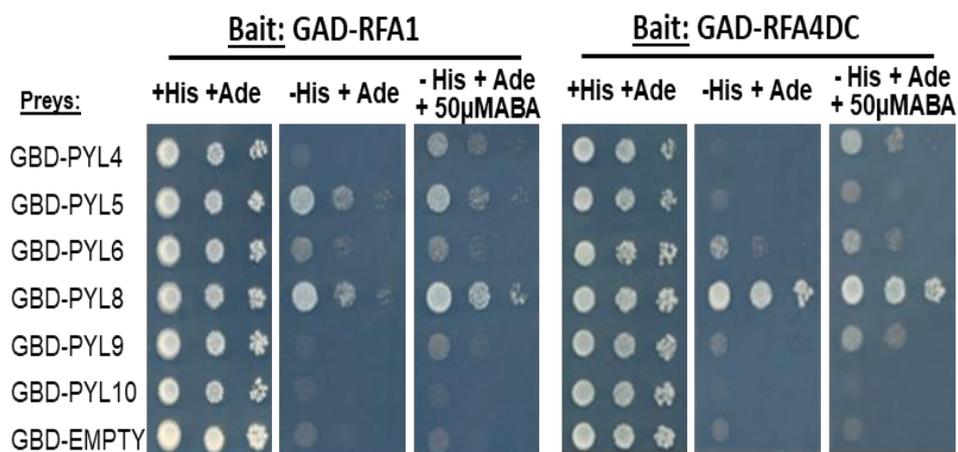
Para verificar la expresión de las proteínas de fusión realizamos un análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-GFP (Figura 35). En los resultados obtenidos, podemos observar que la expresión de GFP-RFA4 fue consistentemente más baja que la de otras proteínas de fusión con GFP, probablemente debido al gran dominio ácido C-terminal que presenta esta proteína es su versión nativa. También pudimos observar que RFA1 está localizado aparentemente tanto en el núcleo como en el citosol, siendo esta última confirmada por la falta de colocalización con el marcador de membrana plasmática OFP-TM23, tanto en las proteínas RFA1-GFP como en GFP-RFA1 (Figura 36). Este marcador fue usado previamente para mostrar la localización de la membrana plasmática de GFP-RSL1 (Bueso *et al.*, 2014). Para el estudio sobre si el dominio ácido C-terminal de RFA4 puede afectar o no a su localización subcelular, comparamos la localización de 35S:GFP-RFA4 $\Delta$ C y 35S:GFP-RFA4 (Figura 35). Observamos con nuestros resultados que, tanto RFA4 como RFA4 $\Delta$ C se localizaron en el núcleo de las células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana*, lo que sugiere que el dominio ácido de RFA4 es, por lo tanto, prescindible para la localización nuclear de esta proteína. De hecho, como hemos mostrado con el alineamiento de secuencia, se identificó una señal de localización nuclear (NLS antígeno T tipo SV40), la cual está compuesta por cuatro residuos básicos (KKRR) en el extremo N terminal de RFA4 (Figura 34). La delección de esta secuencia NLS, permitió a RFA4 cambiar su localización subcelular. El estudio de GFP-RFA4 $\Delta$ NLS muestra que se encuentra aparentemente localizada en citosol y en el núcleo, similar a lo observado para RFA1 (Figura 35).



**Figura 36. Localización subcelular de RFA1.** RFA1 no se localiza en la membrana plasmática. Las imágenes de confocal muestran la expresión transitoria en células foliares transformadas de *N. benthamiana*, coexpresando RFA1-GFP o GFP-RFA1 junto con el marcador de membrana plasmática OFP-TM23. El grado de colocalización existente entre las dos señales de fluorescencia fue analizada usando superposición de imágenes (merge) y el software de Zeiss (Zen Lite 2012). La plasmólisis de las células foliares se realizó mediante el tratamiento de 500mM de NaCl durante 30 minutos a las hojas de *N. benthamiana*. La pérdida de colocalización con OFP-TM23 es mostrado mediante la intensidad relativa en las gráficas (ejes x e y) así como los coeficientes de Pearson ( $R_P$ ) y Spearman ( $R_S$ ). Barras = 30  $\mu$ M

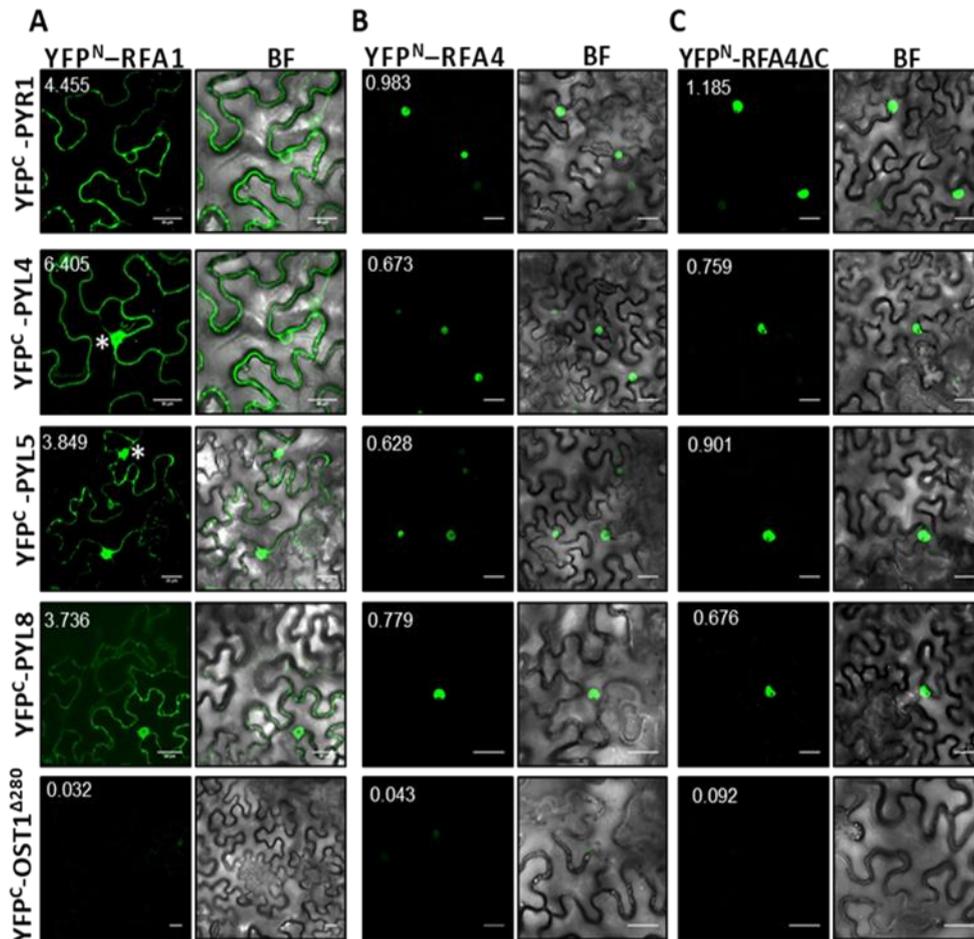
## La interacción de RSL1, RFA1 y RFA4 con los receptores de ABA se localiza en diferentes localizaciones subcelulares

La comparación de secuencias de RSL1, RFA1 y RFA4, excluyendo el dominio TM C-terminal de RSL1 y el dominio ácido de RFA4, revela una alta similitud de secuencia como ya hemos mostrado previamente (Figura 34), lo que sugiere que todas ellas podrían interactuar con los receptores de ABA. Esta interacción ha sido analizada con anterioridad únicamente para el caso de RSL1 y los receptores de ABA (Bueso *et al.*, 2014b); en este trabajo hemos estudiado si RFA1 y RFA4 interactúan con varios receptores de ABA utilizando ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H) (Figura 37).



**Figura 37.** RFA1 o RFA4ΔC se fusionaron con el GAL4 al dominio de activación (AD) en pGADT7 y los receptores ABA se clonaron en pGBKT7 como presas y se utilizaron vectores vacíos (Empty) como controles negativos (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2014). Los cultivos transformados se cultivaron durante la noche en medio líquido sintético definido (SD) que carece de Leu y Trp y se hicieron diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) estos los cultivos se gotearon en un medio de control que carecía de Leu y Trp (+ His + Ade) o en un medio selectivo que carecía de His (-His + Ade) o suplementado con 50 µM ABA (-His + Ade + ABA). y a las levaduras se les permitió crecer durante tres días a 30 ° C.

Una vez confirmada la interacción en levadura, realizamos ensayos en planta mediante el abordaje de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BIFC) (Figura 38). En estos estudios coexpresamos las construcciones YFP<sup>N</sup>-RFA1, YFP<sup>N</sup>-RFA4 y YFP<sup>N</sup>-RFA4ΔC junto a YFP<sup>C</sup>-PYR/PYLs mediante la técnica de agroinfiltración y hemos encontrado una respuesta de interacción entre RFA1 y diferentes receptores de ABA, siendo observada tanto en el citosol como en el núcleo de células de *N. benthamiana* (Figura 38A). Por otro lado, la interacción de RFA4 y PYR/PYLs se localizó exclusivamente en el núcleo, de acuerdo con la localización nuclear observada para GFP-RFA4 (Figura 38B). Como control del experimento, la coexpresión de YFP<sup>C</sup>-OST1Δ280, que se expresa en núcleo y citosol (Vlad *et al.*, 2009), con YFP<sup>N</sup>-RFA1 o con YFP<sup>N</sup>-RFA4, no produjo reconstitución de la fluorescencia, lo que nos permite validar las interacciones observadas anteriormente. Además de estos estudios, también investigamos si el dominio ácido del extremo C-terminal de RFA4 afecta a la interacción de esta proteína con los receptores de ABA. Con este fin, probamos la interacción mediante la construcción YFP<sup>N</sup>-RFA4ΔC (que carece del dominio ácido) con diferentes PYR/PYLs. La interacción de RFA4ΔC con PYR/PYL no difirió de la interacción observada con los receptores y la versión nativa de RFA4, lo que nos sugiere que el reconocimiento del sustrato por RFA4 no es dependiente del dominio ácido C-terminal (Figura 38C).



**Figura 38.** A. Imágenes de confocal de la expresión en transitoria para la coexpresión de YFP<sup>N</sup>-RFA1 y YFP<sup>C</sup>-PYR/PYLs. RFA1 interactúa en el núcleo de células de hoja de *N. benthamiana*. La interacción con PYR1 es observada en la membrana nuclear, pero no dentro del núcleo. B. Interacción nuclear de RFA4 y receptores del ABA. Se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal de células foliares de *N. benthamiana* que han sido transformadas para la coexpresión de las proteínas YFP<sup>N</sup>-RFA4 y YFP<sup>C</sup>-PYR/PYL. C. Interacción nuclear de los receptores RFA4ΔC y ABA. Imágenes de confocal de células de hoja de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente que coexpresan YFP<sup>N</sup>-RFA4ΔC y Proteínas YFP<sup>C</sup>-PYR/PYL. YFP<sup>N</sup>-RFA1/RFA4/RFA4ΔC no interactúa con YFP<sup>C</sup>-OST1Δ280. Barras de escala de 30 μm.

Por otra parte, verificamos que, YFP<sup>N</sup>-RFA1, RFA4 y RFA4ΔC, así como YFP<sup>C</sup>-PYR/PYLs o proteínas YFP<sup>C</sup>-OST1Δ280 se expresaron correctamente (Figura 39).

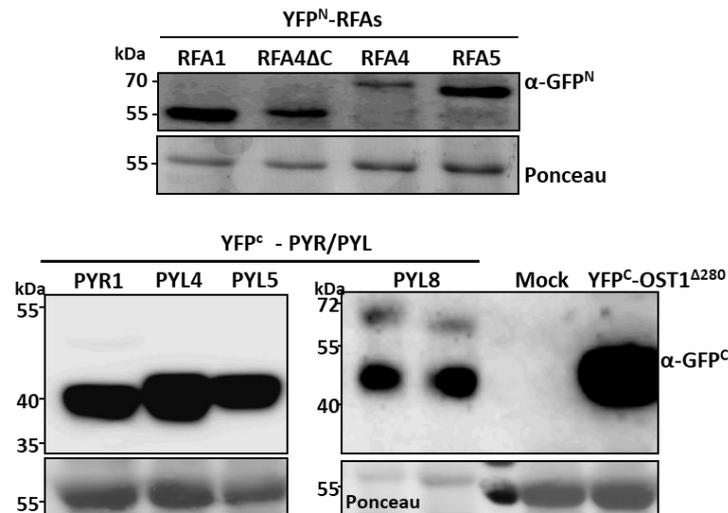
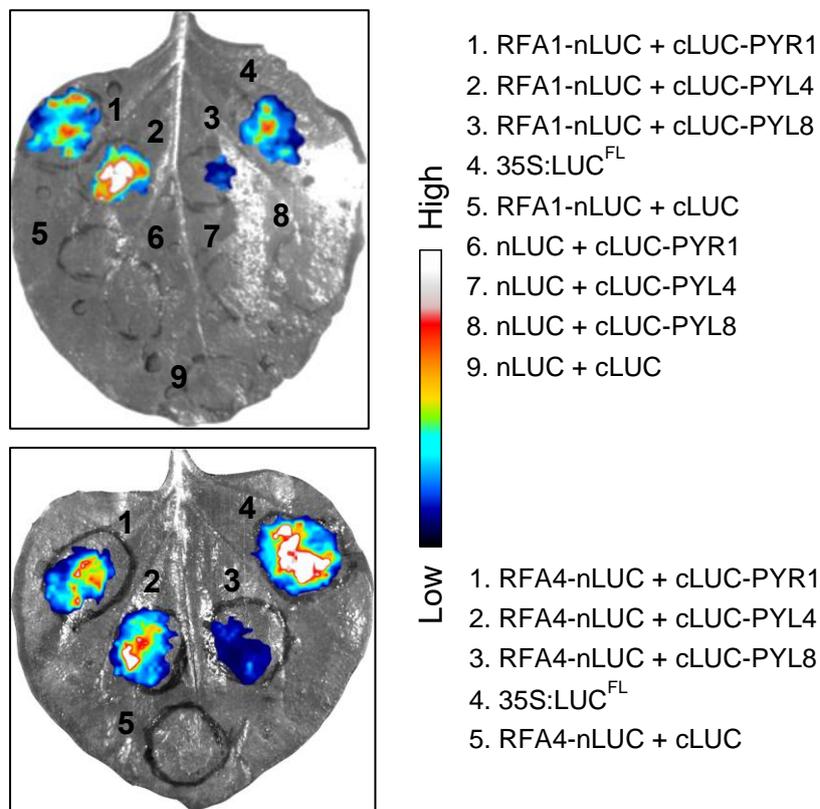


Figura 39. El análisis de inmunotransferencia de proteínas extraídas de las muestras de BiFC. Se muestra la expresión de YFP<sup>N</sup>- y Proteínas de fusión YFP<sup>C</sup>. La tinción con Ponceau de la proteína rubisco se usó como control de carga de proteínas.

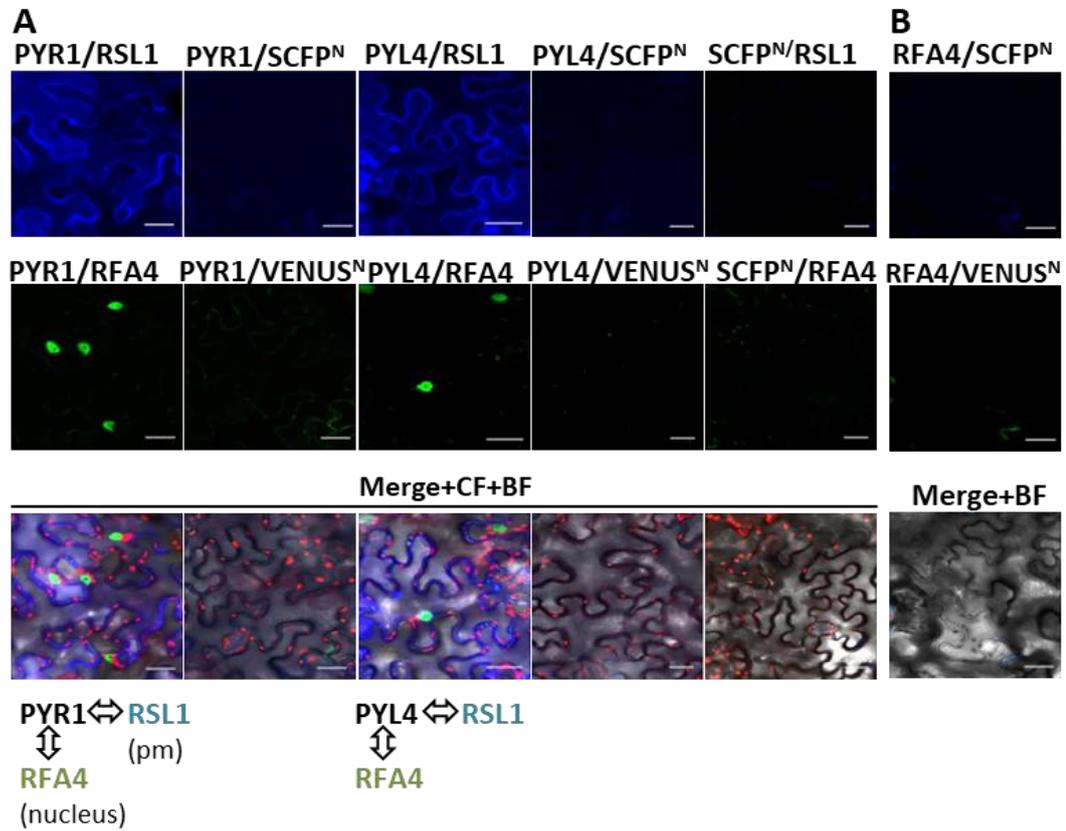
Para validar las interacciones observadas en las pruebas de BiFC, realizamos ensayos de complementación de luciferasa (Split-LUC) en hojas de *N. benthamiana* (Figura 40). A diferencia de los ensayos de BiFC, la restauración de la actividad luciferasa sobre la interacción proteína-proteína de las proteínas que interactúan es reversible (Gehl *et al.*, 2011). La actividad de la luciferasa fue reconstituida por la coexpresión de RFA1-nLUC y cLUC-PYR1, cLUC-PYL4 o cLUC-PYL8, lo que confirma la interacción proteica, aunque en el caso de cLUC-PYL8 la intensidad de la señal obtenida fue más débil (Figura 40, panel superior). La actividad de la luciferasa también fue reconstituida cuando se coexpresaron RFA4-nLUC y cLUC-PYR1, cLUC-PYL4 o cLUC-PYL8

(Figura 40, panel inferior). Como control positivo, en este sistema, utilizamos la construcción pGB0164 que expresa una versión de la luciferasa de longitud completa (Vazquez-Vilar *et al.*, 2017), mientras que las expresiones de RFA1-nLUC o RFA4-nLUC con cLUC fueron utilizadas como controles negativos.



**Figura 40. Ensayo de complementación Split-LUC.** Se muestra la interacción de RFA1 y RFA4 con PYR1, PYL4 y PYL8. Se indican los pares de construcciones que fueron coexpresados en hojas *N. benthamiana* (mostradas en gris) por infiltración mediada con *Agrobacterium*. Se aplicó 50  $\mu$ M de MG132 dentro de la región infiltrada 6h antes de la medida de actividad luciferasa. La medida de actividad fue realizada 72 horas después de la infiltración. La construcción 35S: LUCFL fue usada como control positivo. La actividad luciferasa fue medida mediante la aplicación de 1 mM de D-luciferina usando un sistema de imagen CCD. La señal de Luc fue convertida a falso color mediante ImageJ. La escala de color representa la actividad LUC. Se realizaron Tres ensayos independientes y las imágenes corresponden a hojas representativas (n=5/ por experimento). Barra = 30  $\mu$ m

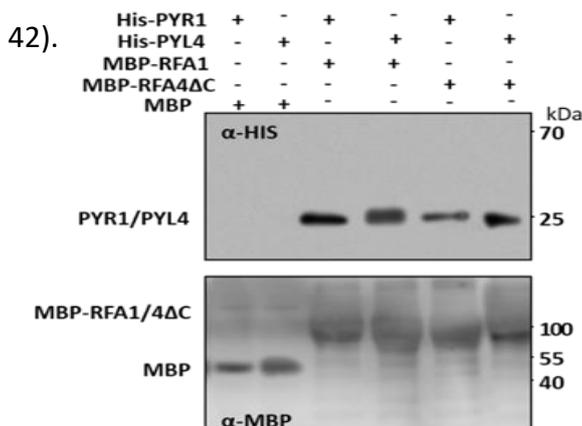
Dado que RSL1 interactúa con los receptores ABA en la membrana plasmática (Bueso *et al.*, 2014b), los resultados mencionados anteriormente indican que otros miembros de la familia RSL1/RFAs poseen como dianas a receptores PYR/PYL en diferentes ubicaciones subcelulares. Para obtener más información acerca de esta interacción, en este trabajo hemos hecho ensayos de BiFC multicolor, clonando PYR1 o PYL4 en vectores p(MAS)-SCYCE(R), RSL1 en pDEST-SCYNE(R) y RFA4 en pDEST-VYNE(R), como se describe en el trabajo de Gehl *et al.*, 2009. Posteriormente coexpresamos SCFP<sup>C</sup>-PYR1, SCFP<sup>N</sup>-RSL1 y VENUS<sup>N</sup>-RFA4 o SCFP<sup>C</sup>-PYL4, SCFP<sup>N</sup>-RSL1 y VENUS<sup>N</sup>-RFA4 en células de hoja de *N. benthamiana*. Como resultado observamos la formación simultánea de complejos Receptor/RSL1 y Receptor/RFA4 en la membrana plasmática y en el núcleo, respectivamente, de células de hoja de *N. benthamiana* (Figura 41). Estos resultados sugieren que, la degradación de los receptores del ABA puede estar regulada de manera diferente por RSL1 y RFA4, dirigiendo a estos receptores a través de las vías vacuolar o proteosoma 26S, respectivamente.



**Figura 41. Formación simultánea de complejos Receptor/RSL1 y Receptor/RFA4 en diferentes ubicaciones subcelulares reveladas por ensayos multicolores de BiFC. A.** Las flechas (abajo) indican la formación simultánea de PYR1-RSL1 (azul) y PYR1-RFA4 (verde), o PYL4-RSL1 (azul) y complejos PYL4-RFA4 (verde) en células foliares de *N. benthamiana*. Imágenes confocal de células epidérmicas transformadas transitoriamente que coexpresan SCFP<sup>C</sup>-PYR1/PYL4 y SCFP<sup>N</sup>-RSL1 o VENUS<sup>N</sup>-RFA4. Como controles negativos, SCFP<sup>C</sup>-PYR1/PYL4 se coexpresaron con SCFP<sup>N</sup> o VENUS<sup>N</sup>, mientras que SCFP<sup>C</sup> fue coexpresado con SCFP<sup>N</sup>-RSL1 o VENUS<sup>N</sup>-RFA4. La interacción PYR1/PYL4-RSL1 se visualizó mediante la reconstitución del SCFP (paneles superiores), mientras que la interacción PYR1/PYL4-RFA4 dio lugar a la proteína fluorescente SCFP<sup>C</sup>-VENUS<sup>N</sup> (paneles centrales). La interacción de PYR1/PYL4-RSL1 fue localizada en la membrana plasmática (pm) y los endosomas (Belda-Palazon *et al.*, 2016), mientras que la interacción PYR1/PYL4-RFA4 se localizó en el núcleo. Las construcciones fueron realizadas en hojas de tabaco a través de la transfección mediada por *Agrobacterium*. Las hojas se examinaron usando CLSM a 48-72 h después de la infiltración. Los paneles inferiores corresponden a la combinación de los canales SCFP y SCFP<sup>C</sup>-VENUS<sup>N</sup>, que son imágenes captadas de la fluorescencia de clorofila (CF, rojo) y de campo brillante (BF). Barras = 30  $\mu\text{m}$ . **B.** SCFP<sup>C</sup>-RFA4 coexpresado con SCFP<sup>N</sup> o VENUS<sup>N</sup> no reconstituye la proteína fluorescente. Barras = 30  $\mu\text{m}$ .

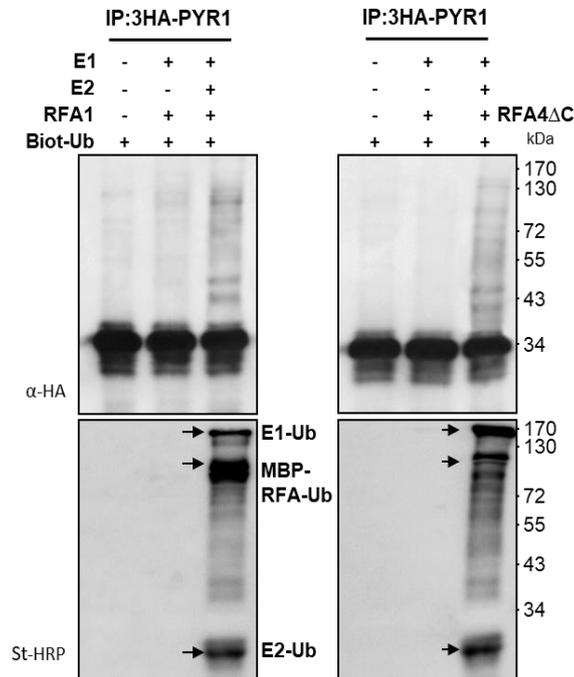
## RFA1 y RFA4 promueven la ubiquitinación de PYR1 *in vitro*

Para poder determinar si RFA1 y RFA4 promueven la ubiquitinación de los PYR/PYLs *in vitro*, generamos las proteínas de fusión MBP-RFA1 y MBP-RFA4ΔC. Para estos experimentos, no utilizamos la versión nativa de RFA4 debido a que la presencia del dominio ácido en el extremo C-terminal imposibilita una buena expresión en el sistema bacteriano utilizado y, por lo tanto, impide una eficiente purificación de la proteína recombinante. Mientras que, por el contrario, la expresión y purificación de la versión RFA4ΔC, la cual sigue manteniendo su capacidad de interacción con los receptores de ABA, como hemos mostrado con los ensayos de BiFC (Figura 10C), no se ve perjudicada en su expresión ni purificación. Mediante la realización de ensayos de arrastre (“Pull-Down”), demostramos que tanto MBP-RFA1 como MBP-RFA4ΔC poseen capacidad de interacción con los receptores PYR1 y PYL4, mientras que esta interacción no es observada, como era de esperar, cuando enfrentamos MBP frente a PYR1 o PYL4 (Figura



**Figura 42. Ensayo pull-down para RFA1 y RFA4 con receptores ABA y muestran la actividad E3 ubiquitina ligasa con PYR1 y PYL4.** Interacción entre PYR1/PYL4 con RFA1 o RFA4ΔC en un ensayo desplegable (PD). MBP purificado MBP-RFA1 o MBP-RFA4ΔC (5mg cada uno) y 5 mg de proteínas 6His-PYR1 o PYL4 se incubaron 1 a 4°C con balanceo constante en 0,5 ml de tampón de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween-20). A continuación, las proteínas MBP, MBP-RFA1 o MBP-RFA4ΔC se purificaron usando cromatografía de afinidad hacia amilosa, eluída y analizada por inmunotransferencia usando anti-HIS y tinción de Ponceau.

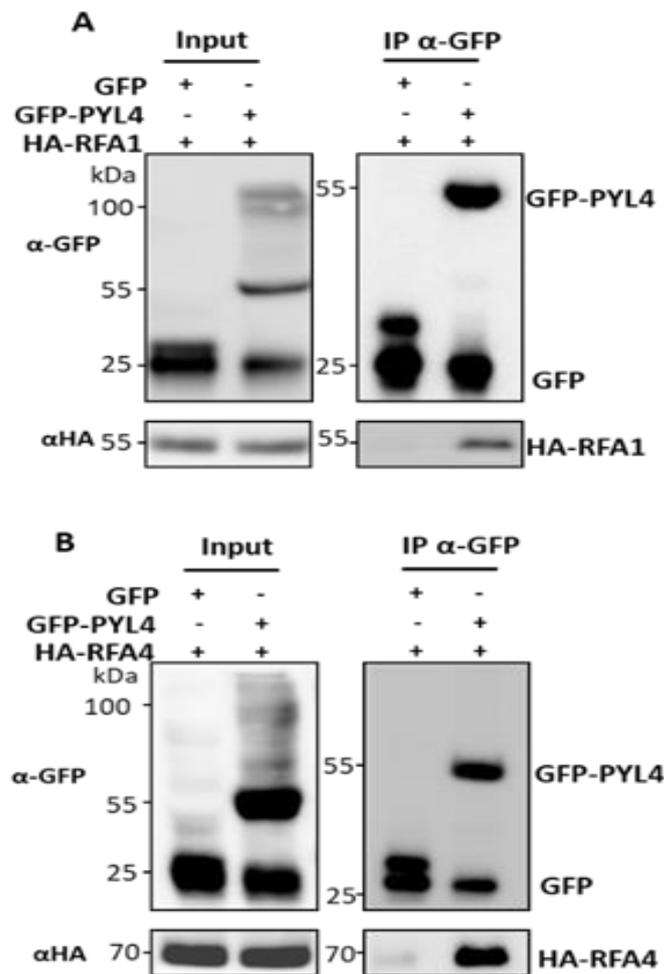
Con la intención de comprobar si RFA1 y RFA4 $\Delta$ C catalizan la transferencia de Ub a PYR1, realizamos una reacción enzimática en columna, usando inmunoprecipitados de líneas transgénicas HA-PYR1 de Arabidopsis. Para este estudio, la reacción enzimática se realizó siguiendo el proceso descrito en Bueso *et al.*, (2014) (Figura 15) usando para ello el inmunoprecipitado de HA-PYR1, Ub-biotinilada, ATP, la enzima activadora E1 humana, la E2 de Arabidopsis UBC8 y MBP-RFA1 o MBP-RFA4 $\Delta$ C. Utilizamos la E2 genérica UBC8, ya que, se ha detectado actividad *in vitro* de UBC8 junto a enzimas de tipo RBR como RSL1 o ARI8, además, UBC8 es la enzima E2 más comúnmente usada, al mostrar una alta actividad y promiscuidad frente a diferentes enzimas E3 ligasas (Bueso *et al.*, 2014b; Kowarschik *et al.*, 2018; Kraft *et al.*, 2005). La incorporación de la Ub-biotinilada en la reacción fue observada mediante el uso de estreptavidina-HRP (estreptavidina-peroxidasa de rábano), mientras que para confirmar la incorporación de Ub en el sustrato usamos el anticuerpo anti-HA. RFA1 y RFA4 también fueron capaces de catalizar la transferencia de ubiquitina al receptor de ABA PYR1 como se revela mediante la inmunotransferencia con anti-HA (Figura 43). Con el uso de St-HRP, también pudimos detectar otras proteínas que se ubiquitinaron en la reacción, que, de acuerdo con el peso molecular esperado, probablemente representan componentes ubiquitinados de la cascada de ubiquitinación, es decir, E1, E2, MBP-RFA1 o MBP-RFA4 $\Delta$ C.



**Figura 43. Ensayo pull-down para RFA1 y RFA4 con receptores ABA que muestran la actividad E3 ubiquitina ligasa con PYR1.** MBP-RFA1 o MBP-RFA4DC (2  $\mu$ g) se analizaron para determinar la actividad de la E3 ligasa en presencia de 100 ng de E1 humano, 250 ng de 6His-AtUBC8 (E2) purificado, 3HA-PYR1 inmunoprecipitado de una línea transgénica de Arabidopsis y 1  $\mu$ g de ubiquitina biotinilada. Después de la incubación a 30°C durante 2 h, la mezcla se sometió a SDS PAGE/transferencia seguida de detección usando estreptavidina-HRP (St-HRP) o antiHA-HRP para detectar proteínas ubiquitinadas o etiquetadas con 3HA, respectivamente. Los componentes de la cascada de ubiquitinación, es decir, E1-Ub, E2-Ub, MBP-RFA1 o MBP-RFA4DC ubiquitinados se indican con flechas.

Además de los ensayos bioquímicos *in vitro*, realizamos experimentos de coimmunoprecipitación de extractos en planta para validar las interacciones observadas. Con este fin, mezclamos extractos de proteína obtenidos de líneas transgénicas de Arabidopsis, que expresan HA-RFA1 o HA-RFA4, tratados con MG132, junto a extractos de proteínas obtenidas desde *N. benthamina* que expresan proteína GFP o GFP-PYL4. Posteriormente realizamos inmunoprecipitados de GFP o GFP-PYL4 usando, para ello, bolas paramagnéticas que tienen acoplado el anticuerpo anti-GFP. Siguiendo el

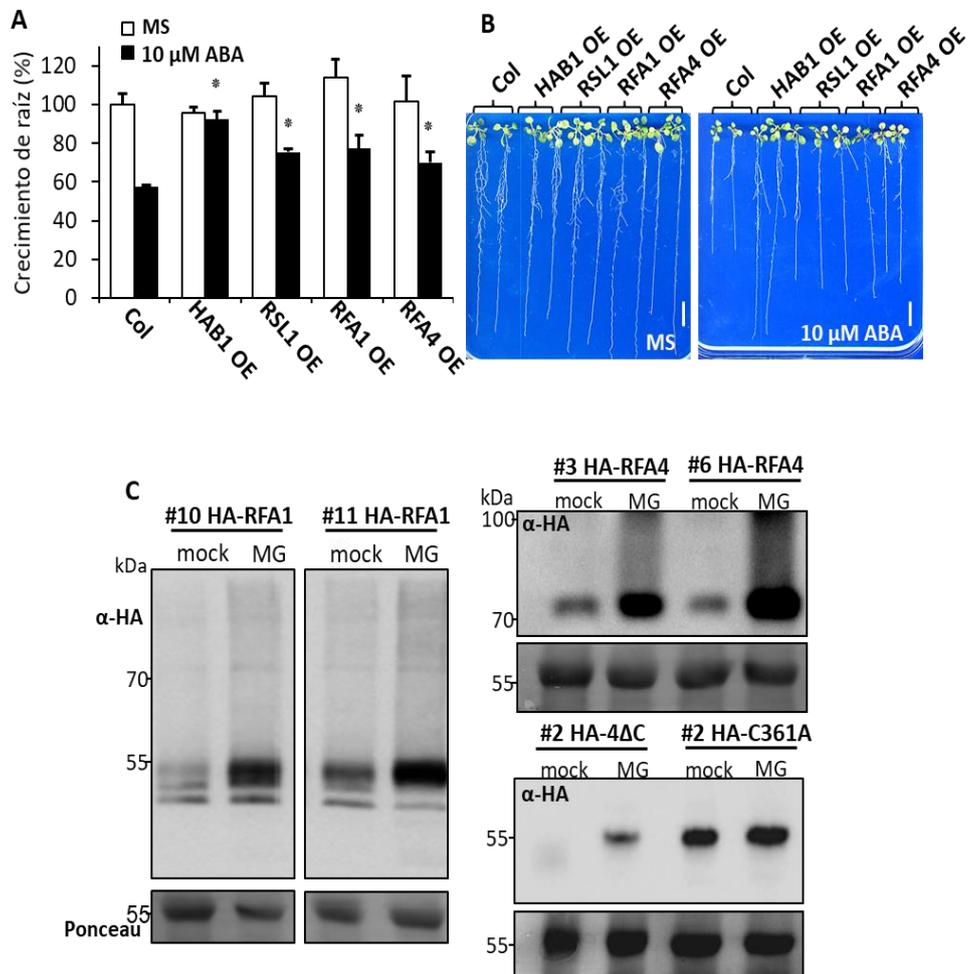
análisis de la inmunotransferencia con anti-HA, pudimos detectar coIP de HA-RFA1 o HA-RFA4 con GFP-PYL4, mientras no existía coIP con el control GFP (Figura 44A-B), demostrando así, que la interacción ocurre entre RFA1/4 y PYL4, y no debido a la presencia de GFP.



**Figura 44. Ensayo pull-down para RFA1 y RFA4 con el receptor PYL4.** PYL4 coimmunoprecipita con RFA1 y RFA4. GFP o GFP-PYL4 se expresaron en *N. benthamiana* y cada extracto de proteína se combinó con extractos de proteína de *Arabidopsis* tratados con MG132 obtenidos de líneas expresando HA-RFA1 o HA-RFA4. Las proteínas se inmunoprecipitaron usando anti-GFP y posteriormente se realizó inmunotransferencia con anti-HA para detectar coIP de HA-RFA1 o HA-RFA4

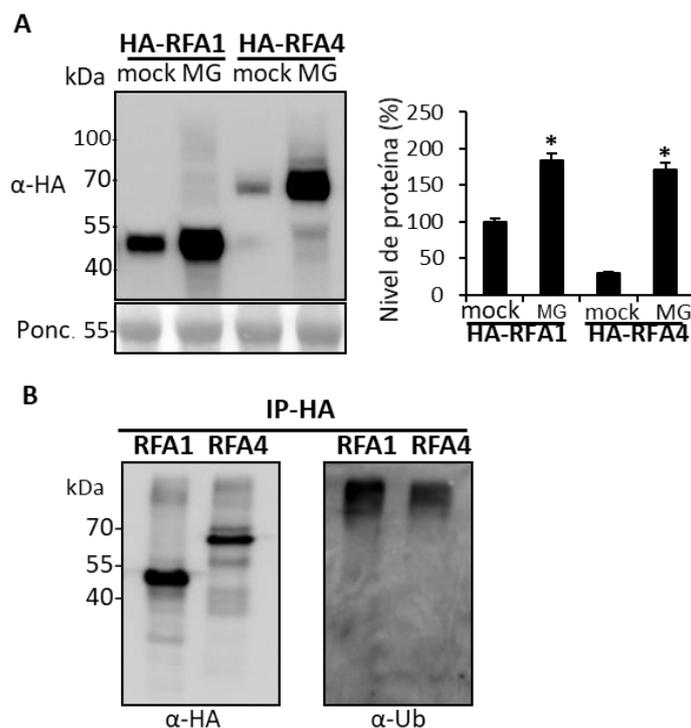
## RFA1 y RFA4 son ubiquitinadas *in vivo*.

Los estudios realizados en mamíferos sobre el mecanismo de acción de las E3 ligasas de tipo RBR, mostraron que sus enzimas E2 afines transfieren la Ub activada a un residuo conservado de Cys presente en el RING2 de la E3, y a su vez, ésta transfiere la Ub desde estos residuos del sitio activo Cys hacia los residuos de lisina diana del sustrato (Dove *et al.*, 2016). Por lo tanto, las E3 de tipo RBR son ubiquitinadas por la E2 durante este proceso y posteriormente, las RBRs ubiquitinan sus dianas a través de un mecanismo similar al usado por las E3 ligasas de tipo HECT (Callis, 2014). Para poder estudiar si RFA1 y RFA4 están ubiquitinadas *in vivo*, construimos líneas transgénicas de Arabidopsis que expresan las proteínas RFA1 y RFA4 bajo un promotor 35S y donde están etiquetadas con el epítipo HA (Figura 45). Curiosamente, estas líneas mostraron una insensibilidad a ABA en el crecimiento de la raíz (Figura 45A-B) que es común al fenotipo de líneas de sobreexpresión de RSL1 (OE), las cuales, se ha demostrado que tienen aumentada la capacidad de degradación de los receptores de ABA (Bueso *et al.*, 2014b; Figura complementaria 5A). Se prepararon extractos proteicos de líneas sobreexpresoras de Arabidopsis para RFA1 y RFA4. El análisis de la inmunotransferencia reveló que, las proteínas RFA1 y RFA4 alcanzaron niveles más altos tras tratamiento con MG132, lo que sugiere que ellas mismas están sujetas a ubiquitinación y a degradación por la vía del proteosoma 26S (Figura 45C).



**Figura 45. Análisis de líneas de Arabidopsis que sobreexpresan diferentes genes RSL1/RFA.** Las líneas 35S: HA-RFA1 y 35S: HA-RFA4 muestran una sensibilidad reducida a la inhibición del crecimiento radicular mediada por ABA en comparación con el tipo silvestre. **A.** Los histogramas muestran la cuantificación de la inhibición mediada por ABA del crecimiento de la raíz en los distintos genotipos de sobreexpresión (OE) en comparación con el silvestre (Col). **B.** Fotografías de 10 días después de la transferencia de plántulas 4 días de edad a placas MS que carecen o son suplementadas con 10  $\mu$ M ABA. Barras = 1 cm. Las plantas que sobreexpresan (OE) HAB1 (Saez *et al.*, 2004) o RSL1 (Bueso *et al.*, 2014) se utilizaron como controles que muestran una sensibilidad reducida a ABA en este ensayo. El asterisco indica  $p < 0.01$  (prueba t de Student) con respecto al Col de tipo silvestre ensayado en las mismas condiciones. **C.** Líneas transgénicas independientes de Arabidopsis que expresan RFA1, RFA4 o acumula niveles más altos de estas proteínas después del tratamiento con MG132 50  $\mu$ M durante 24 h. Los extractos proteicos fueron analizados por inmunotransferencia usando anti-HA. La tinción con Ponceau de la proteína ubiseco se usó como control de carga de proteínas.

De esta misma forma, en muestras tratadas con MG132 se detectaron mediante inmunotransferencia bandas de alto peso molecular para RFA1 y RFA4 que podrían corresponder a formas ubiquitinadas de las E3 ligasas (Figura 46A). Para verificar estos resultados, realizamos la inmunoprecipitación de muestras HA-RFA1 y HA-RFA4, tratadas con MG132. El análisis de la inmunotransferencia usando anticuerpos anti-Ub nos permitió confirmar que, tanto RFA1 como RFA4 son ubiquitinados *in vivo* (Figura 46B).



**Figura 46. A**, Tanto RFA1 como RFA4 están sujetos a degradación a través del proteosoma 26S. Las líneas transgénicas de Arabidopsis que expresan RFA1 o RFA4 etiquetadas con HA acumulan niveles más altos de estas proteínas después de un tratamiento con MG132 de 50  $\mu$ m durante 24 h. Los valores son promedios  $\pm$  sd obtenidos de tres experimentos independientes (n = 5 plantas en cada experimento). \*, P < 0.05 (prueba t de Student) con respecto a la muestra tratada simulada correspondiente. **B**, Tanto RFA1 como RFA4 están ubiquitinados *in vivo*. Las proteínas HA-RFA1 y HA-RFA4 se inmunoprecipitaron de muestras tratadas con MG132 usando anticuerpos anti-HA y posteriormente se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-HA o anti-Ub (P4D1)

## El residuo Cys361 de RFA4 afecta a su propia ubiquitinación y a su capacidad para ubiquitinar PYL4.

Con el fin de identificar el supuesto residuo de Cys catalítico de RFA4 involucrado en la transferencia de Ub a los residuos de lisina, realizamos un alineamiento múltiple de las distintas secuencias de aminoácidos para el dominio RING2 de RFA4, HHARI y Parkin (Figura 47).

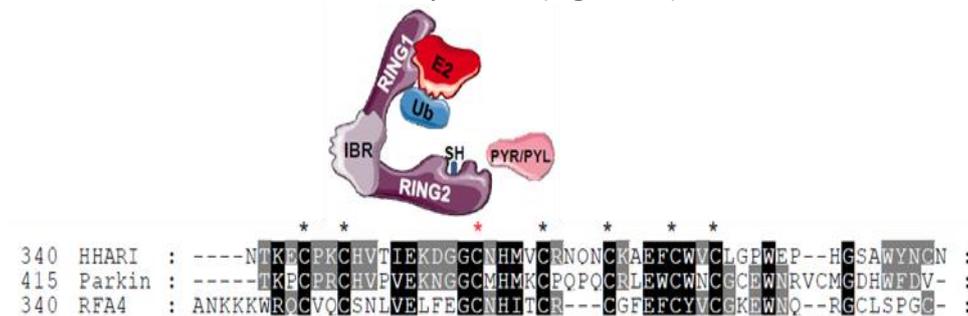
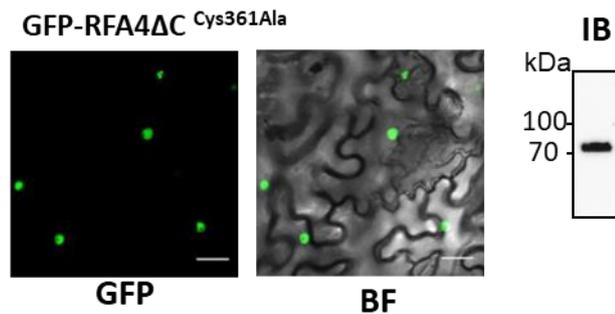


Figura 47. Identificación de Cys361 como el supuesto sitio activo de RFA4. Alineación de secuencia múltiple de HHARI RING2, Parkin RING2 y RFA4 RING2. El supuesto sitio activo cisteína se denota con un asterisco rojo y corresponde a Cys357, Cys431 y Cys361, respectivamente. De acuerdo con la estructura cristalina de HHARI y Parkin (Riley *et al.*, 2013; Duda *et al.*, 2013), los residuos de ligando de zinc (asteriscos negros) de RING2 no están dispuestos en topología de coordinación de zinc entre llaves como dominios de RING canónicos, sino de forma secuencial. Caricatura de la estructura modular RING1-IBR-RING2 de RFA4 y la localización RING1-IBR del sitio activo Cys361-SH residuo en RING2, según el modelo de Wenzel *et al.*, (2011).

Como resultado de esta comparativa, pudimos identificar una Cys situada en la posición 361 de RFA4 como la más probable a ser la cisteína presente en el sitio activo de RFA4, al ser la equivalente de las cisteínas de los sitios activos conocidos para Parkin, Cys431, y para HHARI, Cys357, descritos en trabajos previos (Duda *et al.*, 2013; Riley *et al.*, 2013; Wenzel & Klevit, 2012). Para profundizar sobre la posibilidad de que esta Cys361 fuese la cisteína del sitio activo, realizamos la mutación Cys361Ala en RFA4 y pudimos demostrar

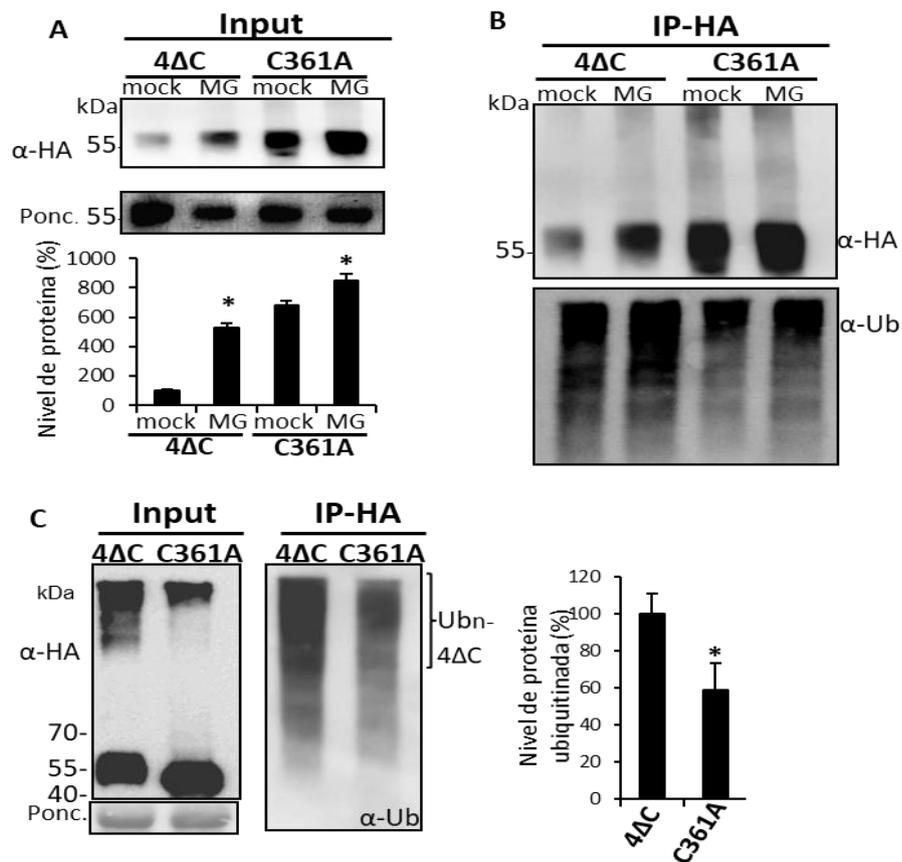
que, mediante la expresión en transitoria de la construcción GFP-RFA4 $\Delta$ C<sup>361A</sup>, no se veía afectaba su localización, la cual seguía siendo nuclear (Figura 48).



**Figura 48.** El mutante Cys361Ala RFA4 se localiza en el núcleo de las células de la hoja de *N. benthamiana*. Imágenes de confocal de células de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente por agroinfiltración para expresar GFP-RFA4 $\Delta$ C<sup>361Ala</sup>. Análisis de inmunotransferencia. (IB) Se utilizó anti-GFP para verificar la expresión de la proteína de fusión. Barras = 30  $\mu$ m

Por otra parte, generamos construcciones para RFA4 $\Delta$ C y RFA4 $\Delta$ C<sup>Cys361Ala</sup> etiquetadas con HA, las cuales fueron utilizadas para obtener líneas estables en *Arabidopsis* (Figura 49A) y, además, fueron usadas en ensayos de infiltración en células de hoja de *N. benthamiana* (Figura 49C). Los niveles de expresión obtenidos para HA-RFA4 $\Delta$ C fueron menores a los obtenidos con HA-RFA4 $\Delta$ C<sup>Cys361Ala</sup>, incluso en plantas de *Arabidopsis* transformadas con HA-RFA4 $\Delta$ C y tratadas con MG132 (Figura 49A). Tras los ensayos de inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-HA y su posterior análisis con anticuerpos anti-Ub, pudimos detectar que existe más ubiquitinación de la proteína de fusión HA-RFA4 $\Delta$ C en comparación con la proteína de fusión HA-RFA4 $\Delta$ C<sup>Cys361Ala</sup> (Figura 49B). También obtuvimos resultados similares de expresión en transitoria en células de tabaco, para los cuales, la expresión de HA-RFA4 $\Delta$ C fue menor que la de HA-RFA4 $\Delta$ C<sup>Cys361Ala</sup> (Figura 49C).

Sin embargo, las cantidades observadas para las formas de estas E3 que presentan mayor peso molecular, fueron más abundantes en el caso de HA-RFA4ΔC que en el caso de HA-RFA4ΔC<sup>Cys361Ala</sup>.

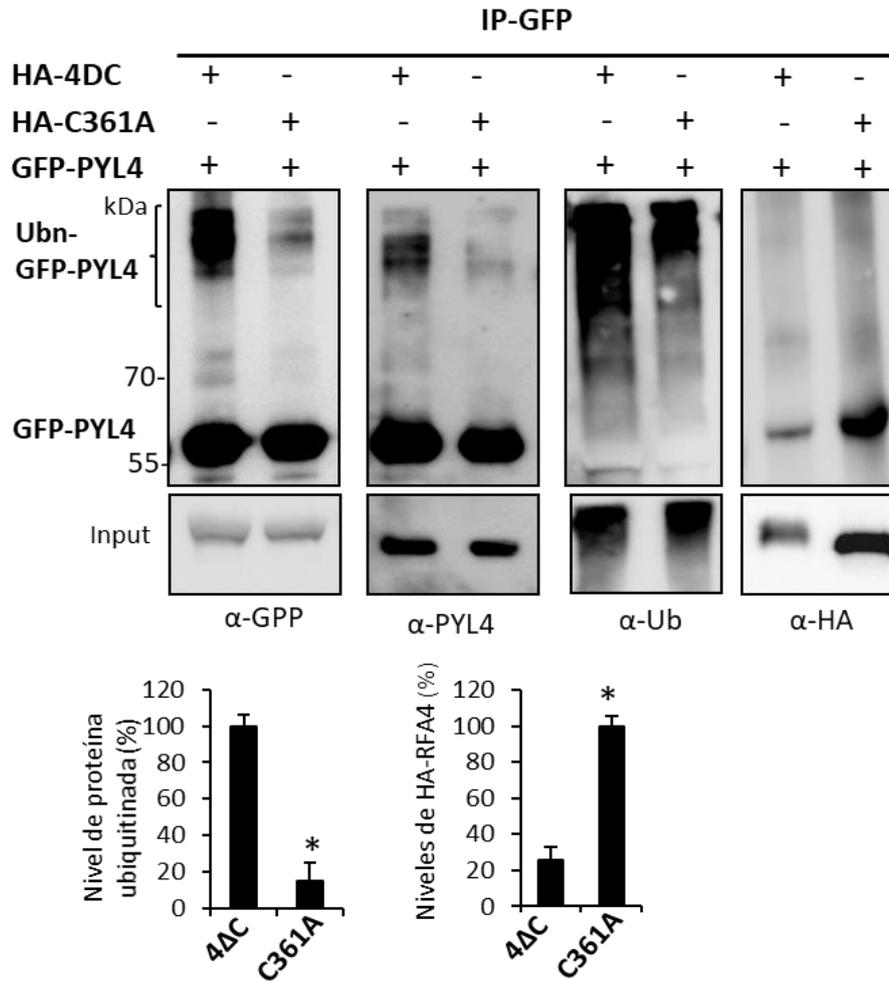


**Figura 49. A**, La mutación Cys-361Ala reduce notablemente la ubiquitinación de RFA4 y estabiliza la proteína en comparación con el tipo silvestre. Las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan RFA4ΔC o RFA4ΔC<sup>Cys-361Ala</sup> etiquetadas con HA acumulan niveles más altos de estas proteínas después del tratamiento con 50 μm de MG132 durante 24 h. **B** Los extractos de proteínas se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-HA y posteriormente se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-HA o anti-Ub (P4D1). Los valores son promedios ± SD obtenidos de tres experimentos independientes (n = 5 plantas en cada experimento), y los niveles de proteína RFA4ΔC en plantas tratadas simultáneamente se tomaron como 100%. \*, P < 0.05 (prueba t de Student) en comparación con la muestra tratada simulada correspondiente. **C**, La expresión transitoria en *N. benthamiana* de RFA4ΔC marcado con HA o RFA4ΔC<sup>Cys-361Ala</sup> revela una ubiquitinación reducida de RFA4ΔC<sup>Cys-361Ala</sup> en comparación con el tipo silvestre. \*, P < 0.05 (prueba t de Student).

Para analizar la ubiquitinación de las proteínas HA-RFA4ΔC y HA-RFA4ΔC<sup>Cys361Ala</sup>, se analizaron extractos de estas proteínas obtenidos por inmunoprecipitación (IP) utilizando anticuerpos anti-HA y anticuerpos anti-Ub. Esto reveló que existía una reducción de ubiquitinación de alrededor del 50% en el mutante Cys361Ala en comparación con el tipo silvestre (Figura 21C). Si tomamos el conjunto de los resultados obtenidos tanto desde plantas de *Arabidopsis* como de *N. benthamiana*, se puede llegar a sugerir que la Cys361 está involucrada en la ubiquitinación de RFA4, aunque también es posible que otros residuos Lys o Cys de RFA4 puedan ser susceptibles de ser ubiquitinados.

Por otro lado, quisimos examinar si la mutación Cys361Ala afectaba a la capacidad de RFA4 para ubiquitinar al sustrato PYL4. Para ello realizamos un ensayo de una ubiquitinación *in vivo* en el que coexpresábamos GFP-PYL4 en hojas de *N. benthamiana* junto a HA-RFA4ΔC o HA-RFA4ΔC<sup>Cys361Ala</sup> (Figura 22). Dos días después de la agroinfiltración se prepararon muestras de discos de extractos de proteínas, y se inmunoprecipitaron usando anti-GFP. El análisis se realizó mediante una inmunotransferencia, usando para ello cuatro anticuerpos diferentes (Figura 50). Para las muestras donde GFP-PYL4 se coexpresó junto a HA-RFA4ΔC, se usaron los anticuerpos anti-GFP, anti-PYL4 y anti-Ub, revelando una mayor ubiquitinación de PYL4 en comparación con las muestras en las que se coexpresó GFP-PYL4 junto a HA-RFA4ΔC<sup>Cys361Ala</sup> (Figura 50). Estos resultados indican, por lo tanto, que la Cys361 es un residuo importante para la actividad de RFA4. Además, se podría deducir que la co-IP de HA-RFA4ΔC<sup>Cys361Ala</sup> y GFP-PYL4,

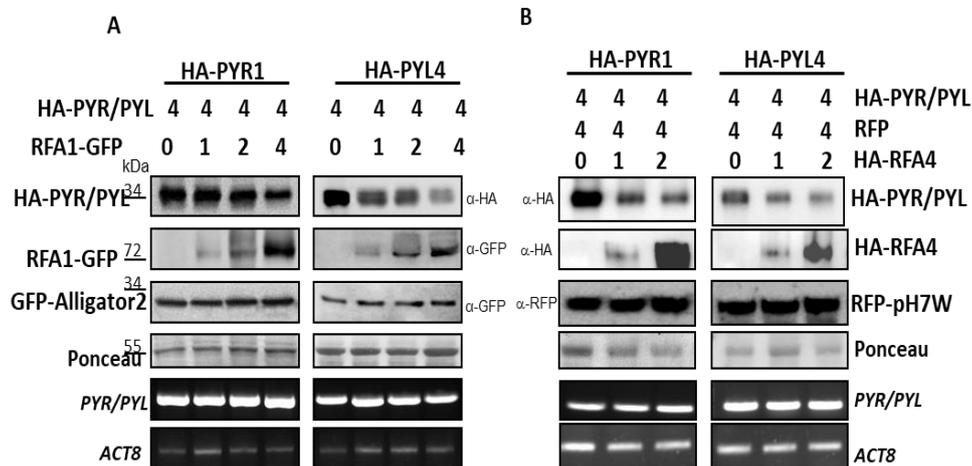
probablemente se vio favorecida porque la proteína del mutante Cys361Ala se presenta a un nivel de expresión más alto (panel anti-HA).



**Figura 50. Ubiquitinación *in vivo* de PYL4 por RFA4ΔC en células de hoja de *N. benthamiana*.** Las agrobacterias que codifican GFP-PYL4 se coinfiltraron en células de *N. benthamiana* con agrobacterias que codifican HA-RFA4ΔC o RFA4ΔC<sup>Cys-361Ala</sup>. Los extractos de proteínas se inmunoprecipitaron usando anti-GFP y posteriormente se inmunotransfirieron con anticuerpos anti-GFP, anti-PYL4, anti-Ub y anti-HA. \*, P < 0.05 (prueba t de Student) en comparación con el tipo silvestre. Los valores de las gráficas son promedios ± sd obtenidos de tres experimentos independientes (n = 5 hojas en cada experimento).

## RFA1 y RFA4 promueven la degradación *in vivo* de los receptores ABA.

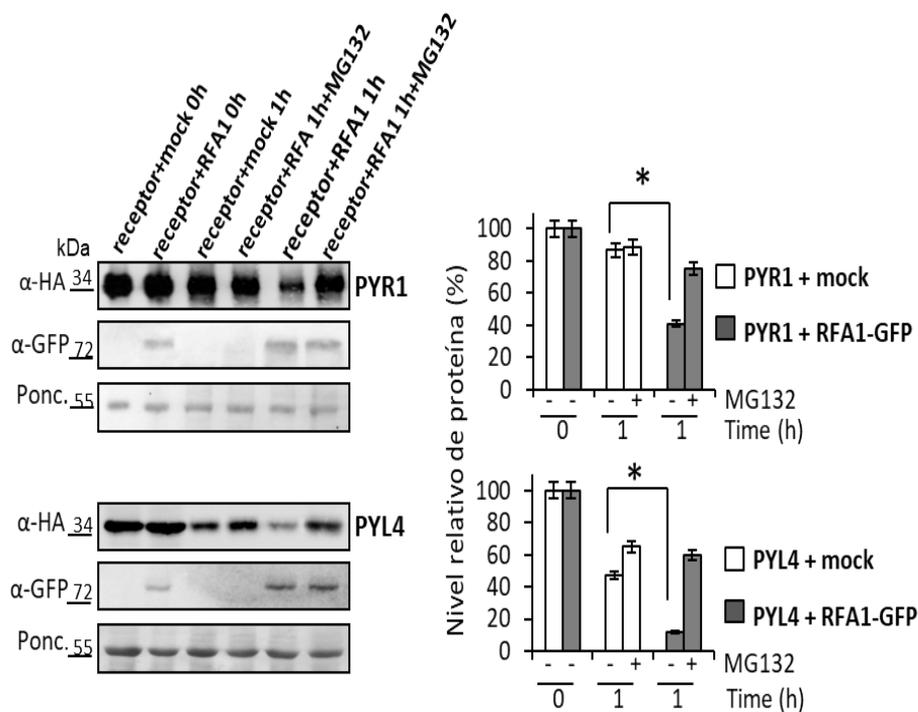
Una vez confirmada la capacidad de RFA1 y RFA4 para interactuar con los receptores de ABA PYR1 y PYL4, así como su capacidad para ubiquitinarlos, realizamos experimentos de coinfiltración en hojas de *N. benthamiana* para comprobar si RFA1/RFA4 pueden promover la degradación de sus sustratos diana en condiciones *in vivo* (Zhao *et al.*, 2013). Para ello, cantidades crecientes de *Agrobacterium*, las cuales dirigen la expresión de las E3 ligasas, fueron coinfiltradas conjuntamente con agrobacterias que codifican constructos para expresar diferentes receptores de ABA. Seguidamente, las muestras fueron recolectadas para la detección de los niveles de expresión de proteína y de ARNm (Figura 56A-B). El análisis de estos resultados muestra como las cantidades crecientes de RFA1 condujeron a un descenso progresivo de los niveles de proteína para PYR1 y PYL4, mientras que el control interno de GFP no se vio significativamente afectado por el aumento progresivo en la cantidad de RFA1 (Figura 56A). Del mismo modo, cantidades crecientes de RFA4 llevaron a degradación a PYR1 y PYL4, mientras que el control interno de RFP se mantuvo estable (Figura 56B).



**Figura 56. Análisis de la degradación promovida por RFA1 y RFA4 de PYR1 y PYL4 *in vivo* A, B.** Se observó degradación *in vivo* de PYR1 o PYL4 en la coinfiltración experimentos con cantidades crecientes de RFA1 o RFA4. La relación de la concentración relativa de las agrobacterias utilizadas en las diferentes infiltraciones se indican mediante números (arriba). En A, los extractos celulares fueron analizado usando anti-HA para detectar PYR1/PYL4 marcado con HA y anti-GFP para detectar GFP-RFA1, mientras que en B. Se usó anti-HA para detectar PYR1/PYL4 marcado con HA y HA-RFA4. Anticuerpos anti-GFP o anti-RFP se utilizaron para detectar el control interno de GFP o RFP, respectivamente. Los niveles de expresión de ARNm de los genes *PYR1* y *PYL4* objetivo y *ACTIN8* (*ACT8*) se analizaron por RT-PCR. Las masas moleculares de las proteínas marcadoras se indican en kDa.

También analizamos si RFA1 podía promover la degradación de PYR1 y PYL4 mediante la realización de un ensayo de degradación semi-*in vivo* (Liu *et al.*, 2010). Para la realización de este experimento, RFA1 y cada PYR/PYL se expresaron por separado a través de diferentes agroinfiltraciones. Después mezclamos los extractos de *N. benthamiana* que contienen RFA1 con cada uno de los PYR/PYL y monitoreamos los niveles de proteína después de 1 h de incubación a 4 °C (Figura 57). La adición de RFA1 mejoró la degradación de PYR/PYL en comparación a la muestra con extracto no agroinfiltrado utilizándolos como un simulacro del experimento anterior. Cuando se

incluyó el inhibidor del proteosoma MG132, el nivel de PYR/PYL aumentó 2-3 veces con respecto a la muestra que carece del inhibidor, por lo que RFA1 promueve la degradación de PYR1 y PYL4 a través de la vía del proteosoma 26S.



**Figura 57. Experimentos de extractos de células de *N. benthamiana* muestran PYR1/PYL4 marcado con HA degradación es promovida por RFA1.** La degradación de HA-PYL4 o HA-PYR1 se realizó mezclando extractos de células *N. benthamiana* de agroinfiltraciones separadas. El extracto de HA-PYL4 o HA-PYR1 se mezcló con extracto de RFA1-GFP o extracto de control simulado e incubado a 4°C durante 1 h, ya sea en ausencia o presencia de MG132. Las proteínas se detectaron por inmunotransferencia como se describió anteriormente. La tinción de Ponceau de la proteína rubisco se muestra como un control de carga. Los paneles de la derecha muestran la cuantificación del experimento. \* indica  $P < 0.05$  (prueba t de Student) en comparación con la muestra tratada simulada correspondiente

## Identificación de UBC26 como la enzima asociada E2 de localización nuclear que interactúa con la E3 ligasa RFA4.

La unión de Ub a las proteínas sustrato es catalizada por la acción concertada de enzimas E1, E2 y E3. Las E3 ligasas median, dentro de la maquinaria de ubiquitinación, la especificidad del sustrato; sin embargo, las E2 también juegan un papel clave para mediar en el ensamblado de la cadena de Ub con el sustrato (Callis, 2014; Kowarschik *et al.*, 2018). En el caso de E3 ligasas tipo-RING/U-box, la acción concertada de la pareja E2/E3, regula la especificidad del sustrato y el tipo de modificación de Ub en esas proteínas diana (Zhao *et al.*, 2013). En el caso de las E3s de mamíferos de tipo HECT y RBR, los residuos de Cys presentes en el sitio activo determinan el tipo de ubiquitinación, sin embargo, el mecanismo de acción de estas E3s vegetales es, actualmente, poco conocido (Dove *et al.*, 2016; Kim & Huibregtse, 2009). Se desconoce en plantas, por lo tanto, la cohorte de enzimas E2 que funcionan junto con las ligasas de tipo RBR, así como cuáles son sus características y las consecuencias de esta interacción durante el proceso de ubiquitinación del sustrato. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado secuencias que codifican para 48 proteínas que contienen dominios UBC; sin embargo, solamente 37 de esas proteínas poseen la cisteína en el centro activo requerida para realizar la actividad de transferencia y unión de Ub de las enzimas E2 (Callis, 2014). Por este motivo, en este trabajo estamos

particularmente interesados en la identificación de enzimas E2s nucleares que pudieran interactuar con RFA4 para formar un complejo nuclear de E2/E3; para ello, y gracias a la colaboración con el laboratorio del Dr. Alain Goossens (Universidad de Ghent, Departamento de Biotecnología y Bioinformática de Plantas, Ghent, Bélgica) en particular, a la Dra. Sabrina Iñigo, se realizó un rastreo mediante ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H) con el objetivo de identificar enzimas E2 afines en la interacción con RFA4. Para estos estudios se realizaron las construcciones GAD-RFA4 o GAD-RFA4 $\Delta$ C que fueron usadas como cebo para enfrentarse a una biblioteca de levaduras pGBD que contenía 30 tipos diferentes de enzimas E2. Como resultado, encontramos que tanto UBC24 (PHO2) como UBC26, que pertenecen a la familia XI de proteínas E2 de Arabidopsis, interactúan con RFA4 y RFA4 $\Delta$ C (Figura 58A-B). El resto de enzimas E2 de la librería analizada, no mostraron ninguna señal de interacción con RFA4.

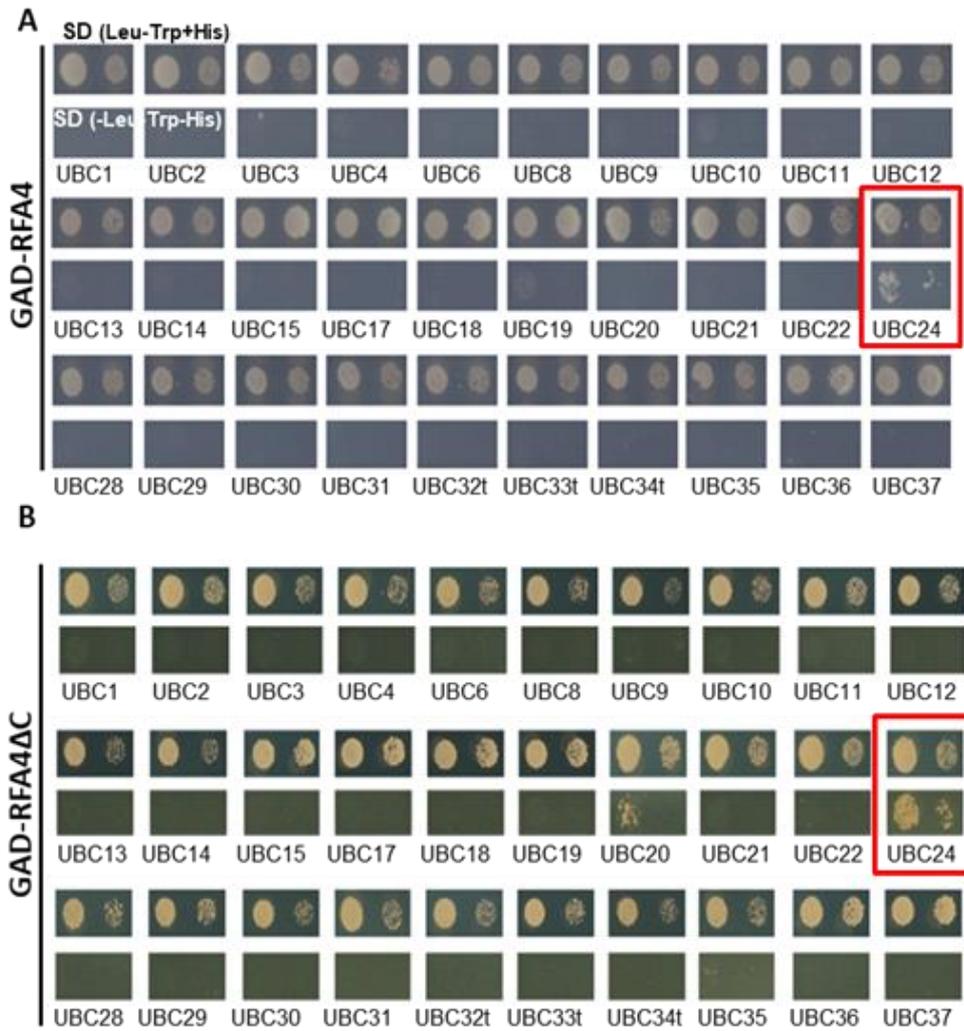


Figura 58. Ensayo Y2H entre RFA4 o RFA4ΔC y un panel de 30 conjugaciones de Arabidopsis E2 Ub enzimas (UBC). **A.** RFA4 o **B.** RFA4ΔC se fusionó con el dominio de activación de GAL4 (AD) en pGADT7 y todos los UBC fueron clonado en pGBKT7 como presas (Nagels *et al.*, 2016). El dominio transmembrana de UBC32, UBC33 y UBC34 fue eliminado para evitar resultados falsos negativos (indicado como UBC32t, UBC33t y UBC34t). Los paneles superiores muestran crecimiento en medio sintético definido (SD) que carece de Leu (-Leu) y Trp (-Trp) suplementado con His (+ His), mientras que los paneles inferiores muestran crecimiento en SD medio que carece de Leu, Trp y His (SD-Leu-Trp-His)

Tras estos resultados, enfocamos nuestros trabajos especialmente en estudiar la interacción con UBC26, debido a que esta E2 contiene en su extremo C-terminal una señal de localización nuclear (KKKTRKR) (Figura 59).

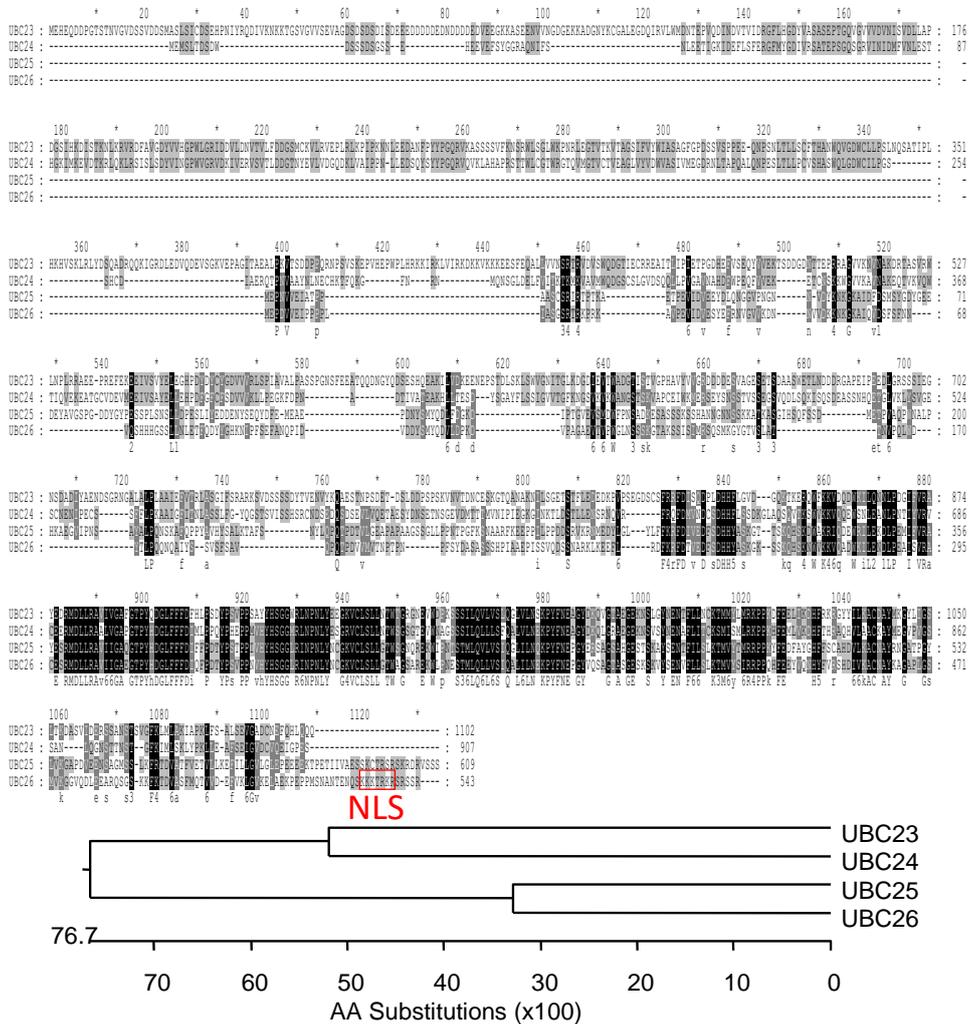


Figura 59. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de UBC del grupo XI UBC23, UBC24, UBC25 y UBC26. Solo UBC26 contiene una señal de localización nuclear (caja roja). La subfamilia UBC23/24 contiene una región N-terminal extra larga que no está presente en subfamilia UBC25/26. Los residuos de aminoácidos conservados en el extremo C (en negrita) delimitan el dominio del núcleo catalítico presente en todas las enzimas E2.

Recurrimos de nuevo a la base de datos (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; (Waese *et al.*, 2017)) para obtener los niveles de expresión del ARNm de UBC26 y los comparamos con los datos de microarrays de RFA4, estos datos muestran que la enzima E2 UBC26 se expresa en estadios similares a la E3 ligasas RFA4 (Figura 60).

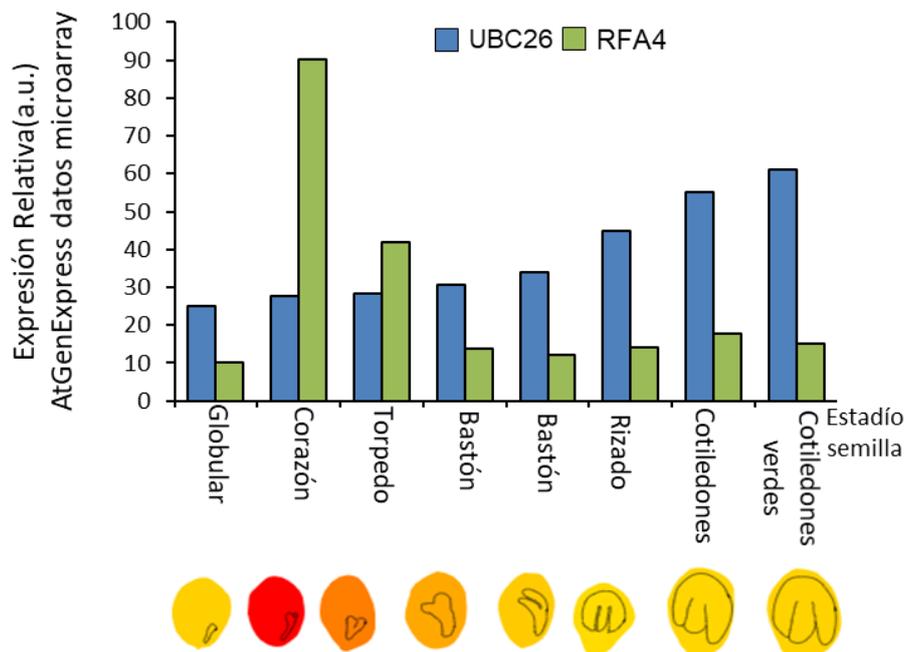
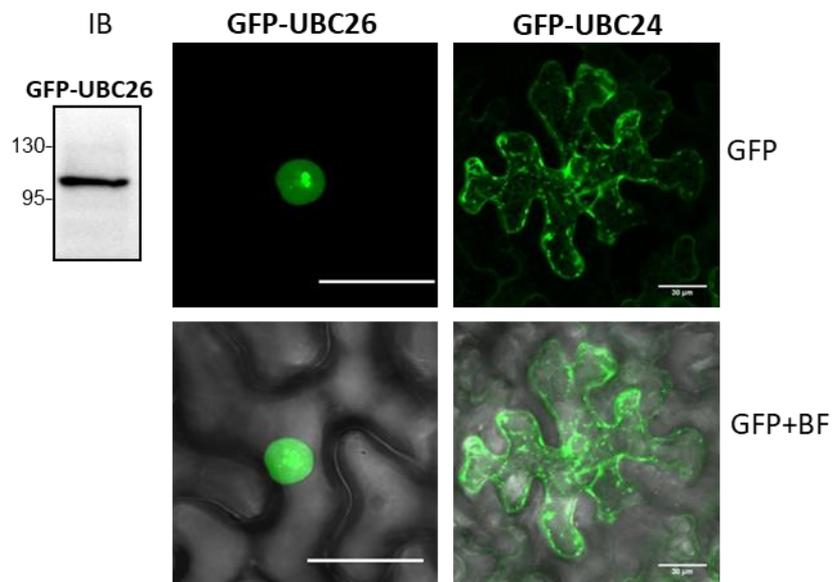


Figura 60. Datos expresión relativa genes UBC26 y RFA4 en silfua y en diferentes etapas del desarrollo embrionario de la semilla. Los datos de expresión se obtuvieron de experimentos descritos en la base de datos pública AtGenExpress (Goda *et al.*, 2008) utilizando microarrays de Affymetrix para Arabidopsis y visualizados mediante la herramienta de visualización AtGenExpress ubicada en <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>. En la parte inferior de la gráfica se representa los niveles de expresión en semilla de RFA4.

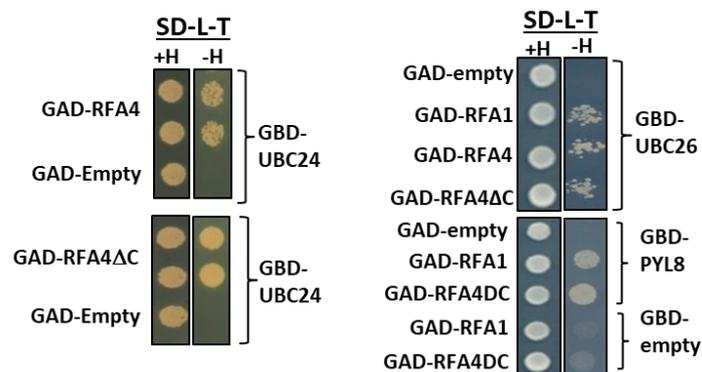
De hecho, estudios de localización mediante el análisis de proteínas de fusión GFP-UBC26, muestran que ésta se localiza en el núcleo (Figura 61), mientras que UBC24 se encuentra colocalizada principalmente con marcadores del retículo endoplasmático (ER) y de Golgi (Liu *et al.*, 2012).



**Figura 61.** GFP-UBC26 se localiza en el núcleo tras la expresión transitoria en *N. benthamiana*, mientras que GFP-UBC24 parece estar asociado a la membrana. El análisis de inmunotransferencia usando anti-GFP se usó para verificar la expresión de GFP-UBC26

Por otra parte, para UBC26 también se ha observado que, además de interactuar con RFA4, también es capaz de interactuar con RFA1 en ensayos de Y2H; sin embargo, y ya que RFA1 posee localización citosólica es probable que otras UBC no identificadas interactúen con RFA1 en esta localización. Adicionalmente, utilizando ensayos de Y2H, pudimos confirmar que RFA1 y

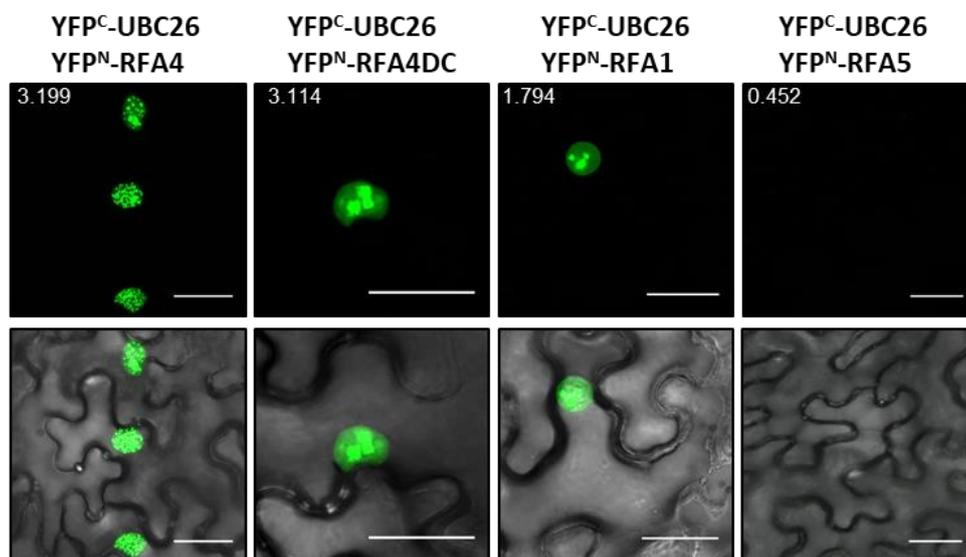
RFA4ΔC podrían interactuar con los receptores de ABA (Figura 62) lo que indica que estas E3 pueden interactuar en ensayos de Y2H con ambas proteínas, es decir tanto con la enzima E2 afín, como con el sustrato diana.



**Figura 62. UBC26 y el complejo receptor UBC26-RFA4-ABA se localizan en el núcleo. interacciones Y2H de RFA1 y RFA4.** Los cultivos de levadura transformada se cultivaron durante la noche en un medio líquido sintético definido (SD) que carece de Leu y Trp, y a una dilución (10<sup>-1</sup>) de estos cultivos se dejó caer en un medio de control que carece de Leu y Trp (SD – Leu – Trp + His) o medio selectivo que además carece de His (SD – Leu – Trp – His). Se usaron vectores vacíos como controles negativos, y se permitió que la levadura creciera durante 3 días a 30 ° C antes de que se puntuara la interacción.

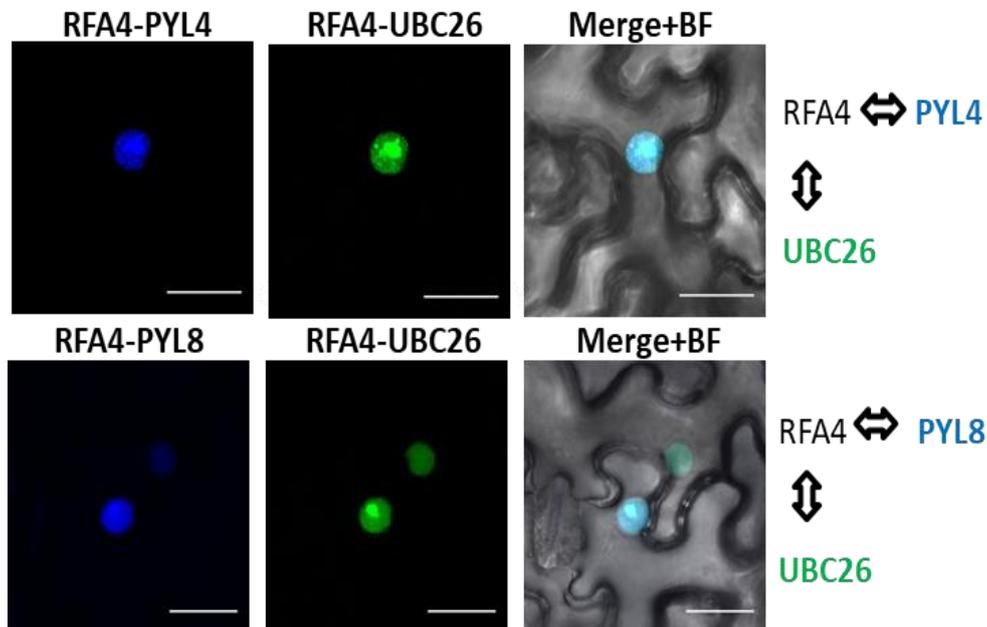
El estudio en planta de la interacción entre RFA1 o RFA4 con UBC26, fue realizado mediante ensayos de BiFC (Figura 30). En ellos, coexpresamos, en células de hojas de *N. benthamiana*, las distintas proteínas de fusión YFP<sup>N</sup>-RFA4, YFP<sup>N</sup>-RFA4ΔC o YFP<sup>N</sup>-RFA1 junto a YFP<sup>C</sup>-UBC26 y pudimos demostrar que interactúan en el núcleo de estas células. Por el contrario, aunque los niveles de expresión fueron similares a otras RFAs, la proteína RFA5, estrechamente relacionada con RFA1/4, no interactuaba con UBC26, (Figura 63, véase Figura 31 datos de expresión de RFA5). Los focos de expresión nucleares formados por la interacción de RFA4-UBC26 fueron diferentes a los formados por la interacción de RFA4ΔC-UBC26, resultando estos últimos

más similares a los focos de expresión de RFA1-UBC26. Estos resultados nos hacen sugerir que, aunque el dominio ácido C-terminal de RFA4 resulta prescindible para la interacción con el sustrato y la E2, puede jugar un papel determinante en la ubicación de la interacción en unos territorios nucleares diferentes.



**Figura 63. Interacción BiFC de RFA4 y UBC26 en el núcleo de las células epidérmicas de *N. benthamiana*.** Las imágenes de confocal muestran células de hoja transformadas transitoriamente que coexpresan YFP<sup>C</sup>-UBC26 y YFP<sup>N</sup>-RFA4, RFA4ΔC, RFA1 o RFA5. Tenga en cuenta que la interacción E2-E3 decora las motas nucleares, mientras que la interacción PYL4-E3 está ausente en el nucléolo. La eliminación del dominio ácido de RFA4 cambia el patrón nuclear de la interacción E2-E3 en comparación con RFA4FL. YFP<sup>C</sup>-UBC26 no interactúa con YFP<sup>N</sup>-RFA5, que es otro miembro de la familia RFA. La cuantificación de la señal YFP fue analizada por el software ImageJ, y las unidades arbitrarias de fluorescencia se indican en números

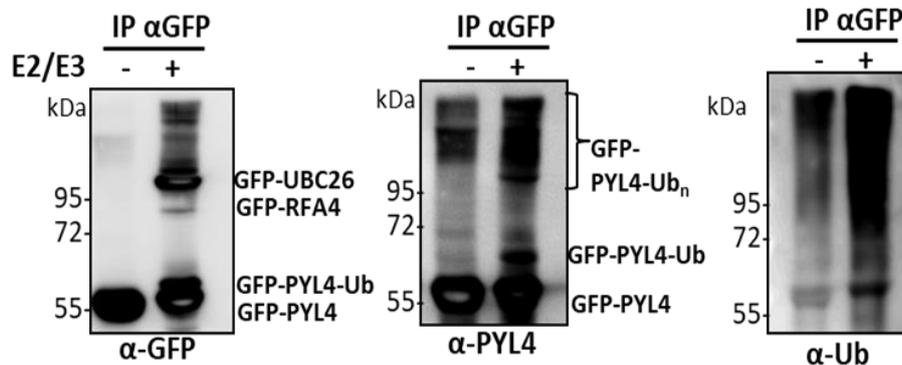
Finalmente realizamos un ensayo del tipo BiFC multicolor (Gehl *et al.*, 2009) para analizar la posible formación de complejos nucleares receptor-E3-E2. Como resultado, demostramos la capacidad de RFA4 (E3) de interactuar con ambas proteínas, la E2 (UBC26) y los receptores de ABA (PYL4/8), cuando se coexpresan en células de tabaco (Figura 64)



**Figura 64.** Multicolor BiFC revela la formación de complejos nucleares E2-E3-PYL4/8. Las imágenes de confocal muestran células epidérmicas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente que coexpresan SCFP<sup>N</sup>-RFA4, SCFP<sup>N</sup>-PYL4/8 y VENUS<sup>N</sup>-UBC26. La interacción RFA4-PYL4/8 se visualizó mediante la reconstitución de la SCFP, mientras que la interacción RFA4-UBC26 dio lugar a la proteína fluorescente SCFP<sup>C</sup>-VENUS<sup>N</sup>. SCFP<sup>C</sup>-RFA4 coexpresado con SCFP<sup>N</sup> o VENUS<sup>N</sup> no reconstituyó la proteína fluorescente

Otros trabajos han descrito la dificultad de expresión de UBC26 en *Escherichia coli* (Zhao *et al.*, 2013). Realmente, algunas E2 no son inducidas o son insolubles cuando son expresadas en bacterias y en estos casos, la actividad catalítica de las E2 puede ser recuperada después de ser expresadas en plantas (Zhao *et al.*, 2013). Debido a que nosotros expresamos con éxito GFP-UBC26 por agroinfiltración en células de tabaco y que, además, podían detectarse complejos nucleares PYL4-RFA4-UBC26 (Figura 64), decidimos configurar un ensayo de ubiquitinación *in vivo* en el que participasen GFP-PYL4, GFP-UBC26 y GFP-RFA4 (Figura 65). Estas

proteínas de fusión a GFP, fueron entonces inmunoprecipitadas y posteriormente analizados los niveles de ubiquitinación de PYL4 usando los anticuerpos anti-PYL4 y anti-Ub, respectivamente (Figura 65). Las formas proteicas de mayor peso molecular de PYL4, fueron reconocidas tanto por anticuerpos anti-PYL4 como anti-Ub y los niveles obtenidos se vieron enriquecidos notablemente cuando las proteínas E2/E3 fueron coexpresadas junto a PYL4, lo que sugiere que la ubiquitinación de PYL4 se vio aumentada por la acción de UBC26 y RFA4 (Figura 65). Sin embargo, también pudimos detectar niveles bajos de ubiquitinación de PYL4 en células de *N. benthamiana* en ausencia de coexpresión de E2/E3. Este hecho había sido también observado previamente en líneas de *Arabidopsis* que expresaban HA-PYL4 (Bueso *et al.*, 2014b). Estos niveles bajos de ubiquitinación observados podrían ser explicados por la existencia de niveles endógenos de enzimas E2/E3 en Nicotiana.



**Figura 65.** Ubiquitinación in vivo de PYL4 por UBC26-RFA4 en células de hoja de *N. benthamiana*. Las agrobacterias que codifican GFP-PYL4 se coinfiltraron en células de *N. benthamiana* con agrobacterias que carecen o codifican proteínas GFP-UBC26/GFP-RFA4 (-/+ E2E3). Los extractos de proteínas se inmunoprecipitaron usando anti-GFP y luego se inmunotransfirieron con anti-GFP, anti-PYL4 y anti-Ub para detectar la ubiquitinación de GFP-PYL4 en ausencia o presencia de proteínas GFP-UBC26/GFP-RFA4. La extracción de GFP-RFA4 para el análisis SDS-PAGE parece ser ineficiente debido al gran dominio ácido C-terminal.

Para finalizar, observamos que cuando expresábamos GFP-PYL4 junto a E2 o E3, el nivel basal de ubiquitinación de PYL4 no sufrió un aumento significativo (Figura 66).

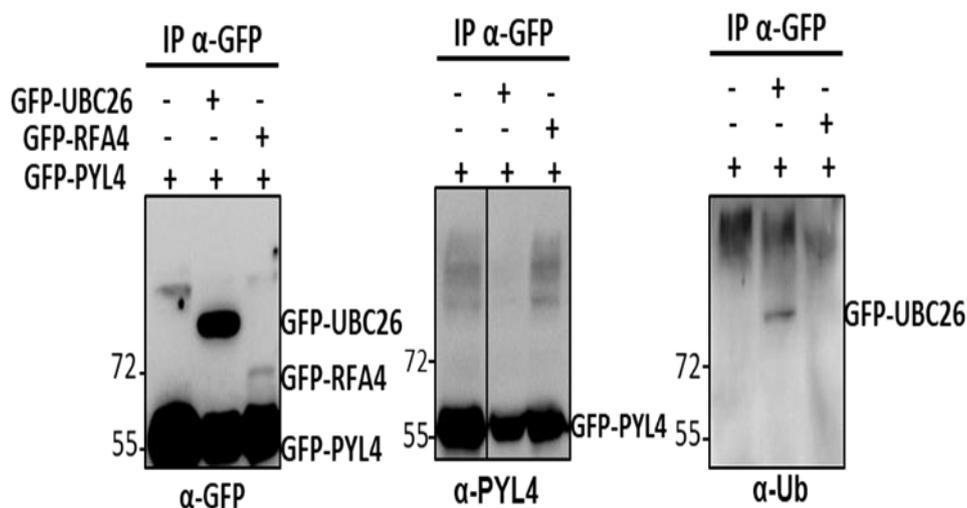
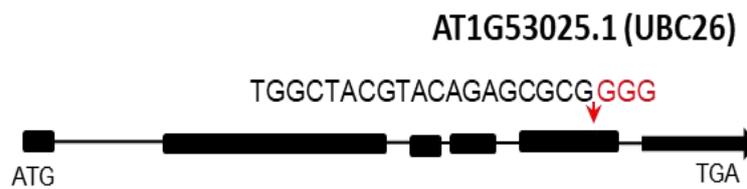


Figura 66. La expresión de GFP-PYL4 con sólo la E2 (UBC26) o la E3 (RFA4) no mejora significativamente ubiquitinación basal de PYL4. Las agrobacterias que codifican GFP-PYL4 se coinfiltraron en células de *N. benthamiana* con agrobacterias que carecen o codifican proteínas GFP-UBC26 o GFP-RFA4. Los extractos de proteínas fueron inmunoprecipitados usando anti-GFP y luego inmunotransfirieron con anti-GFP, anti- PYL4 y anti-Ub para detectar la ubiquitinación de GFP-PYL4 en ausencia o en presencia de proteínas GFP-UBC26 o GFP-RFA4. Extracción de GFP-RFA4 para el análisis SDS-PAGE parece ser ineficiente debido al gran dominio ácido C-terminal.

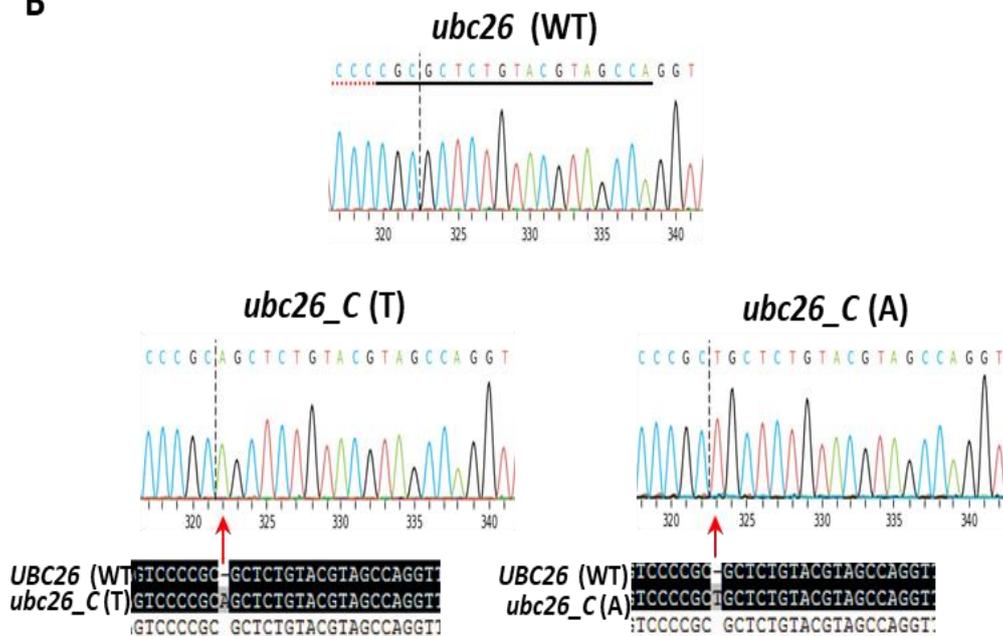
Para proporcionar un apoyo genético al posible papel que juega UBC26 en la señalización del ABA, nos propusimos la generación de líneas de Arabidopsis, mediante la metodología CRISPR/Cas9, específicamente dañadas para la función ejercida por UBC26 (Figura 67). Los alelos *ubc26-c1* y *ubc26-c2* creados, contienen la inserción de una base en la posición 1215 (contando desde el ATG) que genera una mutación de tipo frameshift (cambio en el marco de lectura) y la aparición de un codón de parada alternativo en la posición 1246. Como resultado de estas inserciones, el

dominio de conjugación de ubiquitina de la E2 UBC26 se encuentra interrumpido (Figura 67A-B)

**A**



**B**



**Figura 67. Generación alelos de pérdida de función mediados por CRISPR/CAS9 de UBC26.** A. Esquema de el gen UBC26 y la localización de la secuencia de direccionamiento de sgRNA. La flecha indica la posición de la secuencia seleccionada en UBC26. B. La cromatografía de secuenciación muestra la adición de un nucleótido único en los alelos *ubc26-c1* y *ubc26-c2*. Nucleótido La alineación de la secuencia revela una inserción de base en la posición 1215 (contando desde el ATG) de UBC26. La secuencia mostró corresponde a la cadena no codificante.

Analizamos, posteriormente, la sensibilidad a ABA de los alelos *ubc26-c1* y *ubc26-c2* en ensayos de germinación y crecimiento de raíces, y encontramos que, ambos alelos mostraban una mayor sensibilidad a la inhibición de plántulas mediada por ABA en establecimiento y crecimiento de la raíz (Figura 68)

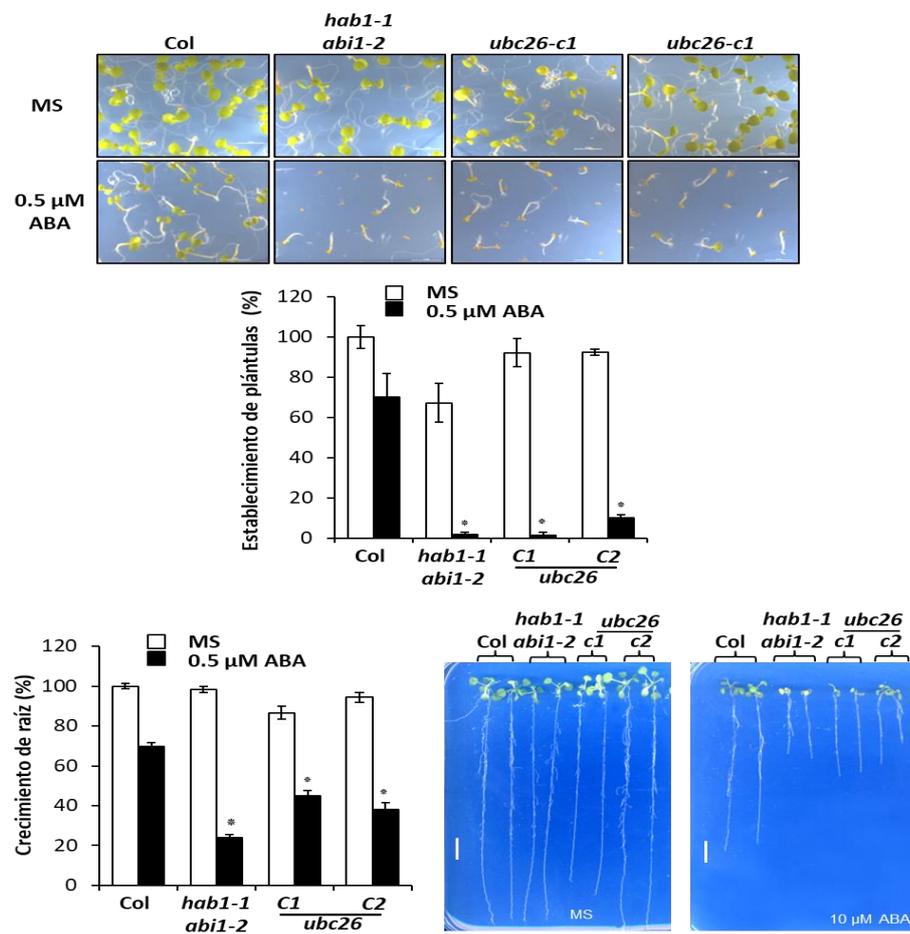
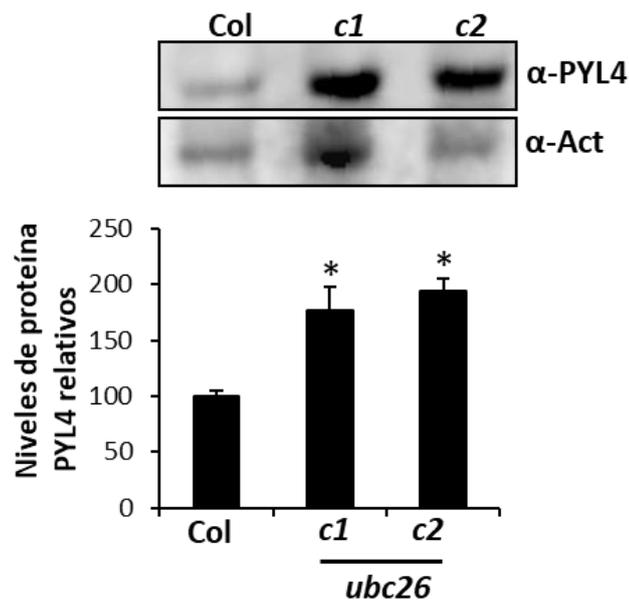


Figura 68. Fenotipo de alelos de pérdida de función generados por CRISPR/CAS9 de UBC26. Mayor sensibilidad a la inhibición mediada por ABA del establecimiento de plántulas (arriba) y crecimiento de raíz (abajo) de los alelos *ubc26-c1* y *ubc26-c2* en comparación con el tipo silvestre. Barras = 1 cm.

Por otro lado, decidimos analizar los niveles de proteína endógena PYL4, utilizando para ello, los anticuerpos específicos descritos por Yu *et al.*, 2016, con el fin de determinar en ensayos *in vivo* si estos mutantes, al tener afectada la función de UBC26, tenían también alterada la capacidad degradativa de receptores del ABA. Observamos que, en ambos alelos, estos niveles de PYL4, eran superiores a los observados en plantas de fenotipo silvestre (Figura 69). Este resultado nos sugiere que UBC26 media la degradación nuclear de PYL4, probablemente a través de su interacción con RFA4.



**Figura 69. Acumulación de la proteína PYL4 endógena en los alelos *ubc26-c1* y *ubc26-c2* en comparación con el tipo silvestre.** Las plántulas de los genotipos indicados se cultivaron durante 7 días en medio MS, y las proteínas totales se extrajeron y se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. La actina se analizó como un control de carga de proteínas, y se cuantificaron los niveles relativos de proteína PYL4. Los valores son promedios  $\pm$  SD obtenidos de tres experimentos independientes ( $n > 20$  plántulas en cada experimento). \*,  $P < 0.05$  (prueba t de Student) en comparación con Col de tipo silvestre

## El doble mutante *rfa1 rfa4* acumula más cantidad de receptores PYR1 y PYL4.

Examinamos la colección ABRC/NASC para identificar mutantes ADN-T (inserciones de T-DNA) en *rfa1* y *rfa4* (Figura 70). La inserción de ADN-T perjudica fuertemente la expresión de RFA1 y RFA4.

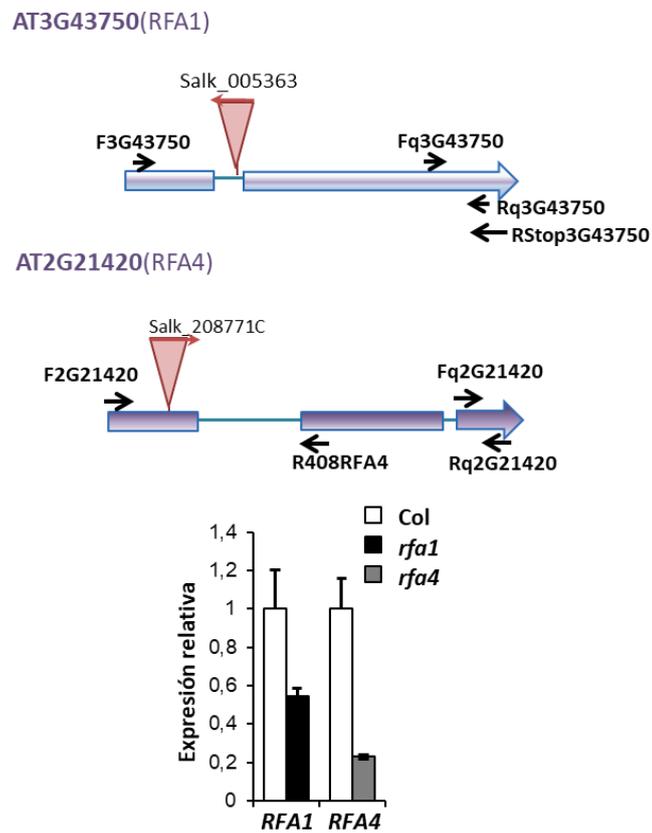
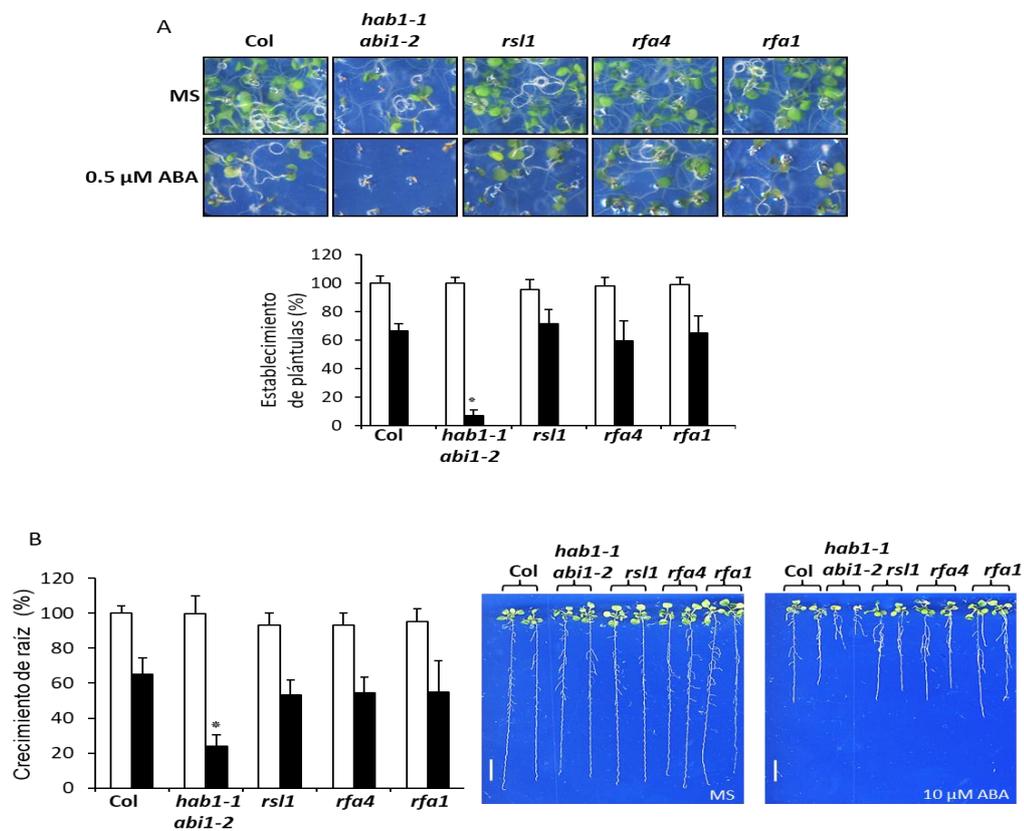


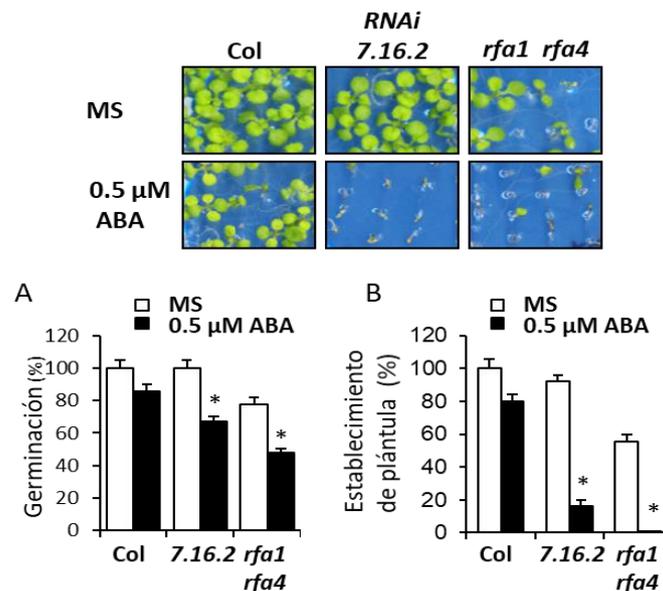
Figura 70. Diagrama esquemático de los genes *RFA1* y *RFA4*, que muestra la posición de la inserción de ADN-T en los alelos *rfa1* y *rfa4*, así como los cebadores utilizados para el genotipado de los mutantes y el análisis RT-qPCR. Expresión relativa de los genes *RFA1* y *RFA4* en el mutante ADN-T correspondiente en comparación con el de tipo silvestre.

Sin embargo, los mutantes simples *rfa1* y *rfa4* muestran la misma sensibilidad a ABA que las plantas de genotipo silvestre (Figura 71). Este hecho, probablemente refleja una cierta redundancia funcional en esta familia de proteínas que, también es observada en otras familias multigénicas.



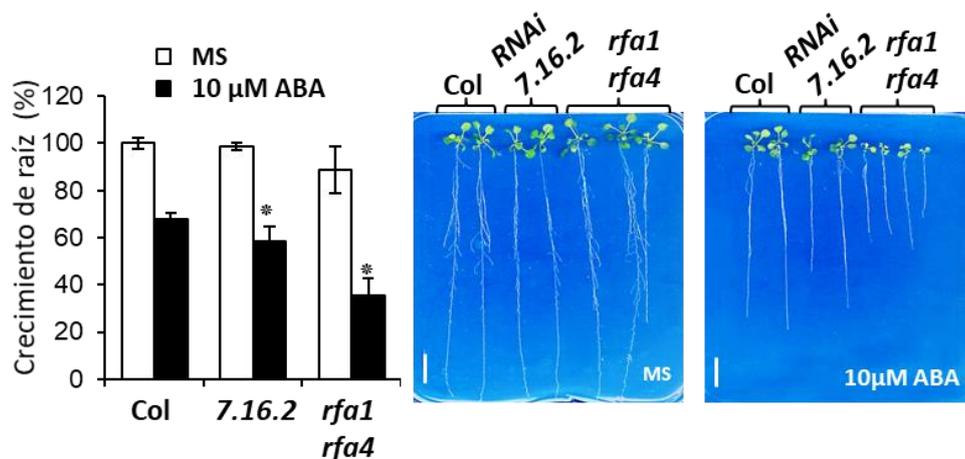
**Figura 71. A** Los mutantes individuales no muestran diferencias significativas con respecto al silvestre. La sensibilidad a la inhibición mediada por ABA del establecimiento de plántulas no se modifica significativamente en *rsl1* (Bueso *et al.*, 2014), mutantes *rfa1* y *rfa4* con respecto al silvestre. Se sembraron aproximadamente 100 semillas de cada genotipo (tres experimentos independientes) en placas de MS carente o suplementado con 0.5 μM ABA y puntuado por la presencia de ambos cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas después de 7d. (\*) indica  $p < 0.01$  (Prueba t de Student) con respecto al silvestre analizado en la misma condición. **B**. Cuantificación de la inhibición del crecimiento de raíz mediada por ABA en los genotipos indicados en comparación con el silvestre. La sensibilidad a la inhibición del crecimiento radicular mediada por ABA no se modifica significativamente en el mutantes *rsl1*, *rfa1* y *rfa4* con respecto al silvestre. El doble mutante *hab1-1* *abi1-2* es un control que muestra una mayor sensibilidad al ABA. Las fotografías muestran plántulas representativas 10 días después de la transferencia de plántulas de 4 días en placas carentes o suplementadas con 10 μM ABA. Barras = 1 cm.

Por este hecho, generamos un doble mutante para *rfa1 rfa4* y posteriormente analizamos su sensibilidad a ABA en germinación (Figura 72). Como control para este estudio, utilizamos la línea de *RNAi 7.16.2*, la cual es hipersensible a ABA y que se encuentra afectada en la expresión de al menos, tres miembros de la familia RSL1/RFA1, como son, RSL1, RFA1 y RFA3 (Bueso *et al.*, 2014). El doble mutante *rfa1 rfa4* mostró afectación en la germinación y además un aumento en la sensibilidad a la inhibición mediada por ABA en establecimiento de plántulas, en comparación con plántulas de tipo silvestre.



**Figura 72. El doble mutante *rfa1rfa4* muestra una mayor sensibilidad a ABA que el de tipo silvestre.** En la parte superior se muestra una fotografía que representa el experimento de establecimiento de plántulas a 7d después de la estratificación. **A.** Ruptura de testa (germinación), se midió a las 36h para los genotipos indicados. **B.** Mayor sensibilidad a la inhibición mediada por ABA del establecimiento de plántulas. Aproximadamente 100 semillas de cada genotipo se sembraron en placas MS que carecían o se suplementaban con 0,5 μm de ABA y se midieron después de 7d por la presencia de ambos cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas. Para A y B, los valores son promedios ± sd obtenidos de tres experimentos independientes (n> 100 semillas; \*, P <0.01 (prueba t de Student) con respecto al tipo silvestre.

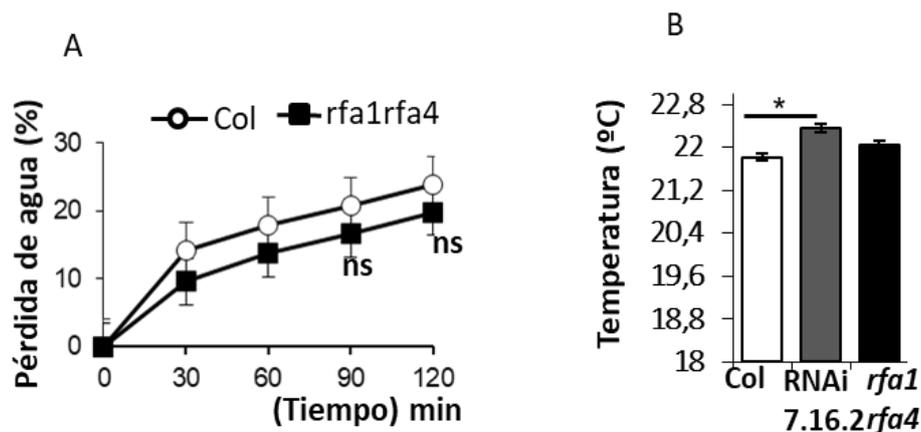
El doble mutante *rfa1 rfa4* también presentó un aumento de sensibilidad a ABA en los ensayos de crecimiento de raíz frente en comparación con las plántulas de tipo silvestre (Figura 73).



**Figura 73. Mayor sensibilidad a la inhibición del crecimiento radicular mediada por ABA en el doble mutante *rfa1rfa4* con respecto al de tipo silvestre.** los valores son promedios  $\pm$  sd obtenidos de tres experimentos independientes ( $n > 20$  plántulas; \*,  $P < 0.01$  (prueba t de Student) con respecto al tipo silvestre ensayado en las mismas condiciones. Las fotografías muestran plántulas representativas 10 días después de la transferencia de plántulas de 4 días de edad a placas MS que carecen o se complementan con  $10 \mu\text{M}$  de ABA. Barras = 1 cm.

Como añadido en estos estudios, realizamos experimentos de pérdida de agua en hojas separadas del doble mutante *rfa1rfa4*. Estas hojas no mostraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de pérdida de agua frente a las hojas de genotipo silvestre (Figura 74A), estos resultados, están en línea con los bajos niveles de expresión de *RFA1* y *RFA4* detectados en células guarda (Código de acceso GSE41054 y GSE118520, base de datos GEO). Usando termografía infrarroja sobre hojas para monitorear la transpiración, no observamos diferencias significativas en el doble mutante *rfa1 rfa4* en comparación con el tipo silvestre; sin embargo, la línea ARNi 7.16.2 si mostró un aumento significativo de la temperatura de la hoja

(Figura 74B). Esto sugiere que la ubiquitinación y la endocitosis de los receptores de ABA activados por RSL1 podrían regular la apertura estomática al igual que lo observado para los componentes de la vía ESCRT, FYVE1/FREE1 y ALIX (Belda-Palazon *et al.*, 2016; García-León *et al.*, 2019).



**Figura 74.** **A.** Pérdida de agua en hojas desprendidas de los genotipos indicados. La pérdida de peso fresco se midió en hojas separadas de plantas de 15 días de edad sometidas a la atmósfera de secado de una cabina de flujo laminar. Los valores son promedios  $\pm$  sd obtenidos de tres experimentos independientes ( $n = 5$  plantas en cada experimento), y nos indica una diferencia no significativa al comparar (usando la prueba t de Student) con los datos del de tipo silvestre y *rfa1 rfa4*. **B.** la temperatura de la hoja de los genotipos indicados se cuantificó por termografía infrarroja. Los datos son medias  $\pm$  sd ( $n = 5$ , aproximadamente 1,000 mediciones de píxeles cuadrados de varias hojas de cada planta). \*,  $P < 0.05$  (prueba t de Student) con respecto a Col de tipo silvestre

Finalmente examinamos los niveles de proteína de dos receptores, PYR1 y PYL4, que juegan un papel importante en la señalización de ABA y para los cuales teníamos anticuerpos específicos disponibles. El anticuerpo PYR1 fue ensayado con extractos de proteína preparados de un mutante de pérdida de función de PYR1, en concreto el alelo *pyr1-10* descrito en Park *et al.*, 2009, el cual muestra una mutación puntual en el residuo de Met1 a Lys que provoca la pérdida del codón de inicio de la traducción de la proteína (Figura 75A). Gracias al laboratorio del Dr. Qi Xie, desde el que nos cedieron el

anticuerpo anti PYL4, analizamos los niveles de proteína en extractos de proteína obtenidos del mutante de inserción de ADN-T (Sail\_517\_C08) *pyl4-1* y del tipo silvestre (Figura 75B).

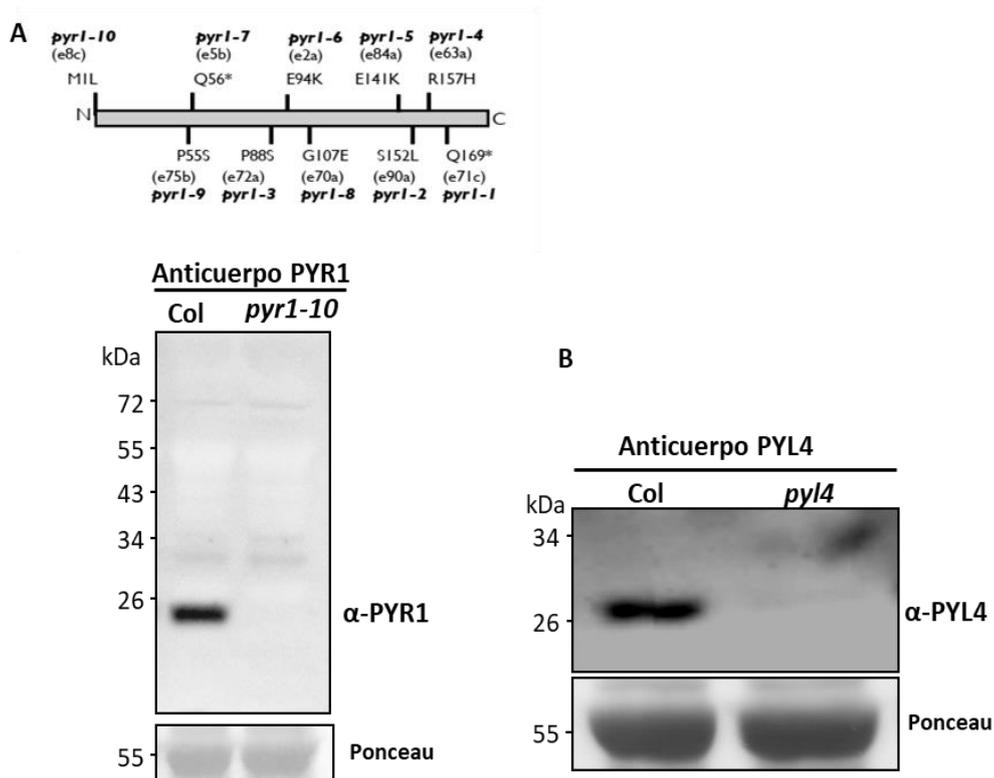


Figura 75. Especificidad de los anticuerpos  $\alpha$ -PYR1 (Agriserá) y  $\alpha$ -PYL4 (Yu *et al.*, 2016). **A.** Esquema de los alelos de PYR1 (Park *et al.*, 2009) arriba, en la parte inferior se muestra el análisis por inmunotransferencia de *pyr1-10*. **B.** Se muestra el análisis por inmunotransferencia de *pyl4-1*. Se cultivaron plántulas de los genotipos indicados durante 7 días en medio MS, se extrajeron las proteínas totales. La tinción de Ponceau fue analizada como un control de carga de proteínas

Tras las correspondientes pruebas analizamos extractos de proteína preparados a partir del doble mutante *rfa1 rfa4* y encontramos que acumula niveles más altos tanto de PYR1 como de PYL4 en comparación con plantas de tipo silvestre, al igual que ocurría con la línea de RNAi 7.16.2 (Figura 76).

Este resultado confirma que la familia de E3 ligasas RSL1/RFA regula los niveles de proteína endógena de los receptores de ABA.

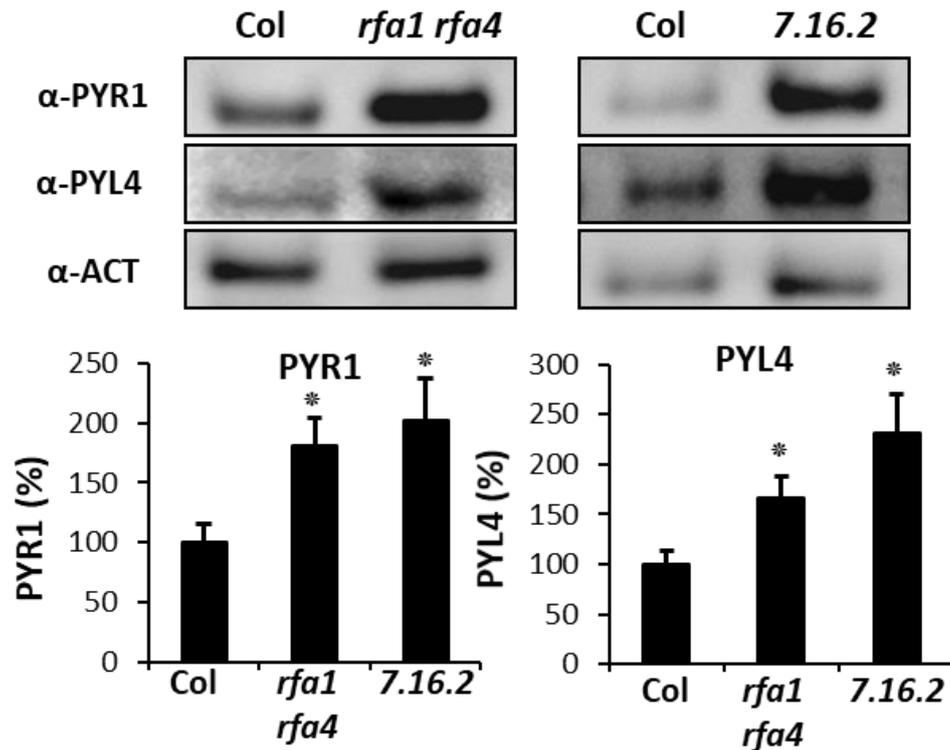
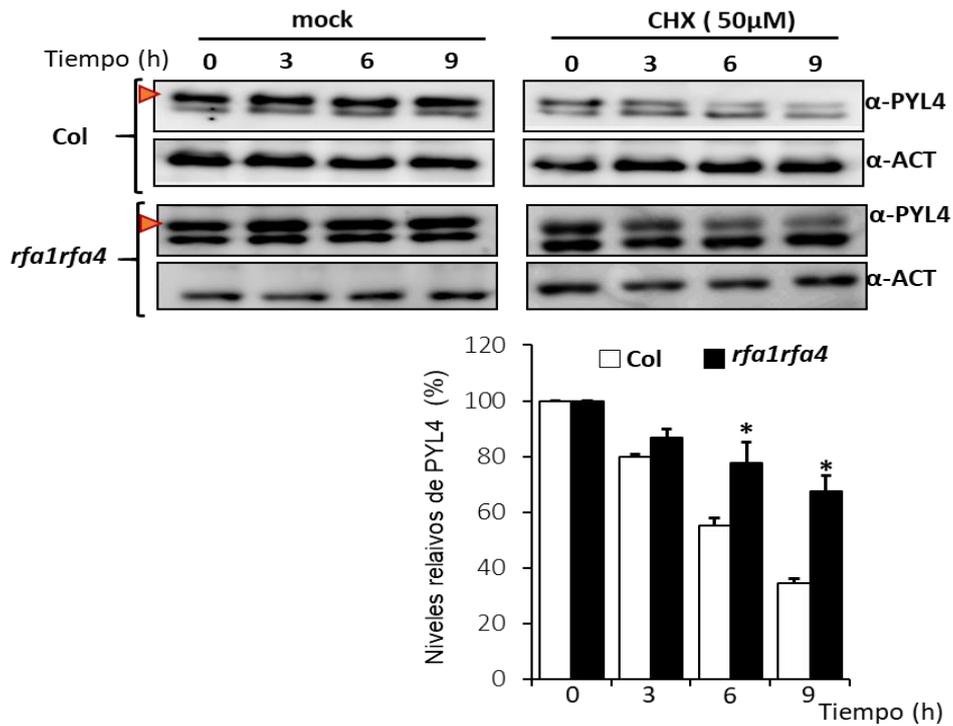


Figura 76. Acumulación de proteínas endógenas PYR1 y PYL4 en la línea *rfa1 rfa4* y RNAi 7.16.2 en comparación con el tipo silvestre. Las plántulas de los genotipos indicados se cultivaron durante 7 días en medio MS, y las proteínas totales se extrajeron y se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. La actina se analizó como un control de carga de proteínas, y los niveles de proteína PYR1 o PYL4 se cuantificaron en relación con Col (tomado como 100%). Los valores son promedios  $\pm$  SD obtenidos de tres experimentos independientes (n = 10 plántulas por genotipo en cada experimento). \*, P < 0.05 (prueba t de Student) con respecto al de tipo silvestre.

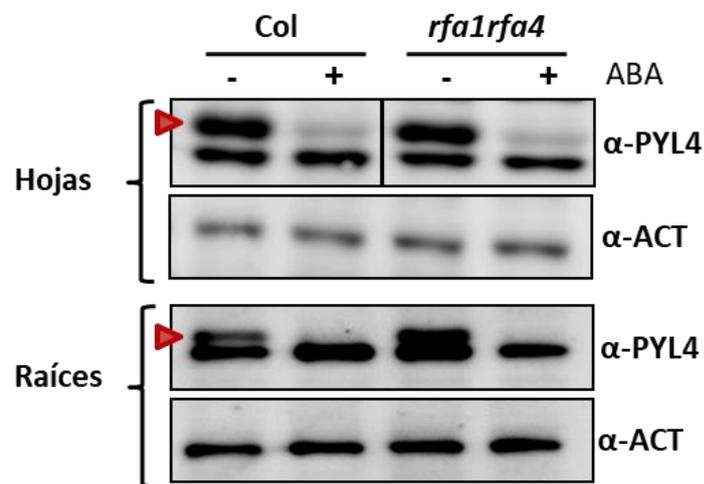
Adicionalmente, realizamos un estudio sobre la cinética de degradación de la proteína PYL4 en presencia de cicloheximida (CHX) y pudimos observar como la degradación de PYL4 se vio ralentizada en las plantas que son dobles mutantes *rfa1 rfa4* en comparación con las de tipo silvestre (Figura 77).



**Figura 77. La degradación de PYL4 se retrasa en el mutante *rfa1 rfa4* en comparación con el Col de tipo silvestre.** Se cultivaron plántulas de Col o *rfa1 rfa4* en medio líquido MS durante 10 días y luego se trataron con CHX de 50  $\mu$ m durante los períodos de tiempo indicados. La actina se analizó como un control de carga. Los histogramas muestran la cuantificación de los niveles de proteína PYL4 en muestras tratadas con CHX en relación con el tiempo 0, cuyo valor se tomó como 100% para las muestras Col o *rfa1 rfa4*. Las puntas de flecha (en rojo) indican la banda correspondiente a PYL4. Los valores son promedios  $\pm$  SD obtenidos de tres experimentos independientes (n = 10 plántulas por genotipo en cada experimento). \*, P <0.05 (prueba t de Student) con respecto a Col en el mismo punto de tiempo.

Tras estos estudios, decidimos realizar un análisis que mostrara el efecto del tratamiento con ABA tanto en hojas como en raíces sobre el receptor endógeno PYL4 (Figura 78) y encontramos que el ABA promueve la degradación de PYL4 tanto en los tejidos del tipo silvestre como en el doble mutante *rfa1 rfa4*. Este resultado nos sugiere que la regulación negativa

inducida por ABA sobre *PYL4* puede ocurrir en ausencia de *RFA1* y de *RFA4*, y se deba probablemente a través de una regulación negativa transcripcional sobre la expresión de *PYL4* en respuesta a ABA (Goda *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2009) y a través también de la degradación de proteínas a través de la vía ESCRT/vacuolar (Belda-Palazon *et al.*, 2016; García-León *et al.*, 2019).



**Figura 78.** El tratamiento con ABA conduce a una disminución de la proteína *PYL4*. Las plántulas de *Col* o *rfa1 rfa4* se cultivaron en medio MS líquido durante 10 días y luego se simularon o se trataron con 50 μM (ojo, lo otro es una medida de longitud, repasa en todo el texto) ABA durante 6 h. Se separaron los tejidos de las hojas y las raíces, y los extractos de proteínas se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpos anti-*PYL4* y anti-*ACT*. Las puntas de flecha (en rojo) indican la banda correspondiente a *PYL4*. Un nuevo lote del anticuerpo anti-*PYL4* reconoció una segunda banda debajo de *PYL4*.



# RESULTADOS II

---

La E3 ligasa RSL1 está localizada en la membrana plasmática (presenta un dominio transmembrana C- terminal) y cataliza la ubiquitinación que posteriormente promueve la degradación vía endosomal de los receptores de ABA, demostrado al menos para PYR1 y PYL4 (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Bueso *et al.*, 2014b). Para ampliar el conocimiento sobre la regulación de RSL1 decidimos investigar su posible S-acilación, ya que esta modificación podría regular la actividad, el tráfico intracelular de la proteína o la conformación de RSL1. La S-acilación de proteínas, también conocida como palmitoilación, es una modificación post-trasduccional rápida y reversible (Resh, 2006) en la que los ácidos grasos de cadena larga, tales como palmitato o estearato, se unen covalentemente a determinados residuos de cisteína, a través de un enlace tioéster aumentando la hidrofobicidad de las proteínas que les permiten su anclaje a membrana (Batistič *et al.*, 2008). Actualmente se sabe que esta modificación puede ser responsable de la localización subcelular y que interviene regulando funciones en las proteínas sobre las que actúa (Blaskovic *et al.*, 2014; Running, 2014). Las proteínas que presentan dominios transmembrana también pueden presentar S-acilación de Cys adyacentes a los dominios transmembrana que puede influir en el recambio, el tráfico y la partición en microdominios de estas proteínas. Actualmente no existe una secuencia consenso firmemente establecida para identificar residuos susceptibles de S-acilación, y los resultados del software de predicción, como CSS-Palm <http://csspalm.biocuckoo.org/online.php>. (Ren *et al.*, 2010) todavía están lejos de ser aceptablemente fiables. Por lo que se deben de realizar varios controles adicionales para asegurar la correcta elección de los residuos S-acilados. No obstante, el resultado

mostrado en la Tabla 5 predijo la existencia de residuos de cisteína con alta probabilidad de ser S-acilados en RSL1.

**Tabla 5. Identificación de residuos cisteína susceptibles de sufrir procesos de S-acilación.** En rojo se identifican los residuos de cisteína presentes en la sección delecionada  $\Delta$ TM. Datos obtenidos mediante el software CSS Pal 4.0.

Posición	Péptido	Score	Cutoff
85	GINHISICCDHEYIF	4.189	2.412
86	INHISICCDHEYIFE	4.793	3.717
162	QKETCNICLNDDINA	11.603	10.722
182	VDKSGHMCCSECVKR	9.633	2.412
183	DKSGHMCCSECVKRH	6.231	3.717
270	LNIGVRRCCVKCGEP	10.471	2.412
274	VRRCCVKCGEPFCVK	4.444	2.412
370	DDLDTQCCGSCCCF	8.159	2.412
371	DLDTQCCGSCCCFV	4.759	2.412
374	LTQCCGSCCCFVFFL	6.29	2.412
375	TQCCGSCCCFVFFLV	9.182	2.412
376	QCCGSCCCFVFFLVI	2.672	2.412

En base a esta predicción y debido a las limitaciones que presenta el programa predictivo, inicialmente decidimos generar la proteína RSL1 $\Delta$ TM (la cual, presenta la deleción del dominio transmembrana situado en el extremo C-terminal de RSL1, concretamente muestra una deleción de los

residuos comprendidos entre la posición 354 hasta la posición 398). La modificación por S-acilación de las proteínas transmembrana se produce frecuentemente en una región citoplasmática o incluso al comienzo de un dominio transmembrana (Yik & Weigel, 2002). Teniendo en cuenta esta consideración, los residuos elegidos para ser mutados fueron Cys<sup>370</sup>, Cys<sup>371</sup>, Cys<sup>374</sup>, Cys<sup>375</sup> y Cys<sup>376</sup>. Como se puede ver en la Figura 79 los residuos de Cys<sup>374</sup>, Cys<sup>375</sup> y Cys<sup>376</sup> se encuentran al comienzo del dominio TM descritos por Bueso *et al.* (2014), mientras que los residuos Cys<sup>370</sup> y Cys<sup>371</sup> se encuentran próximos a membrana, por ello creamos el mutante RSL1<sup>C55</sup> (que incluye las mutaciones en los 5 residuos de Cys a Ser).

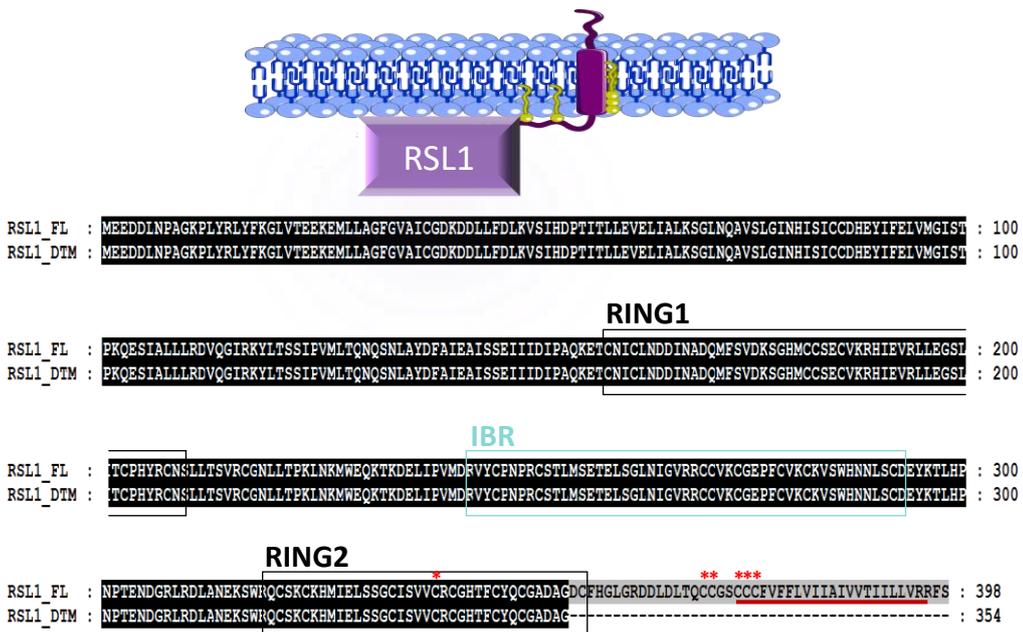


Figura 79. Identificación de las Cys370, Cys371, Cys374, Cys375 y Cys376 correspondientes al dominio de RSL1 susceptibles de S-acilación. Las supuestas Cys susceptibles de S-acilación se denotan con un asterisco rojo, la línea en rojo de la parte inferior hace referencia al dominio TM de la proteína. El alineamiento de secuencias entre RSL1 y RSL1ΔTM muestra el residuo a partir del cual se ha realizado la delección del dominio transmembrana. En la parte superior se representa una caricatura donde se muestran en verde los posibles sitios de S-acilación.

Asesorados por el Dr. Piers A Hemsley decidimos generar un mutante adicional en el sitio catalítico Cys334 de RSL1, análogo del sitio Cys361 de RFA4 previamente descrito en este trabajo (Figura 47) y equivalente a residuos de Cys catalítica activa, característica distintiva de las E3 ligasas RBR, identificados en Parkin (Cys431) (Duda *et al.*, 2013; Wenzel & Klevit, 2012). Debemos tener en cuenta que los residuos de Cys-Ub forman un enlace tioéster que podría conducir a un falso positivo, ya que los ensayos de S- acilación son indirectos (Hemsley *et al.*, 2013; Roth *et al.*, 2006). Para identificar el residuo Cys334 de RSL1 realizamos un alineamiento del dominio RING2 de Parkin, RFA4 y RSL1. (Figura 80)

```

403 Parkin : WEAASKETIKKTTKFCPRCHVPEKNGGOMHKCPQPCCRLKNCWNCGEWN-RVCMGDHWEDV :
337 RFA4  : -KSLANK---KKWRQCVQCSNLVELFEGCNHITC---RCGFEEFCYVCGKEWNQRCGLSP----- :
309 RSL1  : LRDLANE---KSWRQCSKCKHMIELSSGCTSVVC---RCGHTFCYCCGADAG--DCFHGLGRDD :

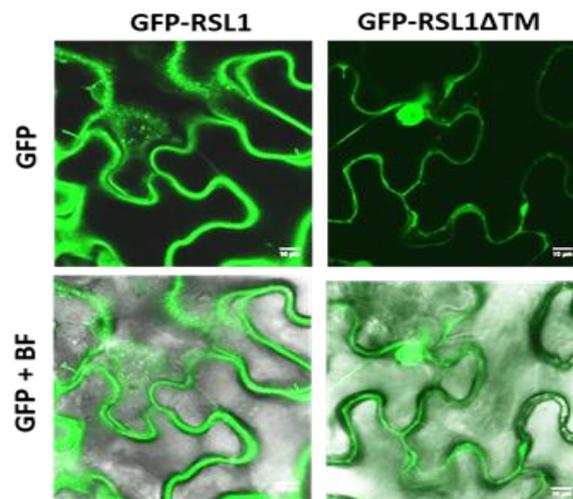
```

**Figura 80. Identificación de Cys334 como supuesto sitio activo de RSL1. Alineación de secuencias múltiples de Parkin RING2, RFA4 RING2 y RSL1 RING2.**El supuesto sitio activo de la proteína se denota con un asterisco rojo y corresponde a Cys 431, Cys 361 y Cys 334, respectivamente. De acuerdo con la estructura cristalina de Parkin (Duda *et al.*, 2013), los residuos de ligando de Zinc

Posteriormente se generó un nuevo mutante con seis residuos de Cys mutadas denominado RSL1<sup>C65</sup>, cuyos resultados no han podido ser mostrados, debido a las limitaciones de tiempo de la estancia financiada por la FPU en el laboratorio del Dr. Piers Hemsley, pero previsiblemente debería de eliminar todo rastro de S-acilación, se abordará seguramente este hecho en un futuro.

## El dominio transmembrana de RSL1 es necesario y suficiente para determinar la localización en membrana plasmática.

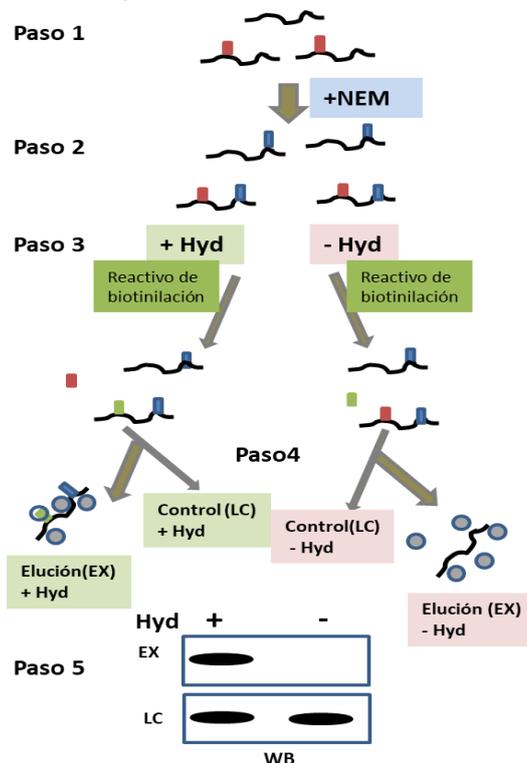
Para comprobar si el dominio TM de la proteína RSL1 era requisito imprescindible para proporcionar una diana para la modificación de lípidos por S-acilación y conferir la asociación de las proteínas de fusión a la membrana plasmática (Batistič *et al.*, 2008, 2012) generamos inicialmente la construcción 35:GFP-RSL1 $\Delta$ TM. Con ella pudimos comparar la localización subcelular de la proteína RSL1 $\Delta$ TM con respecto a la proteína nativa RSL1. Los estudios de localización subcelular mediante microscopía confocal muestran un cambio de localización para RSL1 $\Delta$ TM principalmente hacia núcleo (Figura 81).



**Figura 81. Localización subcelular.** Las construcciones 35S:GFP-RSL1 y 35S:GFP-RSL1 $\Delta$ TM fueron expresadas en células epidérmicas transformadas de *N. benthamiana*.

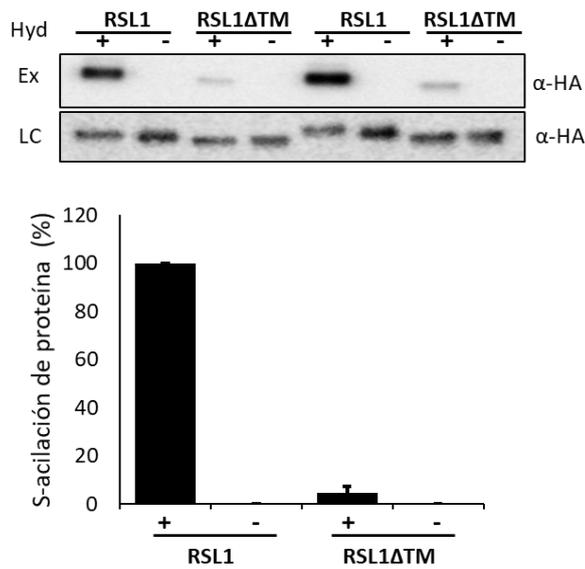
La E3 ligasa RSL1 se localiza en membrana plasmática debido a la existencia del dominio TM en el C-terminal de la proteína (Bueso *et al.*, 2014b), para determinar su localización se utilizó como marcador a la proteína fluorescente naranja OFP-TM23 (una versión modificada OFP que contiene un dominio TM, (Batistič *et al.*, 2012). En RSL1 $\Delta$ TM se observa un cambio de localización principalmente hacia núcleo, que podría indicar que la ausencia del dominio TM provoca su deslocalización a núcleo y probablemente a citosol (debido a que se observa una señal residual en este compartimento celular, este hecho debería de confirmarse mediante estudios de colocalización con el marcador de membrana OFP-TM23), como ocurre con otros miembros de la familia RFAs, los cuales carecen del dominio TM, por ejemplo RFA1 se localiza en núcleo y citosol ó RFA4 cuya localización es nuclear. Para el estudio de la posible S-acilación de RSL1 se generó la construcción 35S:HA-RSL1 $\Delta$ TM, que se introdujo mediante agroinfiltración en células foliares de *Nicotiana benthamiana*, y se comparó su patrón de acilación con HA-RSL1. El estado de S-acilación de ambas proteínas se determinó mediante el protocolo mejorado en el laboratorio del Dr. Piers Hemsley (Hurst *et al.*, 2019) cuyo enfoque novedoso utiliza la química de cicloadición Diels-Alder 4+2 (conseguida mediante un paso donde se mezcla el 2-3 dimetil 1,3 butanodieno (DMB) a las muestras), posteriormente se produce una separación para eliminar N-etilmaleimida (NEM) de la solución acuosa, en lugar de la precipitación de proteínas utilizada anteriormente que causaba la pérdida de gran cantidad de proteína debido a los numerosos pasos de precipitación con PEG (polietilenglicol). Los ensayos de intercambio

de acilo se basan en la adición de NEM para bloquear los sulfhidrilos de cisteína libres y prevenir la detección inespecífica en estos ensayos. A esto le sigue la escisión química de los grupos S-acilo para revelar sulfhidrilos desde cisteína libres. El uso de hidroxilamina neutra (Hyd) a pH 7,2 escinde el tioéster del acilo dejando un grupo sulfhidrilo libre, el cual puede ser marcado con biotina (típicamente derivados de estreptavidina, intercambio acil-biotina; ABE) que directamente es inmovilizado en resina reactiva (captura asistida con resina de acilo (acyl-RAC)) (Forrester *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2016). Finalmente, las muestras son analizadas mediante transferencia en Western blot. En la Figura 82 se muestran los pasos de forma esquemática descritos anteriormente.



**Figura 82.** Descripción general simplificada del ensayo de cambio de biotina para detectar proteínas S-aciladas. Todas las proteínas de un lisado se someten a este tratamiento. (1) Los lisados celulares que contienen proteínas (líneas negras) con residuos de cisteína pueden tener grupos acilo (líneas rojas) unidos a través de un enlace tioéster (S-acilación). (2) Los lisados se tratan con el reactivo con sulfhidrilo N-etilmaleimida (NEM, línea azul) para bloquear las cisteínas libres. (3) La muestra se divide luego en 2 porciones iguales y una se trata con el reactivo de escisión del grupo S-acilo hidroxilamina (+Hyd) y otra sin(-Hyd). Luego, ambas muestras se tratan con biotina reactiva con sulfhidrilo (línea verde). Los sulfhidrilos libres liberados por el tratamiento con hidroxilamina (+Hyd) se marcan con biotina reactiva con sulfhidrilo para formar un residuo de cisteína biotinilada. Las muestras incubadas en ausencia de hidroxilamina (-Hyd) no se someten a biotinilación ya que no se generan sulfhidrilos libres. (4) Después de la biotinilación, se extrae una muestra de cada reacción para que actúe como control de carga de la columna (LC). La muestra restante se carga en perlas de neutravidina y las proteínas biotiniladas, que representan las proteínas S-aciladas en el lisado del paso 1, se purifican (EX). (5) Después de la elución de las perlas de neutravidina, las muestras de proteína se separan por SDS- PAGE. Adaptado de Hemsley *et al.*, 2008.

Los resultados de S-acilación obtenidos en RSL1 $\Delta$ TM, muestran que la delección de los residuos 354 hasta 398 de RSL1 comprenden los residuos de cisteína más importantes susceptibles de ser S-acilados (Figura 83).

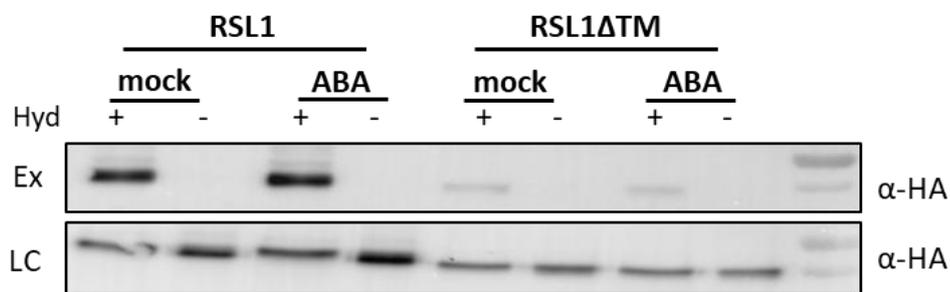


**Figura 83. Estado de S-acilación de HA-RSL1 y HA-RSL1 $\Delta$ TM.** Las construcciones fueron infiltradas en *N. benthamiana* y el estado de S-acilación fue determinado por Western blot. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo Acil-RAC. Parte de las muestras fueron tratadas con hidroxilamina (Hyd+) y otra parte de las muestras con H<sub>2</sub>O (Hyd-). Ex: corresponde al eluido de las bolitas y LC: corresponde al eluido antes de las bolitas. En la parte inferior los valores obtenidos son promedios  $\pm$ sd de 3 experimentos independientes.; \*, P<0.01 (prueba t de Student).

## El mecanismo de S-acilación de RSL1 no se ve afectado por ABA.

Publicaciones previas en el laboratorio muestran que las proteínas RGLG1 y RGLG2, ambas asociadas a membrana, poseen modificaciones post-transduccionales de miristoilación, cuya inhibición a través del ABA provoca cambios en la localización y actividad de estas proteínas (Belda-Palazon *et al.*, 2019). Por ello, quisimos comprobar si el ABA podría jugar un papel en los niveles de S-acilación de RSL1. Con este objetivo, realizamos ensayos de

S-acilación comparando las proteínas HA-RSL1 y HA-RSL1 $\Delta$ TM en células foliares de *Nicotiana benthamiana*, las cuales fueron tratadas con 50 $\mu$ M ABA durante 12 horas. Los resultados del análisis de S-acilación muestran que el ABA no afecta los estados de S-acilación, al no observarse diferencias entre el control no tratado (“mock”) y el tratado con ABA (Figura 84).



**Figura 84. Estado de S-acilación de HA-RSL1 y HA-RSL1 $\Delta$ TM con y sin adición de ABA.** Las construcciones fueron infiltradas en *N. benthamiana*, posteriormente las muestras fueron tratadas durante 12 horas con 50 $\mu$ M de ABA y extraídas para medir su estado de S-acilación mediante revelados de Western blot. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo Acil-RAC. Parte de las muestras fueron tratadas con hidroxilamina (Hyd+) y otra parte de las muestras con H<sub>2</sub>O (Hyd-). Ex: corresponde al eluido de las bolitas; LC: corresponde al eluido antes de las bolitas.

## Análisis de residuos de Cys en el extremo C-terminal en ensayos de S-acilación

Para poder realizar el ensayo de S-acilación de RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup>, debimos generar las construcciones 35S:HA-RSL1<sup>C334S</sup> y 35S:HA-RSL1<sup>C5S</sup>. Las construcciones fueron agroinfiltradas en células foliares de *N. benthamiana*. Obteniéndose el resultado que se muestra en la Figura 85.

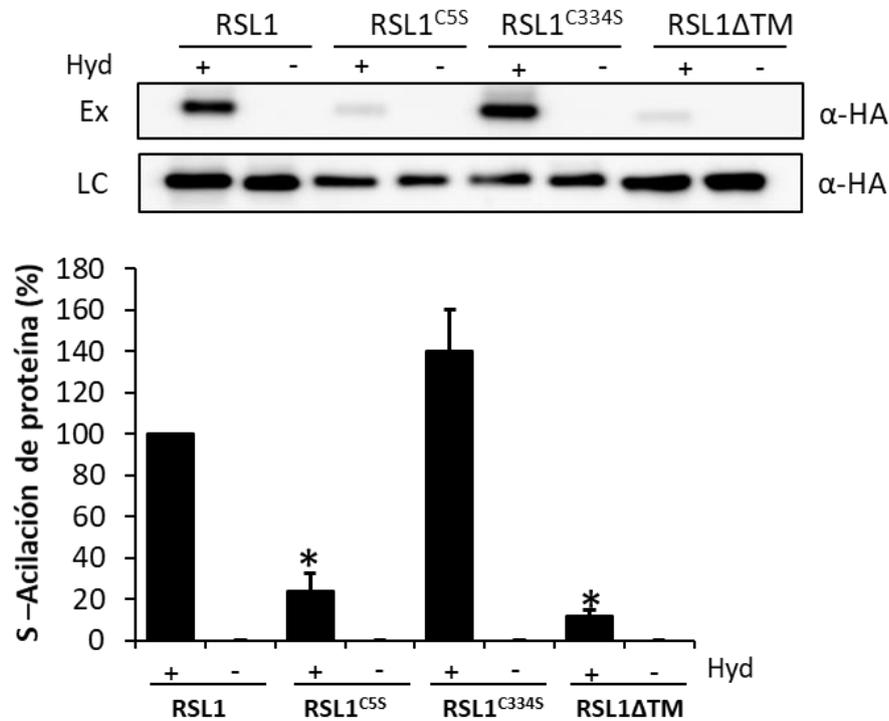


Figura 85. Estado de S-acilación de HA-RSL1, HA-RSL1 $\Delta$ TM, RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup>. Las construcciones fueron infiltradas en *N. benthamiana* y el estado de S-acilación fue determinado por Western blot. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo Acil-RAC. Parte de las muestras fueron tratadas con hidroxilamina (Hyd+) y otra parte de las muestras con H<sub>2</sub>O (Hyd-). Ex: corresponde al eluido de las bolitas y LC: corresponde al eluido antes de las bolitas. En la parte inferior los valores obtenidos son promedios  $\pm$ sd de 3 experimentos independientes; \*, P<0.01 (prueba t de Student).

Estos resultados muestran que la proteína nativa RSL1 se encuentra acilada, mientras que la proteína mutada RSL1<sup>C5S</sup> presenta una reducción de aproximadamente el 80% de la S-acilación, en estas proteínas se observa también S-acilación residual que podría deberse a los posibles enlaces tioéster de Cys-Ub presentes aún en la Cys334 de la proteína mutada RSL1<sup>C5S</sup>. Por otra parte, el mutante RSL1<sup>C334S</sup> presenta un aumento de la S-acilación que podría explicarse debido al aumento en la estabilidad de esta proteína ocasionada por la eliminación de la cisteína activa. Este hecho se

ha documentado en el análisis que hemos realizado en la Cys del centro activo Cys361 de RFA4, donde se observa un aumento de expresión de RFA4 $\Delta$ C<sup>C361A</sup> frente a RFA4 $\Delta$ C debida a la reducción de ubiquitinación en RFA4 $\Delta$ C<sup>C361A</sup>. Otro motivo que podría causar un aumento mayor de la S-acilación de la proteína RSL1<sup>C334S</sup> se debe a que cuando se elimina el residuo de Cys del sitio activo, los residuos de Cys y Lys adyacentes a dicho centro activo se vuelven más susceptibles de unión a Ub y por tanto existirá una mayor cantidad de enlaces tioéster susceptibles de S-acilación que podrían dar falsos positivos. Por otra parte, y según lo observado en ensayos previos, RSL1 $\Delta$ TM, presenta también una marcada reducción de la S-acilación, lo que avala el hecho de que las cisteínas seleccionadas sean las más importantes en la S-acilación de RSL1 en su dominio transmembrana.

## Localización subcelular de los mutantes RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup>.

Para comprobar la localización subcelular de los mutantes RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup> generamos las siguientes construcciones 35S: GFP-RSL1<sup>C334S</sup> y 35S: GFP-RSL1<sup>C5S</sup>. Para su estudio subcellular, las construcciones fueron agroinfiltradas en células foliares de *Nicotiana benthamiana* y sometidas a tratamientos de 50 $\mu$ M de MG132. Los resultados se muestran en la Figura 86.

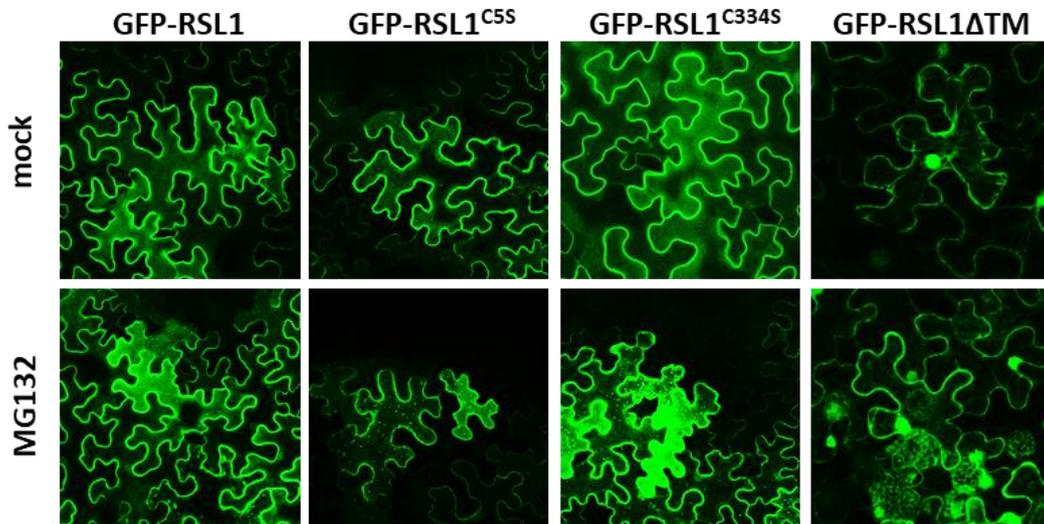
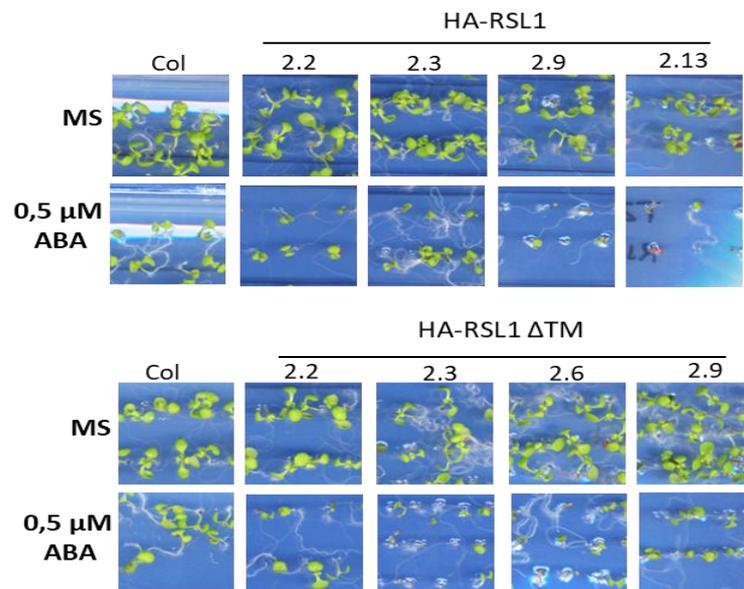


Figura 86. Muestra la localización subcelular en células epidérmicas transformadas de *N. benthamiana* que expresan en transitoria las construcciones para GFP-RSL1, GFP-RSL1<sup>C334S</sup>, GFP-RSL1<sup>C5S</sup> y GFP-RSL1ΔTM. Las distintas muestras fueron sometidas a tratamientos con 50  $\mu$ M de MG132 simultáneamente durante 12 horas.

Estos resultados preliminares muestran que la proteína con la delección de dominio transmembrana RSL1ΔTM presenta una localización subcelular en núcleo y probablemente también en citoplasma, mientras que la proteína nativa RSL1 se presentaba en membrana plasmática, además la localización de RSL1ΔTM no depende del tratamiento con MG132, en cambio las mutaciones en RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup> con y sin tratamiento de 50  $\mu$ M de MG132 presentan una localización más propia de membrana plasmática debido a que siguen manteniendo el dominio TM y mantienen dicha localización tras el tratamiento con MG132 durante 12 horas.

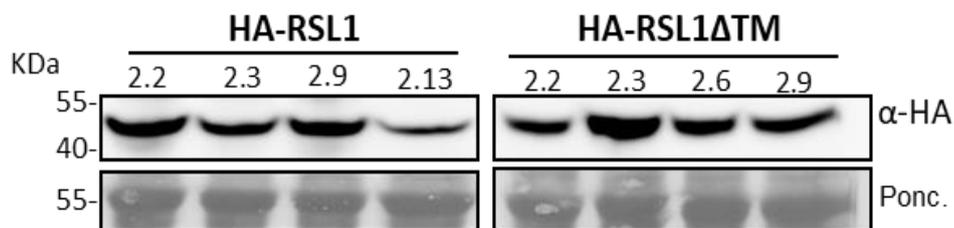
## Obtención de líneas sobreexpresoras de HA-RSL1 y HA-RSL1 $\Delta$ TM.

Aunque por limitaciones de tiempo no hemos podido realizar ensayos fisiológicos sobre el efecto de la S-acilación en la actividad de RSL1, hemos generado materiales que podrán ser utilizados en futuros estudios. Por ejemplo, generamos líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones 35S:HA-RSL1 y 35S:HA-RSL1 $\Delta$ TM en fondo Col-0. Las líneas T2 para RSL1 y para RSL1 $\Delta$ TM seleccionadas se muestran en la Figura 87. Las T2 se sometieron a un tratamiento con 0.5  $\mu$ M ABA y los resultados en principio muestran un aumento de la sensibilidad a ABA de las T2 sobreexpresoras seleccionadas.



**Figura 87.** Fotografía de Líneas T2 de T-ADN en fondo Col-0 de plántulas de 7 días en medios de MS suplementados o no con 0,5 $\mu$ M de ABA.

Para determinar el grado de expresión de la proteína en las T2, se realizó un inmunoensayo (WB) de cada una de las líneas. Para poder visualizar la proteína se deben de tratar con 50  $\mu$ M de MG132 durante al menos 12 horas. Los resultados muestran que las líneas T2.2 y T2.9 de HA-RSL1 presentan mayor cantidad de proteína, así como las líneas T2.3 y T2.9 de HA-RSL1 $\Delta$ TM (Figura 88).



**Figura 88.** Análisis de extractos de proteínas RSL1 y RSL1 $\Delta$ TM mediante inmunoblot anti HA. Las plántulas de líneas T2 fueron crecidas durante 5 días en placa y trasvasadas a matraces durante 10 días, posteriormente se incubaron durante 12 horas con MG132 y fueron extraídas con laemli 5X.



# RESULTADOS III

---

## Generación de dobles y triples mutantes de la familia RSL1/RFAs.

Hemos generado también nuevos materiales que podrán ser utilizados en trabajos posteriores para analizar posibles conexiones entre la ubiquitinación de receptores en membrana plasmática mediada por RSL1 y otras proteínas RFA de la familia que ubiquitinan a los receptores en otras localizaciones subcelulares. Para ello identificamos líneas de inserción de T-ADN en RSL1 (At2g26139) Sail\_0433\_C02, RFA1 (At3g43750) Salk\_006363 y RFA5 (At5g37560) Salk\_203383C líneas homocigotas que se obtuvieron de la colección de T-ADN del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk (Figura 89).

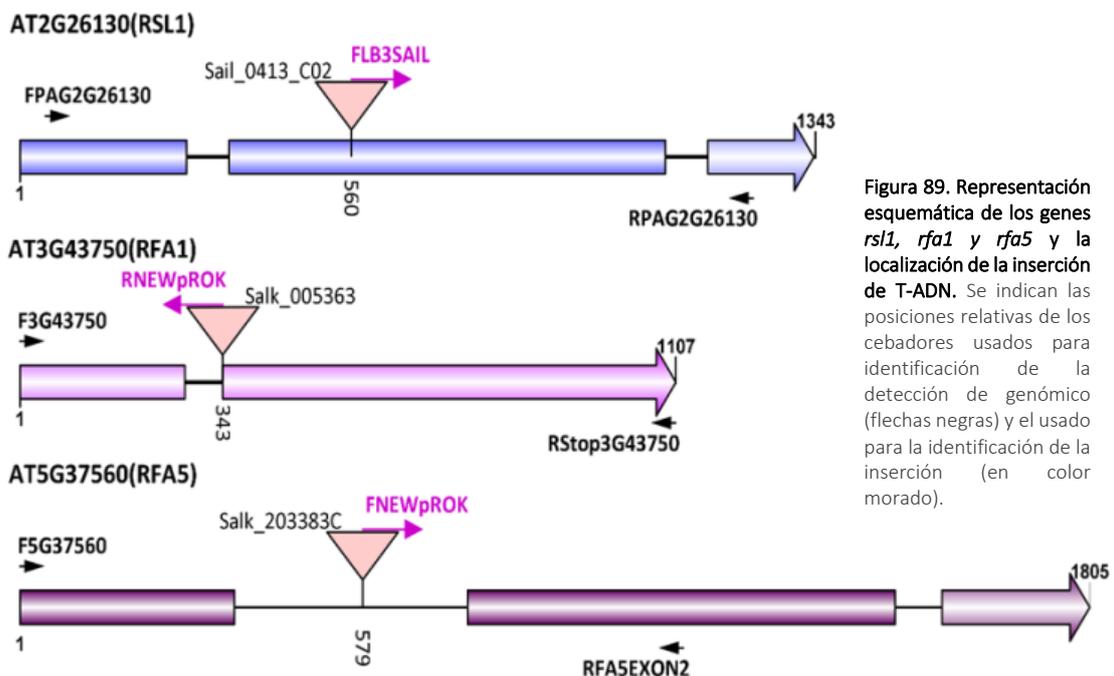


Figura 89. Representación esquemática de los genes *rsl1*, *rfa1* y *rfa5* y la localización de la inserción de T-ADN. Se indican las posiciones relativas de los cebadores usados para identificación de la detección de genómico (flechas negras) y el usado para la identificación de la inserción (en color morado).

El análisis de secuencia de los productos de PCR amplificados con combinaciones de cebadores específicos para ambas regiones flanqueantes del T-ADN localizaron las inserciones de T-ADN en las posiciones 560 de *rsl1*, 343 de *rfa1* y 579 de *rfa5* aguas abajo del codón de inicio ATG. Para cada construcción se generaron 2 líneas F2 homocigotas, en algunas construcciones para llegar al homocigoto fue necesario llevarlas hasta la generación F3. En la Figura 90 se muestra un resumen del genotipado de líneas de dobles mutantes *rsl1xrfa1*, *rsl1xrfa5-1* y *rfa1xrfa5-1*.

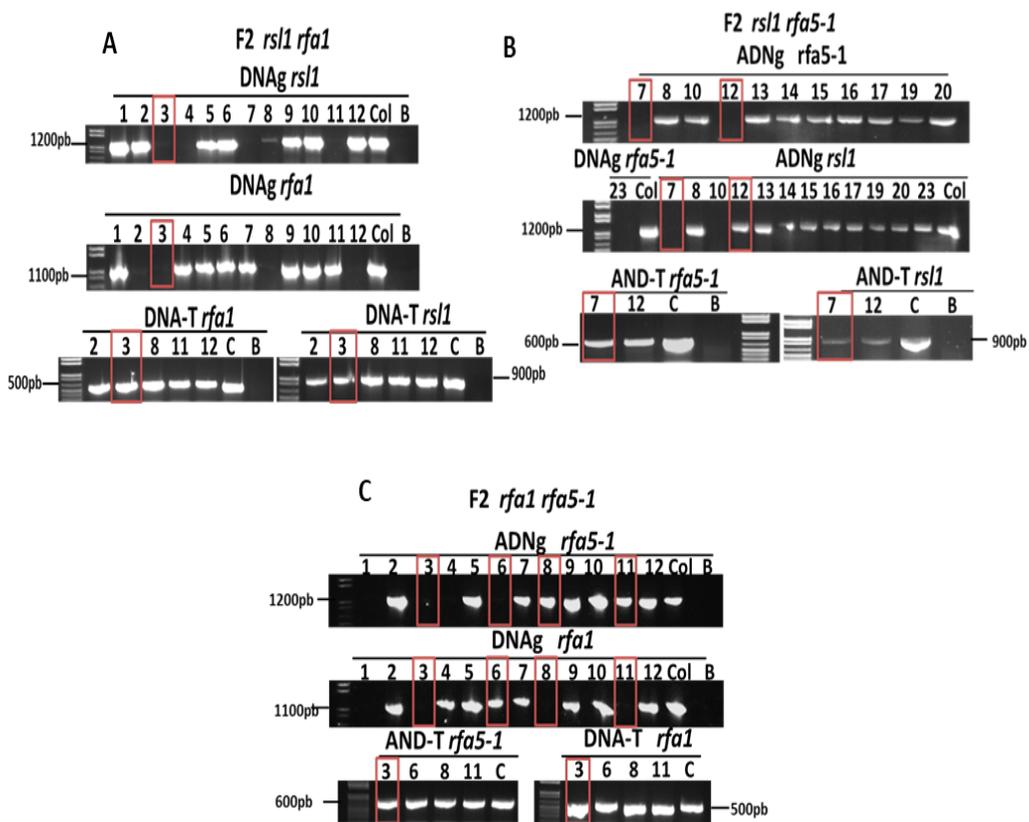
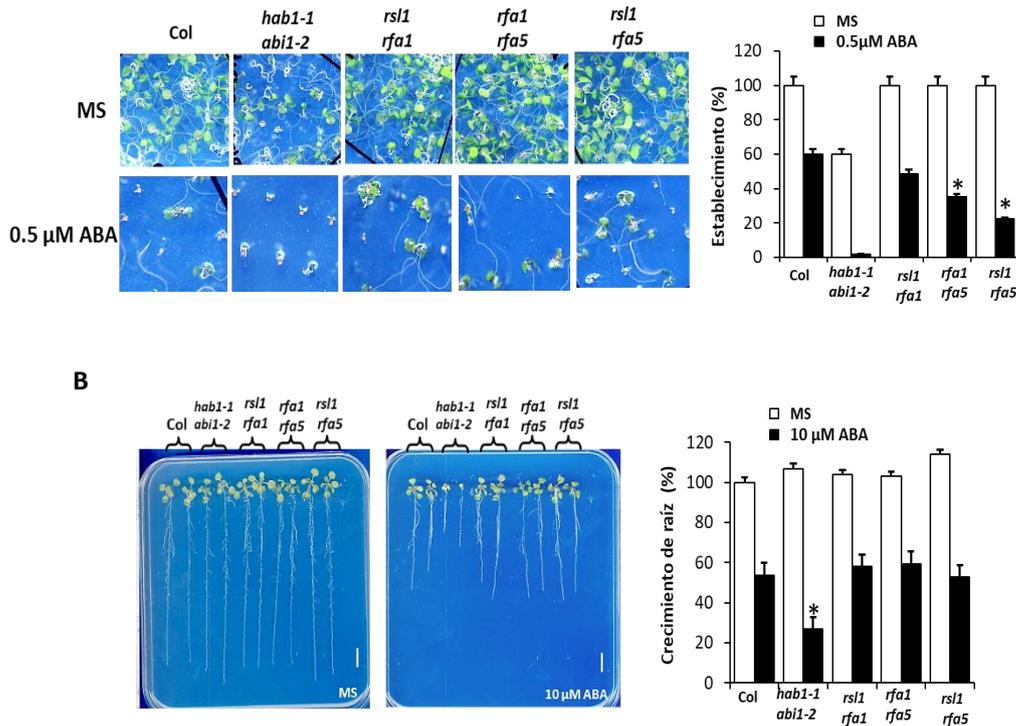


Figura 90. Genotipado de mutantes dobles. A. Genotipado de la F2 del cruce de genes de pérdida de función *rsl1xrfa1*. B. Genotipado de la F2 del cruce de los genes de pérdida de función *rfa5-1xrsl1*. C. Genotipado de la F2 del cruce de los genes de pérdida de función *rfa5-1xrfa1*.

Se realizó el estudio fenotípico de las líneas homocigotas de mutantes de pérdida de función dobles *rs1/rfa1*, *rfa1/rfa5* y *rs1/rfa5* mediante ensayos de germinación y establecimiento, con y sin tratamiento de 0.5  $\mu$ M ABA y medidas de longitud de raíz en 10  $\mu$ M de ABA. Los resultados muestran reducción en establecimiento de los dobles mutantes con respecto al silvestre cuando se suministra ABA (Figura 91A), pero en medidas de longitud de raíz no muestran un fenotipo claro de inhibición de crecimiento raíz frente al silvestre (Figura 91B).



**Figura 91.** Ensayos fenotípicos de la F2 de líneas de mutantes dobles de pérdida de función *rs1/rfa1*, *rfa1/rfa5* y *rs1/rfa5*. **A.** Las fotografías muestran ensayos de establecimiento en plántulas de 7 días. **B.** Las fotografías muestran plántulas representativas 10 días después de la transferencia de plántulas de 4 días de edad a placas de MS que carecen o se complementan con 10 $\mu$ M de ABA. Los valores son promedios de  $\pm$ sd obtenidos de tres experimentos independientes (n>50 plántulas en experimentos de establecimiento y n=15 plántulas en experimentos de crecimiento de raíz; \*, P<0.01(prueba t de Student).

Las líneas homocigotas mutantes de pérdida de función triples fueron generadas a partir de líneas homocigotas mutantes de pérdida de función dobles *rsl1rfa1* con *rfa1rfa5-1* (Figura 92).

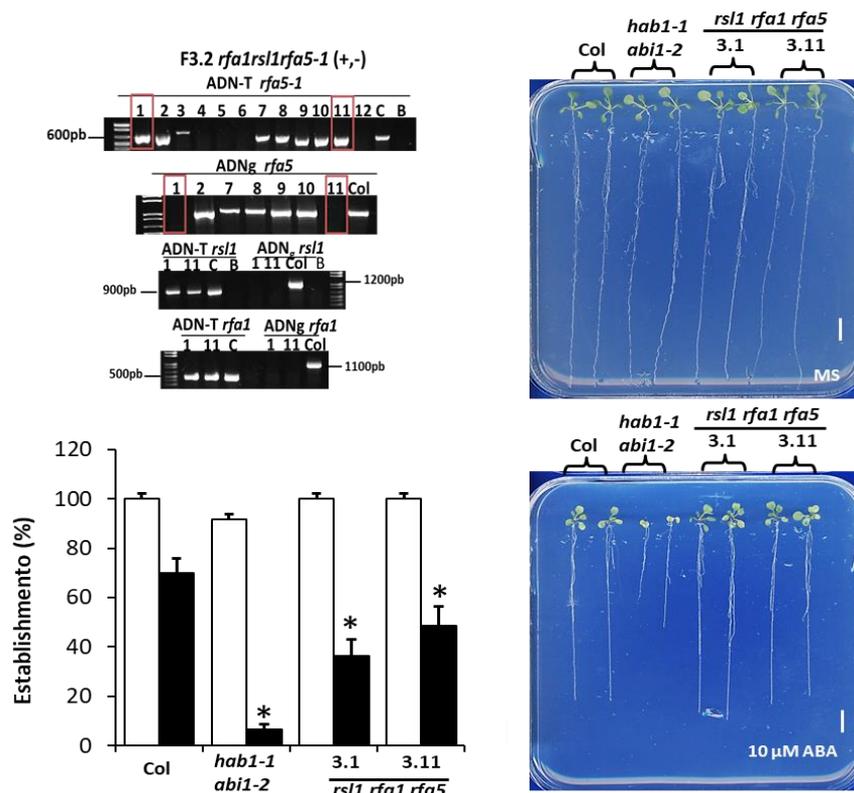


Figura 92. Arriba a la izquierda Genotipado de F3 mutantes triples de pérdida de función del cruce *rsl1xrfa1xrfa5-1*. A la derecha, ensayos fenotípicos de la F3 de líneas de mutantes triples de pérdida de función *rsl1rfa1rfa5-1*. Las fotografías muestran plántulas representativas 10 días después de la transferencia de plántulas de 4 días de edad a placas de MS que carecen o se complementan con 10μM de ABA. Abajo a la izquierda Los valores son promedios de ±sd obtenidos de tres experimentos independientes (n=15 plántulas en experimentos de crecimiento de raíz; \*, P<0.01(prueba t de Student)

Los resultados obtenidos tras la realización de pruebas fenotipas de las líneas homocigotas del mutante *rsl1 rfa1 rfa5-1* mostradas en la Figura 12 no presentan un fenotipo claro de inhibición de crecimiento raíz frente al silvestre en estos ensayos.



# DISCUSIÓN

---

En este trabajo hemos abordado la regulación de la señalización del ABA mediante la regulación de la vida media y actividad de los receptores PYR/PYL /RCARs del ABA a través de la familia de E3 ligasas tipo RBR RSL1/RFAs. Algunos trabajos previos han identificado E3 ligasas monoméricas o multiméricas que actúan en la degradación de receptores de ABA. Por ejemplo, la E3 multimérica de tipo RING-CULLINA4 (CRL4) incluyendo COP10-DET1-DDB1 (CDD) y el adaptador de sustrato DDB1-ASSOCIATED1 (DDA1) que interacciona con PYL4, PYL8 y PYL9. La E3 ligasa RSL1 que interactúa con PYR1 y PYL4 en membrana plasmática, catalizando su ubiquitinación y dirigiendo a los receptores a una degradación vía endosomal/vacuolar. La proteína E3 ligasa de tipo F-box RIFP1 (“RCAR3 INTERACTING F-BOX PROTEIN 1”), localizada principalmente en citoplasma, aunque interactúa con PYL8 en núcleo, participando principalmente en las primeras etapas del ciclo de vida de la planta. Las E3 ligasas de tipo U-box PUB22 y PUB23, que se expresan en raíz y se localizan en citoplasma interactuando con los receptores de ABA PYL5, PYL7, PYL8 y PYL9 (Bueso *et al.*, 2014b; Irigoyen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). La cantidad de trabajos relacionados con E3 ligasas que interaccionan con los diferentes receptores de ABA (Figura 93) en diferentes etapas y tejidos de la planta, revelan la importancia del mantenimiento de la homeostasis de estos componentes clave en respuestas relacionadas con estrés en planta. Sin embargo, en estos estudios, los niveles de proteínas endógenas de los receptores de ABA no fueron analizados utilizando anticuerpos específicos. Ahora, la disponibilidad de anticuerpos específicos

para receptores de ABA permite un análisis concluyente sobre la contribución de las E3 ligasas implicadas en la regulación de los niveles endógenos de receptores del ABA en planta.

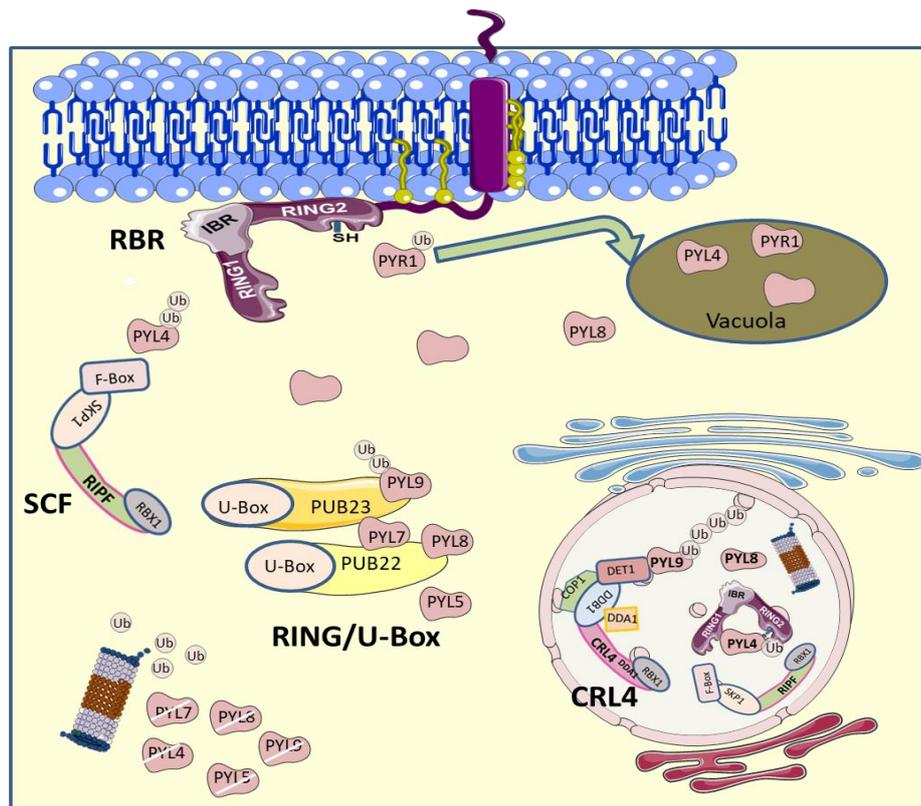


Figura 93. Representación de las diferentes E3 ligasas monoméricas o multiméricas relacionadas con la degradación de receptores PYR/PYL/RCARs del ABA vía proteosoma 26S o vía endosomal /vacuolar. La ubiquitinación de los receptores en el citosol o núcleo por las E3 ligasas CRL4<sup>DDA1</sup>, RIP, PUB22/23 y RFA4 conduce a la degradación por el proteosoma 26S, mientras que la monoubiquitinación llevada a cabo por la E3 ligasa RSL1 produce la degradación de los receptores vía endosomal/vacuolar

Se han descrito funciones biológicas de algunas E3 ligasas de tipo RBR en Arabidopsis por ejemplo en ARI12 (At1g05880) y ARI14 (At5g63730) pertenecientes a la subfamilia Ariadne B implicadas en la señalización mediada por luz UV-B y en fertilización, respectivamente (Lang-Mladek *et al.*, 2012; Ron *et al.*, 2010). En Arabidopsis las E3 ligasas de tipo RBR están constituidas por 42 genes, (Figura 94) clasificados en cuatro subfamilias: Planta II A ,B y C (22 miembros), Planta I/helicasa (3 miembros), ARA54 (1 miembro) y ARIADNE A y B (16 miembros) (Callis, 2014; Marín, 2010).

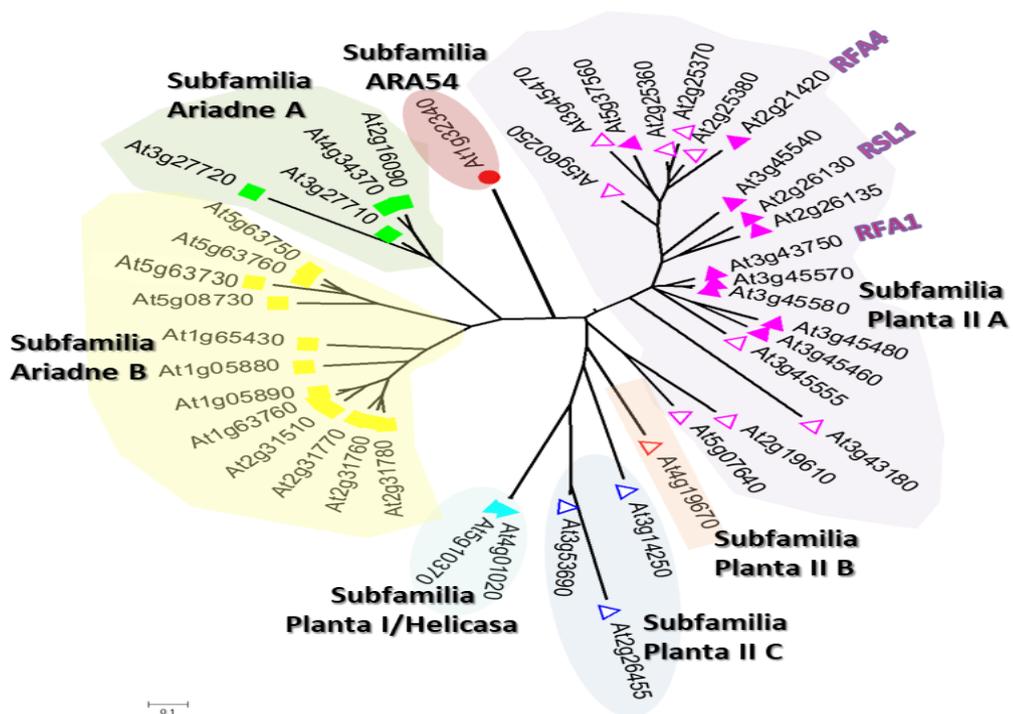


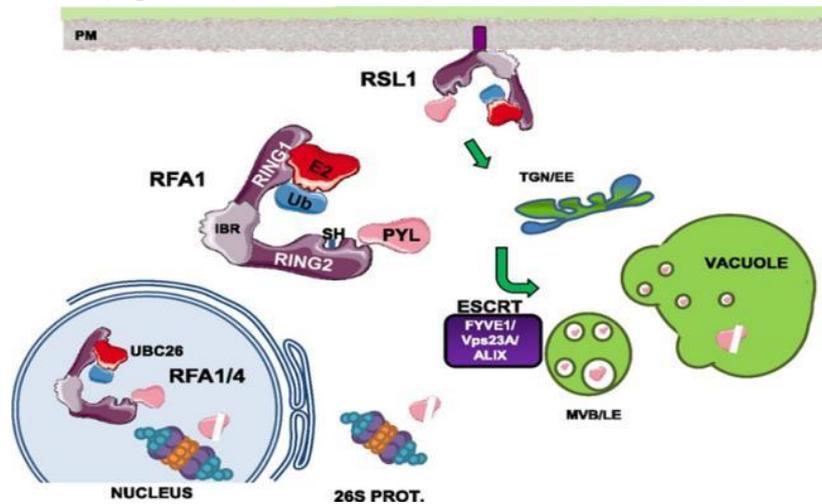
Figura 94 Árbol filogenético de grupos de proteínas E3 ligasas RBR en Arabidopsis. Las 42 proteínas fueron alineadas mediante el método MUSCLE y para la generación del árbol se ha usado Neighbour-joining mediante el software MEGA 5.0. ▲ representan a la familia RSL1/RFAs perteneciente a la subfamilia Planta II A. △ representan a otros miembros de la subfamilia Planta II A. △ distingue al miembro de la subfamilia Planta IIB. △ representan a los miembros de la subfamilia Planta II C. ▲ representan a los miembros de la Subfamilia Planta I/Helicasa, ■ subfamilia Ariadne B, ■ representan a los miembros de la subfamilia Ariadne A y ● representa al miembro de la subfamilia ARA54.

La familia de E3 ligasas RSL1/RFA pertenece al clado A de la subfamilia Planta II, diferenciándose RSL1 de otras RFAs al presentar un dominio TM, que cataliza la ubiquitinación de los receptores de ABA en la membrana plasmática (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Bueso *et al.*, 2014b). Un nuevo enfoque para la caracterización bioquímica de la proteína E3 ligasa RSL1 es el estudio de su estado de activación a través de otras MPTs como la S-acilación, que hemos mostrado en el capítulo 2 de esta tesis, dicha modificación podría intervenir en el tráfico intracelular o en la conformación de RSL1 y en su anclaje a membrana plasmática, (Batistič *et al.*, 2008; Hemsley, 2017; Hemsley *et al.*, 2013). Hemos realizados ensayos para determinar el grado de S-acilación de los residuos de Cys susceptibles de S-acilación de la E3 ligasa RSL1 en la proteína nativa, RSL1 $\Delta$ TM (con delección de los residuos comprendidos entre la posición 354 a la posición 398), RSL1<sup>C5S</sup> (mutante donde las Cys<sup>370</sup>, Cys<sup>371</sup>, Cys<sup>374</sup>, Cys<sup>375</sup> y Cys<sup>376</sup> han cambiado a Ser) y RSL1<sup>C334S</sup>, observando que RSL1 $\Delta$ TM y RSL1<sup>C5S</sup> muestran una reducción dramática de la S-acilación frente a la proteína nativa (Figura 85). El marcaje residual puede ser debido al enlace tioéster de la Ub en la Cys334, algo que será analizado en futuros experimentos. En relación a la posible función que ejerce el mecanismo de S-acilación sobre RSL1 y el destino de distintos receptores, se sabe que los receptores de ABA son reclutados por FYVE1 en los complejos ESCRT (Belda-Palazon *et al.*, 2016), en este sentido la S-acilación de RSL1 podría regular la ubiquitinación de los receptores en membrana y de esta manera afectar al reclutamiento por FYVE1 para su posterior clasificación en MVBs y degradación en vacuola. Es

decir, la S-acilación de RSL1 y por la tanto su anclaje reforzado a membrana, podría indicar un sitio ligado a membrana (microdominio) en el cual los receptores de ABA serán marcados con Ub y posteriormente reclutados por FYVE1 para dirigirlos hacia la degradación vía endosomal. Ensayos de ubiquitinación de los receptores de ABA in vivo mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* servirían para analizar si la ubiquitinación de los receptores está afectada en el mutante RSL1<sup>C55</sup>. Por otra parte, la mutación de la Cys334 a Ser de RSL1 (RSL1<sup>C334S</sup>) relacionada con la Cys361 de RFA4 (Figura 80), cisteína del centro activo, podría servir también para hacer estudios de actividad frente a PYR1 y PYL4 y de estabilidad de la proteína en RSL1. Finalmente, nuevos ensayos deberían realizarse con el mutante séxtuple RSL1<sup>C65</sup> (que tiene mutadas las 5 Cys adyacentes a y dentro del dominio TM, así como la Cys 334). Probablemente la proteína RSL1<sup>C65</sup> pierda la señal residual de S-acilación.

Si bien hasta el momento sólo se había estudiado a RSL1 en relación a la ubiquitinación de los receptores de ABA en membrana plasmática, la familia RSL1/RFAs está compuesta por 9 miembros más, cuyas funciones hipotéticamente podrían relacionarse con receptores de ABA (familia de 14 miembros en *Arabidopsis*) debido a que ambas se tratan de familias multigénicas (Bueso *et al.*, 2014b). En este trabajo de tesis hemos demostrado que los receptores de ABA también pueden ser dianas de las proteínas RFA1 y RFA4, miembros de la familia RSL1/RFA que no presentan asociación a la membrana plasmática, al carecer del dominio C-terminal TM. Por lo que sugerimos que las características específicas de los miembros de

la familia RSL1/RFA, tales como su particular localización subcelular o patrón de expresión diferencial, podrían aumentar notablemente la capacidad para reconocer y regular la estabilidad del conjunto de la familia de receptores de ABA. Curiosamente RFA4 muestra una localización nuclear específica mientras que RFA1 se localiza tanto en el núcleo como en el citosol. Nos ha sido posible detectar la formación simultánea de complejos receptor-RSL1 y receptor-RFA4 en diferentes ubicaciones subcelulares por medio de multicolor BiFC, lo cual nos permite pensar que la acción concertada de varios miembros de la familia RSL1/RFA produce una regulación fina de la vida media de los receptores de ABA en diferentes compartimentos subcelulares (Figura 95).



**Figura 95. Un modelo de trabajo que representa la orientación de los receptores ABA por RSL1, RFA1 o RFA4 en diferentes ubicaciones subcelulares.** La ubiquitinación de los receptores ABA en la membrana plasmática por RSL1 desencadena la endocitosis mediada por clatrina, el tránsito a través de la red trans-Golgi/endosomas tempranos (TGN/EE), la clasificación de la carga ubiquitinada a través de la vía ESCRT (que involucra componentes FYVE1, VPS23A y ALIX), entrega a cuerpos multivesiculares/endosomas tardíos (MVB/LE), y finalmente a la vacuola para degradación. La ubiquitinación de los receptores en el citosol o núcleo conduce a la degradación por el proteosoma 26S. El complejo receptor UBC26-RFA4 regula la vida media de los receptores ABA en el núcleo. El modelo representa la estructura modular RING1-IBR-RING2 de las ligasas E3 de tipo RBR y la localización del residuo del sitio activo Cys-SH en RING2.

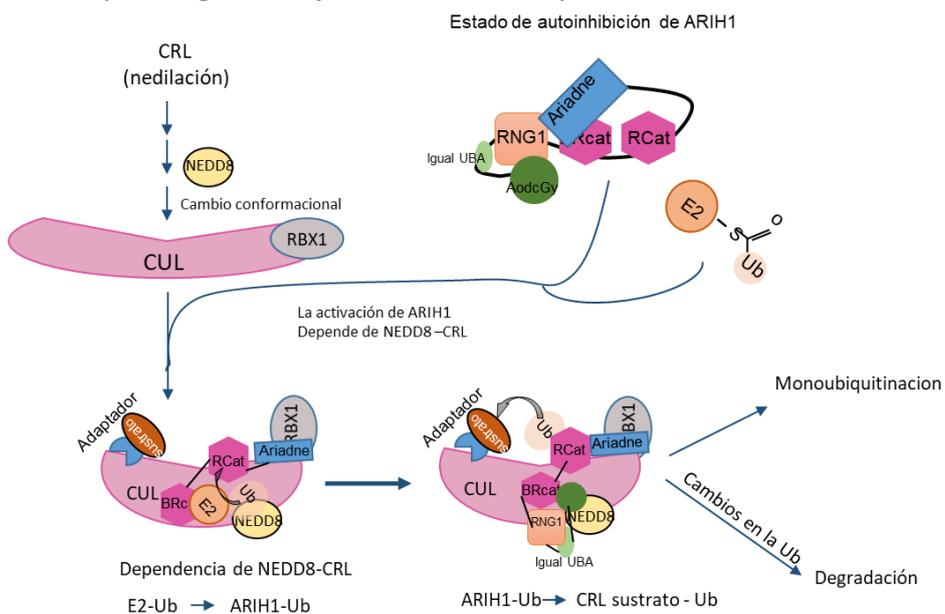
Las E3 ligasas RFA1 y RFA4 actúan probablemente a través de la degradación vía proteosoma 26S. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que tanto la vía de degradación dependiente de ubiquitinación proteosomal 26S como la vía endosomal/vacuolar regulan la estabilidad de los componentes clave para la señalización de ABA (Belda-Palazon *et al.*, 2016; Irigoyen *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2016; Yu & Xie, 2017). Así, la regulación de la vida media de los receptores de ABA puede ser llevada a cabo tanto en la membrana plasmática como en núcleo. Estos lugares de la célula son cruciales para la señalización de ABA, ya que mediante la regulación del transporte de iones/agua en membrana plasmática se regula la apertura estomática y en el núcleo tiene lugar la respuesta transcripcional a ABA (Chen *et al.*, 2020; Cutler *et al.*, 2010). La interacción de RFA1/RFA4 con los receptores PYR1 y PYL4, fue confirmada tanto *in vitro* como *in vivo*. Usando experimentos *in vivo* de expresión transitoria en *N. benthamiana* demostramos que cantidades crecientes de RFA1 o RFA4 se correlacionan con un aumento de los niveles de degradación de PYR1 y PYL4. Además, mediante el uso de anticuerpos específicos para PYR1 y PYL4, demostramos que los niveles endógenos de estos receptores se incrementaron en el doble mutante *rfa1 rfa4*. Este descubrimiento apoya firmemente la idea de que los receptores endógenos de ABA sean dianas para las proteínas E3 ligasas RFA1 y RFA4. También hemos observado que las líneas RNAi sobreexpresoras de micro ARNm artificial (“amiR”) dirigido frente a RSL1 (Schwab *et al.*, 2005), descritas previamente en Bueso *et al.*, (2014), y en las que también se ven afectados otros miembros de la familia tales como RFA1 y RFA3,

revelaron niveles superiores de proteína PYR1 y PYL4 a los observados en plantas de tipo silvestre (Figura 76), Por otra parte esta línea mostró también un aumento de la temperatura en ensayos de termografía infrarroja en hojas (Figura 74B) , que sugiere que la ubiquitinación de los receptores por RSL1 a través de la vía endosomal/vacular podrían regular la apertura estomática como ocurre en componentes de la ruta ESCRT FIVE1/FREE1 y ALIX (Belda-Palazon *et al.*, 2016; García-León *et al.*, 2019). En relación a los niveles endógenos de PYL4 observamos que también fueron mayores en el mutante *ubc26* (Figura 69), lo que se correlaciona con una mayor sensibilidad al ABA observados en los ensayos de establecimiento y crecimiento de raíz (Figura 68). Este resultado, junto con ensayos de interacción y de ubiquitinación, sugiere que UBC26 es la E2 afín que forma parte de los complejos ternarios junto con los receptores de ABA y RFA4 en el núcleo de las células vegetales. Curiosamente, miembros de la familia XI de proteínas E2 de Arabidopsis fueron descubiertos como los únicos capaces de interactuar con RFA4 en células de levadura y en el caso de UBC26 confirmamos que esta interacción ocurre en el núcleo de las células vegetales. UBC26, así como otras proteínas pertenecientes a la familia XI de E2 de Arabidopsis, además de poseer el dominio del núcleo catalítico C-terminal presente en todas las enzimas E2, contiene un gran dominio N-terminal que podría estar involucrado en su interacción con la E3 correspondiente (Figura 59). Futuros estudios bioquímicos deberían desentrañar aún más la contribución de UBC26 en su relación con las propiedades de ubiquitinación de RFA4. Además de regular la vida media de sus dianas, algunas E3 tienen ubiquitinación *in vivo* para

regular su propia estabilidad (Liu & Stone, 2010). Por ejemplo, la E3 ligasa KEEP ON GOING (KEG) se autoubiquitina en respuesta a ABA, lo que conduce a la degradación inducida por ABA de KEG y acumulación de ABI5 (Liu & Stone, 2010). No hay anticuerpos específicos disponibles aún para RFAs; sin embargo, en las líneas RFA1 y RFA4 etiquetadas con epítomos HA, observamos que RFA1 y RFA4 están ubiquitinadas y sujetas a degradación proteolítica a través de la vía proteosomal 26S (Figuras 45C y 46A-B). La ubiquitinación autocatalítica de RSL1 (Bueso *et al.*, 2014b; Figura 3B), RFA1 y RFA4 se ha observado *in vitro* y concuerda con el mecanismo de acción de las E3 de tipo RBR. En estas enzimas, la Ub es transferida desde la Cys del sitio activo de la E2 a la Cys del sitio activo de la E3, y esta a su vez transfiere catalíticamente la Ub activada desde su dominio RING2 a los residuos lisina de su diana. Una predicción de este mecanismo se basa en que las formas ubiquitinadas de E3 de tipo RBR en plantas deben detectarse *in vivo*, en este trabajo lo hemos confirmado tanto para RFA1 como para RFA4 (Figuras 49A-C). Además, la mutación Cys361Ala altera la capacidad de RFA4 para ubiquitinar su diana PYL4, lo que encaja con la idea de que se trate de la Cys del sitio activo (Figura 50). Dado que la degradación de los receptores de ABA se puede lograr a través de la vía proteosomal 26S y de la vía vacuolar, se espera que diferentes tipos de cadenas de ubiquitinación y E2/E3 ligasas estén involucradas en estos procesos. Por ejemplo, la poliubiquitinación ligada a K48 promueve la degradación por la vía proteosoma 26S, mientras que la monoubiquitination K63 promueve la internalización de las proteínas de la membrana plasmática, y la poliubiquitinación vinculada a K63 puede

promover el posterior tráfico endosomal (Romero-Barrios & Vert, 2018; Yu & Xie, 2017). De hecho, ambas poliubiquitinaciones vinculadas a K48 y K63 se han detectado sobre PYL4 (Yu *et al.*, 2016), lo que indica que la degradación de PYL4 ocurre a través de las vías UPS y vacuolar. La degradación de los receptores de ABA puede regularse de manera diferencial por diferentes miembros de la familia multigénica RSL1/RFA (Bueso *et al.*, 2014b; este trabajo) o por diferentes tipos de E3 ligasas como se ha indicado previamente (Figura 93). Otra forma de regular la ubiquitinación de sustrato podría ser a través de la cooperación de parejas E3-E3 descrita en humanos (Scott *et al.*, 2016). La E3 ubiquitin ligasa CRL4<sup>DDA1</sup> están involucrados en la degradación nuclear de los receptores de ABA; sin embargo, la degradación de PYL8 mediada por CRL4<sup>DDA1</sup> es contrarrestada por ABA, lo que sugiere que el complejo CRL4<sup>DDA1</sup> sólo funciona con niveles basales de ABA (Irigoyen *et al.*, 2014). Contrariamente a lo que ocurre con PYL8, que se estabiliza mediante la unión del ligando (Belda-Palazon *et al.*, 2018), el ABA promueve la desestabilización de PYL4 a través de la vía ESCRT/vacuolar ya que los mutantes *vps23a* y *alix1* que acumulan más PYL4 que Col-0 después del tratamiento con ABA (García-León *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2016). Estudios recientes en humanos revelan que E3 ligasas de tipo CRL y de tipo RBR pueden funcionar en equipo para regular la ubiquitinación del sustrato (Kellsall *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha descrito la asociación de CRLs nedilados (E3 de tipo CRL que tiene unidas a ellas NEDD8) con la E3 de tipo RBR ARIH1 que dirige la monoubiquitinación de los sustratos de CRL por ARIH1, y un rol recíproco de

RBR como reguladores de distintas CRL (Kelsall *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2016). Como resultado, durante el estudio de E3 ligasas en humanos ha surgido el concepto de etiquetado por el equipo E3-E3, lo que implica que diferentes tipos de E3 pueden actuar sucesivamente sobre una diana común (Scott *et al.*, 2016), Figura 96. Por lo tanto, una regulación exquisita de la ubiquitinación de un sustrato se puede lograr a través del etiquetado en equipo. Estudios futuros deberían abordar la posible cooperación de las E3 ligasas que se dirigen a los receptores de ABA en el mismo compartimento celular para regular conjuntamente la ubiquitinación del sustrato.



**Figura 96. Modelo para ARIH1 y CRL nedilados que actúan al unísono para la ubiquitinación de sustrato mediada por el conjunto E3-E3.** En ausencia de un sustrato, CRL está APAGADO (sin edificar, sin ensamblar e inhibido) y ARIH1 está APAGADO (autoinhibido). La unión del sustrato a SR estimula la vía, promoviendo el ensamblaje de CRL, nedilación y cambio conformacional, que, a su vez, permite que NEDD8, la cullina y RBX1 activen ARIH1 a través de los dominios UBA, RING2 y Ariadne (ARI) de ARIH1. Esto "abre" la estructura ARIH1 y permite la transferencia de Ub de UBCH7 a la Cys catalítica RING2 de ARIH1. Posteriormente, superficies específicas de las CRL el dominio RING de RBX1 y el dominio Ariadne de ARIH1 promueven la transferencia de mono Ub desde la Cys catalítica RING2 de ARIH1 al receptor de sustrato (SR) de la CRL unido sustrato. El sustrato mono-ub está preparado para una función alterada, más multimono-Ub mediante ciclos repetidos a través de la ruta ARIH1-CRL, poliubiquitinación a través de un mecanismo canónico RING-E2 que dirige la degradación proteasomal u otros destinos. Adaptado de Scott *et al.*, 2016.



# CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

1. La E3 ligasa RFA1 se localiza tanto en el núcleo como en el citosol, mientras que RFA4 muestra localización específica en núcleo y hemos identificado su señal de localización nuclear en el extremo N-terminal.
2. Las E3 ubiquitin ligasas RFA1 y RFA4, son reguladores clave de la estabilidad de receptores PYR/PYL/RCARs en la raíz y hojas, promoviendo la degradación de los receptores del ABA *in vivo*.
3. El análisis de las líneas sobreexpresoras de RFA1 y RFA4 sugiere que estas proteínas están ubiquitinadas *in vivo* y su degradación se lleva a cabo por la vía del proteosoma 26S.
4. Las líneas sobreexpresoras de RFA1 y RFA4, al igual que RSL1 muestran insensibilidad a ABA en crecimiento de raíz, lo cual sugiere una mayor degradación de los receptores de ABA
5. El mutante combinado de pérdida de función *rfa1 rfa4* presenta un aumento de la sensibilidad a ABA con inhibición de la germinación y de crecimiento de raíz con respecto al silvestre.
6. El mutante combinado de pérdida de función *rfa1rfa4* y la línea de *amiR 7.16.2* presentan un aumento de los niveles endógenos de los receptores PYR1 y PYL4 frente al de tipo silvestre.

## CONCLUSIONES

7. La Cys361 es la supuesta Cys del centro activo de RFA4, característica distintiva de las E3 ligasas RBR.
8. La enzima E2 UBC26 de la subfamilia XI de UBCs está localizada en núcleo y es la E2 afín que interactúa con la E3 ligasa RFA4 *in vivo*.
9. Los mutantes de pérdida de función de *ubc26* muestran un aumento de la sensibilidad a ABA, inhibición de la germinación y del crecimiento de raíz.
10. Los mutantes de pérdida de función *ubc26* presentan un aumento de los niveles endógenos de los receptores PYR1 y PYL4.
11. La proteína RSL1 presenta S-acilación en las cisteínas adyacentes y dentro del dominio TM.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## Material bacteriológico y vegetal usado: manejo y condiciones de crecimiento.

### *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas para las construcciones obtenidas en esta tesis se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Cepas de *E. coli* utilizadas. Características de uso y origen.

Cepa de <i>E. Coli</i>	Método de transformación	Casa comercial	Uso
DH5 $\alpha$	Quimiocompetentes	Realizadas en el laboratorio	Células de uso estándar, para ligaciones de restricción y clonación.
Mach1 <sup>™</sup> Ti <sup>R</sup>	Quimiocompetentes	Invitrogen	Normalmente se reservan para clonación.
TOP10	Electrocompetentes	Invitrogen	Para ligaciones de restricción y clonación
DH10 $\beta$	Electrocompetentes	Realizadas en el laboratorio	Cuando el clonaje es de vectores muy grandes o se quieren hacer librerías.
DB3.1	Electrocompetentes	Life technologies	Resistentes a la toxina ccdB que expresan los vectores GW.
BL21(DE3)	Quimiocompetentes	Realizadas en el laboratorio	Expresan la ARN polimerasa del fago T7 de modo inducible por IPTG, para la expresión de proteínas recombinantes.

## *Preparación de células competentes de E. coli*

### DH5 $\alpha$

Para la preparación de competentes DH5  $\alpha$  utilizamos el protocolo mejorado de Inoue *et al.*, 1990. En este protocolo se indica que, para una mayor eficiencia del crecimiento bacteriano, la incubación debe realizarse a 18°C, necesitándose un mayor tiempo de incubación. Además, para mantener la eficiencia debe de mantenerse todo el material preenfriado y la OD<sub>660</sub> (del inglés “*Optical Density*”, a 660 nm) no debe de pasar de 0.94.

El medio de cultivo utilizado para el precultivo contiene “Lysogeny Broth” (LB), compuesto por 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l NaCl, a pH 7.0. El medio utilizado para el crecimiento de competentes es el medio denominado SOB, el cual está compuesto por un 2% de Triptona, 1% extracto de levadura, NaCl 10mM, KCl 3mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM todo debidamente esterilizado a 120°C y 103 kPa de presión.

Una vez que se ha producido el crecimiento de las bacterias se separan en tubos de centrifuga Sorvall preenfriados, la centrifugación se realiza a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min a 4°C.

El medio utilizado para los lavados de estas quimiocompetentes es tampón TB, que debe de prepararse en el momento, el tampón TB contiene los siguientes componentes: PIPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM. Ajustar el pH a 6.7 con KOH y añadir MnCl<sub>2</sub> 55 mM.

Para conservar las bacterias quimiocompetentes DH5 $\alpha$ , se hacen alícuotas de 50  $\mu$ l en tampón TB con una mezcla de DMSO, finalmente se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Como control de Stock no contaminado, se extiende una alícuota en placas de LB con antibiótico, así como una placa de LB control. Transcurridas 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  se observa si hay crecimiento o no en las placas.

### DH10 $\beta$

Para la preparación de competentes DH10 $\beta$ , se extiende una alícuota en placa de LB sin antibiótico y se hace un control de crecimiento en placas LB con antibióticos Amp, Kan y Spec respectivamente (resistencia conferida por la mayoría de los plásmidos utilizados en el laboratorio), se mantienen durante 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Si en los controles con antibiótico no ha habido crecimiento, se pica una colonia individual de la placa de LB sin antibiótico y se pone un precultivo con LB líquido hasta llegar a saturación a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación.

El medio de cultivo para el crecimiento de competentes DH10 $\beta$  es LB. 1ml del precultivo inicial se inocula en 400ml de LB y se deja crecer en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3-4 horas o hasta que se alcance una OD<sub>660</sub> de 0.5- 0.7.

Posteriormente se centrifugan a 5000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Los lavados de estas competentes se realizan con glicerol al 10% preenfriado, realizándose 3 lavados con esta solución.

Para conservar las bacterias electrocompetentes DH10 $\beta$ , se hacen alícuotas de 50  $\mu$ l resuspendidas en 10% glicerol, y se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para su comprobación se procede de forma similar a la descrita para las competentes de DH5 $\alpha$ .

### BL21 (DE3)

El procedimiento para el crecimiento inicial es el mismo que para las anteriores competentes, comprobación de posibles contaminaciones y realización de un precultivo.

Posteriormente se inocula en medio LB y se deja crecer a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta alcanzar una  $\text{OD}_{660}$  de 0.4.

Los lavados se realizan con una solución de lavado que contiene  $\text{CaCl}_2$  a 50mM.

Para guardar las alícuotas de 50  $\mu$ l de quimiocompetentes BL21(DE3) a  $-80^{\circ}\text{C}$  se resuspenden en una solución de glicerol al 10% con 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

Para su comprobación se procede de la forma descrita para las competentes de DH5 $\alpha$ .

### *Transformaciones*

#### Por choque térmico

Se incubaron 100 ng de ADN plasmídico en 50  $\mu$ l de células quimiocompetentes de *E. coli* y se mantuvieron durante 30 minutos en hielo;

el choque térmico se realizó a 42°C durante 45 segundos, seguido de 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron a la anterior mezcla 500 µl de medio S.O.C. (Invitrogen) compuesto por 2% de triptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, y 20mM de glucosa la concentración de glucosa que posee este medio favorece una recuperación más eficiente de las bacterias después del choque térmico. Posteriormente, se incubó durante 1h a 37°C en un agitador orbital. Tras este tiempo el pellet es recogido mediante una centrifugación rápida y es plaqueado en medio LB con el antibiótico adecuado.

### Por electroporación

Se incubaron 100 ng de ADN plasmídico en 50 µl de células electrocompetentes de *E. coli*. La mezcla se introdujo en cubetas de electroporación preenfriadas (Bio-Rad) de 0.1 cm. El procedimiento de electroporación se realizó en Eppendorf Eporator®, y las condiciones de trabajo fueron de 1800 V/0.1 cm (5-6 ms). Inmediatamente, se añadió a la mezcla 500µl de medio S.O.C.(Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después, se centrifugó para recoger el pellet y las bacterias fueron extendidas en placa de medio LB que contenía el antibiótico adecuado.

### Preparación de medios de cultivo.

Para el crecimiento de *E. coli* se usó el medio de cultivo bacteriano LB En el caso de preparación de medio sólido se añadió un 2% de agar.

Previo a su uso, los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos, fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a una temperatura de 120°C a 103 kPa de presión y tras atemperarse se adicionaron los antibióticos correspondientes: 50µg/ml de kanamicina (Kan<sup>R</sup>), 50µg/ml de espectinomicina (Spec<sup>R</sup>), 100µg/ml de ampicilina (Amp<sup>R</sup>).

La temperatura utilizada para el crecimiento óptimo de *E. coli* fue de 37°C manteniéndose durante 24 horas. Para el crecimiento en medio líquido se usó un agitador orbital a 250 rpm.

### *Agrobacterium tumefaciens*

Cepas transformadas de este microorganismo se utilizaron en experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamina*, como, por ejemplo, los experimentos de BiFC, reconstitución de luciferasa ('Split-LUC') y análisis de localización subcelular de proteínas, así como para la obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis. Para ello se usaron cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 que contienen el plásmido Ti pGV2260 (Deblaere *et al.*, 1985). Para el experimento de 'Split-LUC' fue usada la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 (Lifeasible) que contiene el plásmido desarmado Ti pMP90 y expresa un control de luciferasa completa. Se utilizó electroporación para su transformación

### *Elaboración de bacterias competentes de Agrobacterium tumefaciens.*

Se procede de la misma forma a la indicada en la generación de competentes de *E. coli*. Se obtiene un precultivo y se hace crecer en medio LB, pero en este caso, se adicionan Amp y rifampicina (Rif) a 50 µg/ml. El plásmido pGV2260 presenta resistencia a Amp, de esta forma nos aseguramos que las bacterias seleccionadas contienen el plásmido, con la adición de rifampicina nos aseguramos la selección de *Agrobacterium*. La temperatura de crecimiento óptimo de *Agrobacterium* es de 28°C incubándose durante toda la noche, hasta alcanzar una OD<sub>660</sub> de 0.5-0.9.

El cultivo se centrifuga a 5000 rpm durante 15-20 min y posteriormente es lavado 2 veces con agua Milli-Q esterilizada y preenfriada a 4°C.

Finalmente, se resuspende en glicerol al 10% a 4°C y se dividen en alícuotas de 50 µl para ser guardadas a -80°C.

### *Transformación*

#### *Electroporación*

En el laboratorio se utiliza el método de electroporación para la transformación de *Agrobacterium*. Para ello se mezclaron 100 ng de ADN plasmídico (ADNp) con 50 µL de una suspensión de competentes de *A. tumefaciens* pGV2260. La mezcla se introduce en cubetas de electroporación de 0.2 cm preenfriadas (Bio-Rad). La electroporación se realizó en un Eppendorf Eporator®, con las condiciones de 2000 V/0.2 cm (pulso

resultante de 10-11 ms). Inmediatamente se añadió 1 ml de medio LB y la mezcla se incubó 1-2 h en un agitador orbital a 28°C. 200 µl de la mezcla se extendieron en placa en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado más Rif.

Se incubó a 28°C manteniéndose al menos durante 72 horas para el crecimiento de colonias

### *Saccharomyces cerevisiae*

Para la realización de ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H) en esta tesis utilizamos *Saccharomyces cerevisiae*, cepa AH109. Las competentes son elaboradas en el laboratorio, siguiendo el procedimiento que se describe en Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & User Manual con ligeras modificaciones.

### *Elaboración de competentes de levadura*

Se inicia con una siembra en estría de una alícuota previa y se incuba durante la noche a 28°C en medio sólido YPDA compuesto por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa, agua Milli-Q autoclavada y 1.5% de agar. Después de autoclavar el medio y una vez atemperado se la añade 1% de adenina esterilizada previamente por filtración, para evitar su degradación durante el autoclavado.

Posteriormente partiendo de una colonia aislada, se crece un precultivo saturado en 3 ml con medio líquido YPDA, manteniéndose durante una

noche a 28°C. 200 µl del cultivo saturado son inoculados en 200 ml de medio líquido YPDA hasta alcanzar una OD<sub>660</sub> de 0.6-0.8. El paso siguiente es el de centrifugación a 2000 rpm a temperatura ambiente.

Los lavados se realizan con agua Milli-Q autoclavada y finalmente se resuspenden en AcLiTE preparado en el momento. Esta solución está compuesta por 0.1 M de AcLi, 10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 1 mM de EDTA.

Posteriormente las células se incuban durante 15 min a 28°C sin agitación y se añaden 100 µl de ADN de esperma de arenque (Promega). Antes de ser añadido debe hervirse 10 min a 95°C.

Para su conservación a -80° C se hacen alícuotas de 100 µl con glicerol al 20%.

### *Co-transformación de células competentes*

Para experimentos de doble híbrido, se lleva a cabo una co-transformación con plásmidos que expresan las proteínas de fusión GBD-cebo (complementa auxotrofia de Trp) y GAD-presa (complementa auxotrofia de Leu). Donde GBD esta fusionado a una de las proteínas a analizar y posee un dominio de unión a ADN de GAL4 (ADN-BD) El ADN-BD son los aminoácidos 1 a 147 de la proteína de levadura GAL4, que se une a la GAL UAS corriente arriba del gen reportero. El AD (dominio de activación) son los aminoácidos de 768 a 881 de la proteína GAL4, que lleva fusionada la otra proteína a analizar y funciona como un activador transcripcional, la interacción de las dos proteínas conduce a la reconstitución de una proteína GAL4 funcional y

por tanto a la activación de la transcripción del gen reportero que contiene un sitio de unión a GAL4. Para realizar estas transformaciones usamos 1 µg de cada ADNp que codifica las proteínas a testar y se expresan de manera simultánea en células competentes de levadura AH109. A la mezcla se añadieron 0.7 ml de solución de PEG-Li-TE (4 ml 45%PEG, 0.5 ml 10x LiAc-TE, 0.5 ml de agua Milli-Q) agitando mediante vórtex, el siguiente paso consta de una incubación durante 30 minutos a 28°C, tras este paso se realizó un vórtex antes del paso de incubación durante 20 minutos a 42°C. Después se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm. Finalmente, fueron resuspendidas en 100 µl de agua Milli-Q.

### *Preparación de medios de cultivo.*

Para el cultivo de *S. cerevisiae*, utilizamos el medio sintético de cultivo (SD) (20% de glucosa, 7% de base de nitrógeno de levadura, 0.5 M de succínico, pH 5.5- Al medio SD se añade un suplemento (20x Solución DO) que contiene todos los aminoácidos y bases nitrogenadas requeridos para el crecimiento, excepto Trp, Leu, Ade e His). Los componentes descritos arriba se autoclavan por separado y después se mezclan con agitación (en la preparación de los medios sólidos) con una solución autoclavada de agua Milli-Q con un 2% de agar en el momento de la realización de las placas. Para la selección de co-transformantes de levadura, el medio de cultivo básico SD+DO fue suplementado con His y Ade.

Para ensayar la interacción de doble híbrido, el medio no se suplementa con His y Ade (-His -Ade), o bien si la interacción es más débil, únicamente se suplementa con Ade (-His).

Además, en algunos casos los medios de cultivo sólidos son suplementados con 50  $\mu$ M de ABA (+) para determinar si la interacción es dependiente o no de esta hormona.

El crecimiento óptimo de levaduras se produce a una temperatura de 28°C y se necesitan 3-4 días de incubación para la formación de colonias.

### Líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Como genotipo silvestre se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0, en cuyo fondo genético se introdujeron diferentes mutaciones o se sobreexpresaron diferentes proteínas. Se utilizaron líneas de silenciamiento génico ARNi 7.16.2 para inhibir a la proteína RSL1 que también inhibe a otras proteínas de la misma familia tales como RFA1 y RFA3 (Bueso *et al.*, 2014b). Además, se obtuvieron líneas de inserción individuales de ADN-T, procedentes del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.nott.ac.uk>) para *rsl1*, *rfa1*, *rfa4* y *rfa5* (SAIL\_0413\_c02, SALK\_005363, SALK\_20871C y SALK\_206771C respectivamente). Las líneas transgénicas fueron transformadas con los plásmidos pAlligator2-35SHA-RFA1 y pAlligator2-35SHA-RFA4 mediante el método de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). Las plantas transgénicas de la primera generación,

T1, así como las siguientes generaciones T2 de las cuales se seleccionaron las líneas que tenían una segregación 3:1 (3(GFP):1(silvestre)). El control de la generación de transgénicas se realizó mediante el análisis de la expresión de la proteína mediante Western Blot usando como anticuerpo HA. Las líneas que presentan una proporción 3:1 previsiblemente tienen una sola inserción de ADN-T. Estas líneas se crecían en invernadero para la obtención de líneas T3 seleccionadas nuevamente en base a la fluorescencia de GFP en semillas. En esta ocasión, se seleccionaban líneas en las que todas las semillas expresaban GFP. También se utilizó la tecnología de CRISPR/Cas9 para la generación de mutantes de pérdida de función de UBC26 (At1g53025), obteniendo los mutante *subc26\_c1* y *ubc26\_c2*.

### *Preparación de medios de cultivo*

#### *In vitro*

Para ensayos de crecimiento in vitro de plantas de Arabidopsis se utilizó el medio de cultivo Murashige–Skoog (MS), cuya composición es de 2.45 g/l de sales MS (Duchefa Biochemie) y 1.28 g/l (6mM) MES, ajustándose el pH a 5.7 con KOH. A este medio de cultivo MS se le adicionó 1% sacarosa. Para la solidificación del medio se añadió 1% de “Phyto agar” (Duchefa Biochemie) Se utilizaron placas de Petri de 9 cm de diámetro para recuentos de germinación y establecimiento, placas de 14 cm de diámetro para la selección en masa de las diversas transgénicas y placas cuadradas de 12 cm para los ensayos de medida de crecimiento de raíz. El medio se esterilizó mediante autoclave como se describe previamente. Cuando fue necesario,

una vez atemperado el medio a 50°C, se añadieron los antibióticos necesarios para selección de transformantes o la concentración de ABA adecuada para realizar los distintos experimentos.

Para ensayos de crecimiento *in vitro*, la esterilización de semillas se realizó utilizando la solución de esterilización que contiene 70% de etanol y 0.01% Tritón X-100 durante 10 min, seguido de solución de esterilización con hipoclorito de sodio al 50% que se mantuvo durante 5 min. La eliminación de la solución de esterilización se realizó mediante 4 lavados con 1 ml de agua Milli-Q estéril y en cabina de flujo laminar. En el último lavado, las semillas se mantuvieron en suspensión en 1ml de agua Milli-Q y se sembraron, después de la esterilización, en placas de medio Murashige–Skoog (MS) suplementadas o no con diferentes concentraciones de ABA según los requerimientos de cada experimento. La estratificación se realiza en oscuridad a 4°C durante 72h y posteriormente, las placas se incubaron en una cámara de crecimiento de ambiente controlado a 22°C en condiciones de fotoperiodo de día largo (DL) (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de 80 a 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}^2$ .

### *Tratamientos de A. thaliana*

Para la realización de los distintos tratamientos en Arabidopsis se necesitaron diferentes soluciones Stock.

### Preparación de solución Stock de ABA

La solución de ABA se preparó a partir del enantiómero (+) ABA (Biosynth y SigmaAldrich). Para su preparación, se disolvieron 26,4 mg de ABA en 1 ml de tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.0 cuyo volumen final fue de 10 ml completado con agua Milli-Q autoclavada hasta obtener una solución de Stock de 10 mM de ABA. Todo el proceso se realiza en condiciones estériles.

### Preparación de solución Stock de MG132

El Stock de MG132 (UBPBio) en polvo se disolvió en DMSO, hasta un volumen final de 5 mM. La solución final utilizada para los experimentos fue de 50  $\mu$ M.

### Preparación de solución Stock de cicloheximida (CHX)

Para su preparación, resuspendemos la cicloheximida (CHX, Sigma-Aldrich) en DMSO, hasta un volumen final de 100 mM. La concentración de uso en los experimentos realizados fue de 100  $\mu$ M.

### *Tratamientos en medios sólidos*

Las placas MS se prepararon con diferentes concentraciones de ABA. Los experimentos de germinación y de establecimiento requirieron de concentraciones de ABA de 0.5 a 1  $\mu$ M. Estos tratamientos consistían en la siembra de aproximadamente 100 semillas por genotipo. La emergencia radicular se analizó a las 72 h en luz. La germinación de la semilla y el establecimiento de plántulas se cuantificó como el porcentaje de semillas que se desarrollaron en cotiledones verdes expandidos y el primer par de

hojas verdaderas a los 5 o 7 días. En las placas de crecimiento de la raíz se requiere una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de ABA. Para la realización de estos experimentos primeramente se hacen crecer los genotipos objeto de estudio en placas de MS en posición vertical, una vez que se produce la germinación y establecimiento, normalmente sobre las 72 horas, unas 20 plántulas de cada genotipo se pasan a placas, de crecimiento de raíz, cuadradas de 12 cm, suplementadas con 10  $\mu\text{M}$  de ABA o a placas de MS, colocándolas nuevamente en posición vertical. Las placas fueron escaneadas usando un escáner de superficie plana después de 10 días para producir archivos de imagen adecuados para análisis cuantitativo del crecimiento de la raíz utilizando ImageJ v1.37 software.

### *Tratamientos en medios de cultivo líquido*

Para el análisis de la expresión de proteínas mediante tratamiento con MG132, CHX o ABA se procedió del siguiente modo. Se sembraron aproximadamente unas 50 semillas de cada genotipo en placas de MS y se mantuvieron durante 5 días en crecimiento vertical, posteriormente se traspasaron 10 plántulas de cada genotipo a matraces de 100 ml previamente esterilizados con una cantidad inicial de 3 ml de medio MS líquido y se hicieron 3 réplicas de cada genotipo por tratamiento. Tras mantener las plántulas en crecimiento durante aproximadamente 10 días, se procedía a eliminar el medio líquido MS y se añadía medio líquido nuevo con tratamientos de 50  $\mu\text{M}$  de MG132 durante aproximadamente 12 horas, tratamiento muy importante en líneas de sobreexpresión RSL1/RFA ya que

estas proteínas se degradan vía proteosoma 26S. Para el análisis de vida media de proteínas se suplementó con 100  $\mu\text{M}$  de CHX, y se procedió a tomar muestras a 0, 3, 6 y 9 horas. Los tratamientos con ABA, se realizaban a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  durante aproximadamente 6 horas.

### *Cultivo en invernadero*

Para la propagación de plantas y realización de cruces de *Arabidopsis*, plántulas crecidas durante 7 días en cultivo *in vitro* de placas en medio sólido MS fueron transferidas a alveolos con tierra, constituida por los porcentajes: 50% turba, 25% vermiculita, 25% perlita; cultivado bajo condiciones de día largo, a una temperatura de 20/23°C, con una humedad relativa del aire del 40-50% y con unas condiciones de luz de 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . En estas condiciones Col-0 completa su ciclo vital en 6 semanas aproximadamente.

### *Generación de dobles y triples mutantes de pérdida de función*

Para obtener mutantes combinados en *Arabidopsis* se sembraron plantas mutantes parentales en alveolos y se mantuvieron en estas condiciones durante aproximadamente 4 semanas. Uno de los mutantes parentales se emasculó para aislar ovarios. El polen del otro parental mutante se incorporó a los ovarios y los cruces se mantuvieron envueltos en plástico durante 48 horas, permitiendo así, el desarrollo del cruce debido a que el ovario tras este proceso se daña fácilmente. La generación filial 1 (F1), se sembró en placas MS en condiciones de día largo y se volvieron a crecer en invernadero de la misma forma que se ha descrito en el cultivo para invernadero.

Para la obtención de líneas homocigóticas, la generación filial 2 (F<sub>2</sub>) se sembró en medios MS que contenían como agente selectivo 0.5 µM de ABA. La selección con ABA facilita el aislamiento de los mutantes homocigotos. Para la identificación de su genotipo, se realiza un genotipado mediante PCR. Las líneas mutantes dobles y triples de las RFAs se describen en la tabla 7.

### Generación de líneas CRISPR-Cas 9 de pérdida de función de UBC26

La guía de ARN (ARNsg) dirigido a UBC26 (At1g53025) se diseñó usando la herramienta en línea, PLANTA CRISPR, disponible en <http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>. Se seleccionó una secuencia de 19 pb seguida de la secuencia GGG (PAM). Para clonar el ARNsg se usó el vector pDONR207 modificado (GenBank MG917725.1), este vector contiene el promotor AtU6-26 seguido del andamio ARNsg y el terminador de ARN polimerasa III. Introdujimos la secuencia de RNAsg por SLIM-PCR como se describió previamente por Chiu *et al.*, 2004. Después de verificar por secuenciación la clonación, se amplificó un fragmento por PCR que incluía el promotor AtU6-26, el ARNsg, el andamio de ARN y el terminador, con cebadores que contienen sitios de restricción para HindIII y SpeI (P1b-HindIII y P4b-SpeI). El fragmento se clonó en el vector pHEE2E-TRI, que expresa Cas9 conducido por el promotor EC1.2 específico de células de huevo (Wang *et al.*, 2015b). El vector resultante pHEE2E-TRI que contiene Cas9 y el ARNsg se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985) por electroporación y se utilizó para transformar las plantas de tipo

silvestre de Columbia por el método de inmersión floral o “floral dip” (Clough & Bent, 1998). Los transformantes T1 fueron seleccionados en medio suplementado con 20 µg/ml de higromicina. Mediante el método CTAB (Doyle and Doyle, 1987), se extrajo el ADN genómico de la generación T1, que fue usado para analizar las mutaciones causadas por CRISPR/Cas9. Para ello se amplificó un fragmento de 590 pb que contiene el sitio objeto de CRISPR usando cebadores específicos (Tabla 7). La amplificación de PCR se limpió con ExoSAP-IT (Affimetrix) que elimina el exceso de cebadores y dNTP después de la PCR. La exonucleasa I elimina los cebadores residuales monocatenarios y cualquier ADN extraño monocatenario producido durante la PCR. SAP elimina los dNTP restantes de la mezcla de PCR que pueden interferir con las reacciones posteriores. Las PCRs fueron secuenciadas posteriormente. Se obtuvieron plantas mutantes homocigotas T2 y sus descendientes que fueron utilizados en los experimentos de esta tesis.

**Tabla 7.** Detalle de la secuencia de los primers usados para la generación de líneas CRISPR/cas9 de *UBC26*

Nombre del Oligo	secuencia 5' - 3'
SLIM_AT1G53025- 2Ft	TGGCTACGTACAGAGCGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
SLIM_Rs	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
SLIM_Fs	CAATCACTACTTCGACTCT
SLIM_AT1G53025-2Rt	CGCGCTCTGTACGTAGCCACAATCACTACTTCGACT
P1b- HindIII	TTTTTTAAGCTTGTTTAAACAAGCTTTCGTTGAAC
P4b –SpeI	TTTTTTACTAGTGGTTTAAACAAAAAAGCACCG
FINTRON3 UBC26	GAAGTTCAATTTGTTGTTGAC
RvUBC26_2Cas9	CTCTGTCTGTCTAGCTTCTTCAAGG

### Generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Los vectores pALLIGATOR2 y pMDC43 conteniendo el gen de interés fueron transferidos a *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985) por electroporación y se utilizaron para transformar las plantas de tipo Col-0.

En el caso de las construcciones pALLIGATOR2, las semillas T1 fueron seleccionadas a gracias a la expresión GFP dirigida por el promotor específico de semilla At2S3 (Bensmihen *et al.*, 2004), visible en microscopio con filtro para GFP. Las semillas T1 seleccionadas se crecieron en invernadero para obtener las distintas líneas T2. La misma estrategia de selección de GFP utilizada anteriormente se siguió con las líneas T2. En este caso, para asegurarnos de que eran portadoras de una sola inserción se seleccionaron líneas que presentan una segregación 3:1 con respecto a la fluorescencia de GFP. Las líneas T2 seleccionadas se crecieron en condiciones de invernadero para la obtención de las líneas T3 homocigotas con una sola inserción.

En el caso de los vectores pMDC43, las semillas T1 fueron seleccionadas utilizando medio selectivo con 25 µg/ml del antibiótico higromicina. Las plántulas T1 resistentes fueron transferidas a alveolos en invernadero y cultivados en condiciones de DL para generar las distintas líneas T2. Las líneas T2 fueron nuevamente seleccionadas en medio con higromicina, donde se seleccionaron las líneas T2 que presentaban una segregación 3:1, asegurándonos la obtención de una progenie homocigota T3 portadora de una sola inserción, que se utilizaron en la realización de los experimentos.

Todas las líneas utilizadas se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Listado de líneas mutantes y líneas transgénicas utilizadas

GENOTIPO	Fondo /Ecotipo	OBSERVACIONES
<i>rfa1</i>	Col-0	Salk_005363
<i>rfa4</i>	Col-0	Salk_208771c
<i>rfa5-1</i>	Col-0	Salk_206771c
<i>rfa1 rfa4</i>	Col-0	Homocigota
<i>rfa4 rfa5</i>	Col-0	Homocigota
<i>rsl1 rfa1</i>	Col-0	Homocigota
<i>rsl1 rfa5</i>	Col-0	Homocigota
<i>rfa1 rfa5</i>	Col-0	Homocigota
RNAi 2.8.1	Col-0	Bueso <i>et al.</i> , 2014
RNAi 2.14.8	Col-0	Bueso <i>et al.</i> , 2014
RNAi 7.8.1	Col-0	Bueso <i>et al.</i> , 2014
RNAi 2.16.2	Col-0	Bueso <i>et al.</i> , 2014
T2.10 HA-RFA1	Col-0	pALLIGATOR.
T2.22 HA-RFA1	Col-0	pALLIGATOR.
T2.3 HA-RFA4	Col-0	pALLIGATOR.
T2.6 HA-RFA4	Col-0	pALLIGATOR.
T2.2 HA-RFA4ΔC	Col-0	pALLIGATOR.
T2.7 HA-RFA4ΔC	Col-0	pALLIGATOR.
T2.2 HA-RFA4ΔC <sup>C361A</sup>	Col-0	pALLIGATOR.
T2.6 HA-RFA4ΔC <sup>C361A</sup>	Col-0	pALLIGATOR.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Continuación

HA-RFA5	Col-0	pALLIGATOR.
T3.1 <i>ubc26_C1</i>	Col-0	Homocigota (T)
T3.5 <i>ubc26_C2</i>	Col-0	Homocigota (A)
<i>rsl1xrf1xrf5</i>	Col-0	Homocigota
<i>rsl1xrf1xrf5</i>	Col-0	Homocigota
T3.2 HA-RSL1	Col-0	pALLIGATOR.
T3.3 HA-RSL1	Col-0	pALLIGATOR.
T3.3 HA-RSL1 $\Delta$ TM	Col-0	pALLIGATOR.
T3.9 HA-RSL1 $\Delta$ TM	Col-0	pALLIGATOR.
<i>ubc26-1</i>	Col-0	Salk_137419
<i>bc26-2</i>	Col-0	Sail_906_C01
<i>pho2/ubc24</i>	Col-0	Enviada por el laboratorio de Paz-Ares, Javier
<i>rfa1(+,-) rfa4</i>	Col-0	Sesqui con <i>rfa1</i> segregando
T2.1HA-UBC26	Col-0	pAlligator
T2.8 HA-UBC26	Col-0	pAlligator
T2.6 HA-UBC26	Col-0	pAlligator

### *Realización de ensayos fisiológicos por pérdida de agua en Arabidopsis.*

Para el análisis de pérdida de agua, tanto los mutantes de pérdida de función *rfa1 rfa4* como el silvestre fueron crecidos en invernadero en condiciones normales de riego durante 21 días. Posteriormente, se cortaron 10 hojas de

tamaño similar desde 5 plantas individuales de cada genotipo, estas hojas fueron sometidas a pérdida de agua mediante el uso de la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se realizaron medidas de peso fresco a intervalos de tiempo de 30 minutos, durante 120 minutos. El análisis gravimétrico de pérdida de agua fue presentado mediante porcentaje de pérdida de peso fresco en cada uno de los tiempos en los que se realizaron las medidas.

### *Realización de ensayos de termografía infrarroja en Arabidopsis*

Para la realización de los ensayos de termografía infrarroja se cultivaron un mínimo de 5 plantas de cada uno de los genotipos a estudiar de Arabidopsis durante unas 6 semanas en cámara con un ambiente controlado a 22°C bajo un fotoperiodo de 12h día, 12h noche y una cantidad de luz de  $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con una humedad ambiental de 40-50%. Las imágenes termo gráficas infrarrojas de las hojas de roseta fueron tomadas con un equipo de cámara térmica FLIR E95 equipado con una lente de 42°. Para la cuantificación de la temperatura, se analizaron 15 secciones diferentes correspondientes a 4 hojas de cada una de las plantas. El procesado de las imágenes y la cuantificación se llevó a cabo mediante la herramienta software FLIR. Se determinó la temperatura  $\pm$  desviación estándar de todas las plantas para cada genotipo. Para las comparaciones estadísticas entre los genotipos se realizaron pruebas t de Student por pares.

## Métodos de extracción y análisis de ácidos nucleicos.

### Extracción de ADN plasmídico en bacteria *E. coli*.

Para la obtención de ADNp de *E. coli* se utilizó el método de lisis alcalina. Se centrifugaron 1.5 ml de cultivos saturados de *E. coli* a 10000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 100 µL de agua Milli-Q. Posteriormente se añadió 100 µL de solución de lisis (NaOH 0.1 M, 10 mM de EDTA y SDS al 2%). A continuación, las muestras se calentaron a 95°C durante 2 min, tras este tiempo se pusieron en hielo. En el siguiente paso se añadió 50 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 M a cada tubo y después de agitar la solución mediante vórtex, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 7 min. Tras este tiempo se añadieron 50 µl de solución de neutralización de AcK 5 M (equilibrado con ácido acético a pH 5.0). El ADNp se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 96% preenfriado y se incubaron durante 15 minutos en hielo, el precipitado fue recogido por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante. El ADNp resultante se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min. El ADNp se secó al aire y se resuspendió con 30 µl de agua Milli-Q.

## Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*.

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) para el análisis de mutantes como *rfa1rfa4* o *rsl1rfa1rfa5-1* de *Arabidopsis*, véase los oligos utilizados en la tabla 4. Se utilizaron aproximadamente 100 mg de material vegetal de plantas de 2 semanas de edad. Las hojas se recogieron en tubos eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. El material fue triturado y homogenizado con brazo de vidrio hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se añaden 2 volúmenes de tampón de extracción (bromuro de cetil trimetilamonio al 2% (CTAB), Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M) a las muestras, que fueron incubadas a 65°C durante 10 min. A continuación, se añadió 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron en vórtex. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El volumen de la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadió 1/10 CTAB al 10% (CTAB al 10% es muy viscoso, por lo que se debe precalentar la solución a 65 °C antes del uso) seguido de una incubación a 65°C durante 2 min de las muestras. Después para la inducción de la precipitación del complejo CTAB/ADN-ARN, se añadieron 2 volúmenes de agua Milli-Q y las muestras se mantuvieron en incubación en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se realizó una centrifugación de 14000 rpm durante 10 minutos. Después se desechó el sobrenadante y se añadieron 400 µl de NaCl 1 M para resuspender el pellet. Para precipitar el ADN, se añaden 800 µL de etanol al 96% seguido de incubación en hielo

durante 15 minutos. El último paso fue recolectar el ADNg por centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos. Las muestras se lavaron con una solución de etanol al 70%, y el ADNg se resuspendió con 30 µl de agua Milli-Q.

## Análisis de ADN por reacción de PCR

### *Polimerasas utilizadas*

#### ADN-polimerasa 50<sup>TM</sup> (Iife-Tecnologies) PFX de corrección de errores

Se utilizó ADN polimerasa PFX para amplificaciones de marco abierto de lectura (ORF) y su posterior Clonación por GATEWAY<sup>TM</sup> en pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>.

#### Taq-polimerasa (producción casera)

Para amplificación por PCR de ADNg obtenido desde mutantes de Arabidopsis mediante el protocolo del CTAB.

En la Tabla 9 se muestra el listado de oligos empleados.

**Tabla 9.** Oligos usado para la amplificación del ADN genómico

Amplificación	Nombre del oligo	Secuencia 5' - 3'
RSL1	FLPAG2G26130	GGCTTTACTTCAAGGGTTTGG
	RPAT2G26130	TAGTAGAGACGGTTCTGGTAC
RFA1	F3g43750	ATGGAGGAAAGTACTTTAGTACCA
	Rstop3g43750	TTAGAGAATGTAACGATGATGATA

Continuación		
A5	F5g37560	ATGGATTATGCGGTAACCAAAG
	RRFA5EXON2	CACAGTTTTGGTACGATGTTGA
RFA4	F2g21420	ATGGAAAAACATGATCTAACTTTG
	FMDFRFA4	ATGGATTTTGCGACAACCGGAGAT
Inserción Sail ADN-T	LB3Sail	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACC
Inserción SalK ADN-T	New pROK2	GCCGATTTGGAACCACCATC

## Vectores de clonación utilizados.

### Vector de entrada

#### *Clonación GATEWAY™*

Para la clonación de vectores de entrada se utilizó el Kit GATEWAY™ pCR8®/GW/TOPO®TA Cloning® (LifeTechnology). Para ello, se siguieron los pasos descritos en el manual, los cuales se resumen a continuación:

1. Amplificación del gen que se desea introducir en el vector de entrada, como ejemplo he elegido a RFA4  $\Delta$ C (RFA4 que carece de los residuos de aminoácidos de la posición 385-488), para ello se realiza una amplificación con los cebadores adecuados por PCR y usando la polimerasa PFX 50 correctora de errores. Esta amplificación se lleva a cabo con los correspondientes temperaturas y tiempos indicadas para la polimerasa PFX50.

2. Posteriormente se produce un paso de unión de A en cada extremo, en el que se añade Taq polimerasa sin corrección de errores, producida en el laboratorio y dNTPs (10 mM). Posteriormente se incuba durante 10 minutos a 72°C en termocicladora. Para inactivar las polimerasas la reacción resultante se incuba a –20°C durante 12h (aunque con unos pocos minutos sería suficiente).

3. A continuación se realiza la reacción TOPO en la cual 5 µl del producto de PCR + As se mezclan con 1 µl de sales TOPO y 0.5 µl de pCR8. Se completa con un volumen final de 5 µl añadiendo la cantidad de agua Milli-Q necesaria. Esta reacción se incuba a 25°C durante 30 minutos máximo.

4. Finalmente se procede a realizar la transformación en bacterias quimiocompetentes de *E. coli*.

Una vez que se crecen mediante los pasos descritos anteriormente, se extrae el ADNp y se secuencian para descartar cualquier mutación introducida en el proceso.

#### *pENTR221-RFA4*

Fue obtenido desde el Arabidopsis Biological Center (ABRC, The Ohio State University).

#### *pENTR201-UBC24 (PHO2)*

Cedido por el laboratorio del Dr. Paz-Ares Rodríguez, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid).

### *pCR8-RFA4ΔC*

Para la clonación del mutante RFA4ΔC<sup>C361A</sup> se realizó la técnica SLIM-PCR descrita en Chiu *et al.* (2004). En la Tabla 10 se muestran los oligos utilizados para la amplificación.

Todos estos vectores, fueron posteriormente dirigidos hacia sus correspondientes vectores destino.

**Tabla 10.** Oligos y su secuencia usados para la amplificación de RFA4ΔC y RFA4ΔC<sup>C361A</sup>. En azul, se indican la secuencia de los adaptadores a través de los cuales se produce la circularización espontánea.

Amplificación	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'
RFA4 ΔC	F2g21420	ATGGAAAAACATGATCTAACTTTG
	RvStopRFA4DC	TCAGCATCCTCGTTGGTTCCATTC
RFA4 ΔC <sup>C361A</sup>	FtRFA4C361A	TTTGAAGGTGCCAACCCACATAACTTGCAGATGTGGATTTGAGTTT
	RsRFA4C361A	AAGTTCAACCAAGTTGCTACTG
	FsRFA4C361A	ACTTGCAGATGTGGATTTGAGTTT
	RtRFA4C361A	TATGTGGTTGGCACCTTCAAAAAGTTCAACCAAGTTGCTACTG

### Vectores destino

Para la generación de la mayoría de los vectores de destino se utilizó la tecnología GATEWAY™ LR Clonase II.

Para esta reacción se necesitan de 50-150 ng de ADN del vector de entrada y 150 ng de ADN del vector destino mezclándose con 1.5 μl de enzima LR Clonase™ II (Life tecnologías). El volumen final de la mezcla se llevó a 7.5 μl

con agua Milli-Q y posteriormente se incuban a 25°C durante 12h, el tiempo se puede acortar dependiendo del tamaño del vector destino. Para inactivar la enzima LR clonasa, se añade 1 µl de proteínquinasas (equivalente al 1% de solución en la muestra) y se incuba a 37°C durante 10 min. Se transforman 5 µl de quimiocompetentes de *E. coli* y el procedimiento para el crecimiento posterior en placa se describe en el apartado de preparación de medios de cultivo.

### *Para doble híbrido de levaduras (Y2H, Yeast-Two – Hybrid)*

Para ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H), se utilizaron los vectores destino pGBKT7-GW y pGADKT7-GW. Los genes clonados en estos vectores se fusionaron al dominio de activación GAL4 (GAD) en pGADKT7, o al enlace GAL4 dominio (GBD) en pGBKT7.

Las E3 ligasas RFA1, RFA4 y RFA4ΔC se clonaron en pGAD, las enzimas E2 UBC26 y UBC24 se clonaron en pGBD. Los receptores de ABA obtenidos previamente en el laboratorio se clonaron en pGBD.

### *Construcciones para la expresión en estable en Arabidopsis*

En Arabidopsis, para la obtención de líneas GFP-PYR/PYLs se utilizaron los vectores GW-pMDC43. En estos vectores se introducen las proteínas de interés que se expresan bajo el control del promotor 35S y se fusionan en el extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente. Para la obtención de líneas transgénicas sobreexpresoras portadoras del epítipo HA, se usó el

vector pALLIGATOR2–GW (Bensmihen *et al.*, 2004). Se generaron construcciones HA-RFA1, HA-RFA4, HA-RFA4ΔC y HA-RFA4ΔC<sup>C361A</sup>.

### *Construcciones para la expresión en transitoria Nicotiana benthamiana*

Utilizadas para localización de proteínas en células epidérmicas de Nicotiana.

A través de GW-pMDC43 se fusionaron las proteínas RFA1, RFA4, RFA4ΔC, RFA4ΔC<sup>C361A</sup>, UBC24 y UBC26. A través del vector pMDC83-GW, la proteína de interés se fusiona a GFP por su parte N-terminal, obteniéndose así RFA1-GFP.

Utilizadas para Complementación de fluorescencia bi-molecular (BiFC) y multicolor BiFC (mcBiFC) en Nicotiana.

Para los experimentos de BiFC, los vectores de destino utilizados fueron pYFP<sup>C</sup>43 e pYFP<sup>N</sup>43 (Belda-Palazón *et al.*, 2012). Las proteínas de interés se fusionaron a la parte N-terminal o C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP) bajo control del promotor 35S. Para mcBiFC los vectores utilizados fueron obtenidos de Gehl *et al.*, 2009. En este trabajo se clonaron PYR1/PYL4 en vectores p(MAS)-SCYCE(R), RSL1 en pDEST-SCYNE(R) y RFA4 en pDEST-VINE(R). En el caso de la interacción de RFA4 con UBC26 y los receptores del ABA. Se clonó RFA4 en vectores p(MAS)-SCYCE(R), UBC26 en p(MAS)-SCYNE(R) y los receptores del ABA en pDEST-VYNE (R).

### *Construcciones para la purificación de proteínas en E. coli.*

Para la expresión de proteínas recombinantes, se utilizaron dos sistemas. El vector pETM-11 se usó para expresar proteínas marcadas con cola de 6His fusionada en la parte N-terminal de la proteína. Se trata de un vector de clonación por restricción. Para realizar la clonación se realiza un corte con una enzima de restricción en el vector de entrada, en nuestro caso, tenemos en cuenta a la hora de amplificar por PCR la proteína de interés añadir un sitio de corte NcoI. Como el vector pCR8 genera dos sitios de corte EcoRI que flanquean a la proteína de interés (estos dos enzimas de restricción son los que más se utilizan para este tipo de clonación en el laboratorio), una vez que la proteína está en el vector de entrada pCR8 se hace una restricción con NcoI–EcoRI. El vector destino también es digerido con la misma combinación de enzimas de restricción. Las digestiones se purifican desde gel de agarosa. Para la reacción de ligación se añaden 50 ng de inserto y 150 ng de vector destino, junto con la ligasa T4 y buffer de la enzima 10X. El volumen final se completa con agua Milli-Q hasta obtener 15 µl. Esta reacción de ligación se incuba durante 12-16 h y tras este periodo unos 5 µl de reacción son transformados en bacterias quimiocompetentes. Las proteínas del laboratorio que van fusionadas a His son 6His-PYR1 y 6His-PYL4. Otro vector utilizado para la expresión de proteína recombinante es el vector pMAL-c2 (Biolabs), la etiqueta que va a marcar a la proteína es la proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada en posición N-terminal, las proteínas expresadas con MBP son MBP-RFA1, MBP-RFA4ΔC.

## Extracción de ARN y análisis de la expresión del gen por PCR o PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

La extracción de ARN en mutantes de pérdida de función de *rfa1 rfa4* se realizó a partir de muestras de silicuas de dos semanas de edad, ya que es el tejido de *Arabidopsis* que expresa mayores niveles del gen. Para la extracción de ARN se usó el reactivo Trizol (Invitrogen). El ARN se purificó adicionalmente a través del tratamiento con DNaseI y el mini kit de purificación de ARN RNeasy (Qiagen). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó usando el kit Superscript IV (Invitrogen). Para la qPCR se usó el reactivo Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) y ADN Taq de platino polimerasa (Invitrogen). En la reacción se añadieron 0.4  $\mu$ l de ADNc en un volumen final de 10  $\mu$ l y los niveles de transcripción de RFA4 se normalizaron sobre el del gen de referencia UBQ10 (Czechowski, Stitt, Altmann, Udvardi, & Scheible, 2005). Véase tabla 6 para los oligos utilizados para qPCR. El equipo utilizado fue RTqPCR fue 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Las condiciones para la PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización de 15 segundos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización (15 segundos at 95°C), un paso de hibridación de oligos (30 segundos a 55°C) y paso de extensión (30 segundos a 60°C); posteriormente 1 ciclo de disociación de ADN (15 segundos a 95°C, 1 min a 60°C).

Los resultados de qPCR fueron analizados mediante 7500 Software v2.0.4 (Applied Biosystems), usando el método de la expresión relativa de genes  $2\Delta\Delta C_t$  como se describe en (Livak & Schmittgen, 2001). En la Tabla 11 se muestran los oligos utilizados.

**Tabla 11.** Oligos y sus secuencias usadas para la determinación de la expresión de RFAs por qPCR.

Amplificación	Nombre del oligo	Secuencia 5' - 3'
RFA1	Fq3G43750	CATGCGATGATTACAAGAGATTGG
	Rq3G43750	TACGTTGCATCCTTCGATACG
RFA4	Fq2G21420	AATGATGATGGCTCAGAATTAGATG
	RV-RFA4	TCAGTTGCTCTCATCTTTCTGC

## Tecnología de proteínas.

### Inducción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Para la inducción de proteínas recombinantes se crecieron bacterias *E. coli* junto con el plásmido pETM-11 o pMAL-c2 durante 3 horas a 37°C en medio LB o hasta alcanzar una densidad óptica ( $OD_{660}$ ) de 0.6-0.8. En este punto, se añadió 1 mM de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor de la expresión de proteínas. Posteriormente las bacterias se mantuvieron en incubación 3h a 28°C. Para recoger el pellet bacteriano, el cultivo se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con 2 ml de tampón MBP (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, 200 mM

NaCl, EDTA 1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, que se añade en el momento del uso, posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 1.5 minutos a 4°C y se guardó hasta su uso a -80°C.

### Purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Las proteínas recombinantes etiquetadas con 6His se purificaron hasta homogeneidad utilizando cromatografía de afinidad de níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA), tal como se describe en Antoni *et al.*, 2012. Posteriormente, el pellet de proteínas se resuspendió en 2 ml de tampón de histidina (tampón HIS, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, KCl 250 mM, 10% de glicerol, 0.1% de Tween 20 y 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), y las células se sonicaron con 2 pulsos de 30 segundos (posición de espera, 50% de la potencia) en un Branson Sonifier. Posteriormente se centrifuga a 14000 g durante 15 minutos a 4°C, y se recoge el sobrenadante, el cual se diluyó con 2 volúmenes de tampón HIS. Para la extracción de proteína se utiliza una columna de agarosa ácida de Ni-NTA de 0.5 ml a la que se le añade la mezcla del sobrenadante con los dos volúmenes de tampón de HIS. Posteriormente, la columna se sometió a 3 lavados con 10 ml de tampón HIS suplementado con 20% de glicerol y 30 mM de imidazol. La proteína unida a la columna se eluyó con tampón suplementado con 20% de glicerol y 250 mM de imidazol. La recuperación de las columnas se realizó agregando 5 ml de acético 0.2 M de una solución suplementada con 30% de glicerol, lavándola

posteriormente con 8 ml de agua Milli-Q. La resina se mantuvo a 4°C con 5 ml de 30% etanol.

## Cultivo y purificación de proteínas fusionadas a MBP.

La proteína de unión a maltosa (MBP) es una proteína grande de aproximadamente 42.5 KDa.

La purificación de la proteína se realizó por cromatografía de afinidad en columnas con amilosa. La matriz para la separación de proteínas fue la resina de amilosa (Nueva Inglaterra, Biolabs), que es un polímero con alta afinidad por la proteína MBP. Se añadió 1 ml de la resina a la columna para la generación de la matriz, el flujo se descartó y la resina se lavó una vez con 10 ml de tampón MBP (TrisHCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y  $\beta$ - 10 mM mercaptoetanol). Las muestras deben mantenerse en hielo durante el proceso, pero especialmente en el paso de sonicación, ya que así se preserva la integridad de las proteínas. Nuevamente como en los pasos explicados para la purificación de HIS, se resuspenden 2 ml de tampón de lisis MBP (1x MBP buffer, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.25% Tween 20), para su posterior sonicación con 2 pulsos de 30 segundos (posición de espera, 50% de la potencia) en un Branson Sonifier. Las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 10 min y 4°C. Se recogió alrededor de 2 ml de la muestra y se diluyó 5 veces en dilución tampón de lavado de MBP (1x MBP tampón, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). 10 ml de la muestra se cargaron en la columna, la cual se lavó con 10 ml de tampón de lavado de MBP y se

eluyó en fracciones de proteínas con 0.3 ml de tampón de elución MBP (1x tampón MBP,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y 200  $\mu$ L de maltosa 0.5 M).

La cuantificación de la proteína en ambos protocolos de purificación se realizó mediante medidas de Bradford (Bio-Rad). Las muestras se cargaron para realizar la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

### Tinción de Coomassie.

Para la visualización de proteínas, los gels de acrilamida se incubaron en solución de tinción InstantBlue™ (Expedeon) durante 15 min. Posteriormente el gel se enjuagó con agua Milli-Q, hasta que el fondo fue eliminado.

### Ensayos “Pull-Down”.

Para la realización de los ensayos Pull-down (Tabla 12) se fusionaron las proteínas RFA1 o RFA4 $\Delta$ C a MBP tal como se describe en Bueso *et al.*, (2014b). En estos ensayos también fueron purificadas las proteínas 6His-PYR1 y 6His-PYL4. Posteriormente 5  $\mu$ g de MBP- RFA1, MBP-RFA4 $\Delta$ C o MBP y 5  $\mu$ g de 6His-PYR1 o 6His-PYL4 se incubaron durante 1 h a 4°C con balanceo constante en 0.5 ml de tampón de unión (Tris- HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0.5% (v/v)). Después se purificaron proteínas MBP usando cromatografía de afinidad con amilosa, se eluyeron y analizaron por SDS-PAGE, seguido de transferencia mediante Western e inmunodetección usando anticuerpos monoclonales anti-etiqueta HIS (Roche).

**Tabla 12.** Construcciones realizadas para pull-down (PD).

Construcción	Plásmido	selección en bacteria	Referencia
6His-PYR1	pETM-11	Kan <sup>R</sup>	Antoni <i>et al.</i> , 2012
6His-PYL4	pETM-11	Kan <sup>R</sup>	Antoni <i>et al.</i> , 2012
MBP-RFA1ΔC	pMAL-c2	Amp <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
MBP-RFA4ΔC	pMAL-c2	Amp <sup>R</sup>	En este trabajo

## Extracción de proteínas de plantas.

Para la extracción de proteínas en tejidos de planta se utilizaron dos tipos de tampón de extracción.

### *Tampón Laemli 5x.*

Compuesto por: SDS 7.5 %, DTT 0.1M, EDTA10mM, azul de bromofenol 0.25 mg/ml, Tris 0.3 M y sacarosa al 30%. La mezcla se tiene que llevar a pH 6.8 con HCl. La mezcla con el material vegetal se realiza con 2 volúmenes de tampón laemli 2x en 1 volumen de muestra homogenizada y pulverizada, tras pasarlas por N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, esta mezcla se incubaba durante 10 min a 95°C, y tras este tiempo, las muestras se colocan en hielo durante 5 min. Tras la incubación, se da un golpe de centrifuga (spin) y se cargan en geles de acrilamida.

### *Tampón de Lisis.*

Compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, DTT 3mM, inhibidor del proteosoma 50 μM MG-132 (UBPBio) y 1 tableta de

mezcla antiproteasa Roche (1 tableta/10 ml de tampón). Dependiendo del experimento que queramos realizar se le pueden añadir otros compuestos tales como 10 nM de ubiquitin aldehído y 10 mM de NEM (N-etilmaleimida) compuesto que forma enlaces tioéter covalentes estables con sulfhidrilos (p. ej., cisteínas reducidas), lo que permite bloquearlos permanentemente para evitar la formación de enlaces disulfuro.

Las mezclas de 1 volumen de material vegetal, debidamente pulverizado y homogenizado, se realizaban generalmente con 1.5 volúmenes de tampón de lisis. Se mantenían 15 min en hielo, agitando mediante vórtex cada 5 min. Posteriormente, se centrifuga durante 15 minutos en centrifuga de 4°C y el sobrenadante se trasfiere a otro eppendorf, al que se le añade la mezcla con tampón de carga laemmli 5X (concentración final 1X). A continuación, la mezcla se mantenía durante 5 minutos a 95°C, luego 5 minutos en hielo y se le daba un pequeño spin para que la muestra esté lista para cargar en gel de acrilamida.

### SDS-PAGE Electroforesis.

El sistema utilizado para el análisis de proteínas fue el sistema de Bio-Rad. Geles de 10% de acrilamida (19:1 Acrilamida/Bis-acrilamida de National diagnóstico), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.2% N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED) y 0.08% de persulfato de amonio (APS). El gel de concentración está compuesto por 4% de acrilamida/bisacrilamida, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS al 0.1%, TEMED al 0.8% y 0.1% de APS.

## Inmunoanálisis de proteínas (“Western blot”)

Después de SDS-PAGE, se utilizó el método de transferencia húmeda para visualización de proteínas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) Immobilon®-P (Millipore™), previamente activada en solución de metanol al 100%, utilizando Mini Trans-Blot® Cell sistema (Bio-Rad). El tampón de transferencia utilizado fue 1x Towbin (Tris-HCl 25 mM pH 7.6, glicina 192 mM, metanol al 20% (v/v), 0.1% SDS) Para verificar la transferencia, la membrana se incubó en una solución Ponceau S(Sigma-Aldrich) (0.1% (p/v) en 5% ácido acético) durante 15 minutos en un agitador orbital. Posteriormente se utilizó un 1% de ácido acético para fijar proteínas y para lavar la membrana y 1x solución salina tamponada con Tris (se usó TBS, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NaCl 150 mM) para lavar completamente la membrana.

Para la detección de proteínas, la membrana se incubó durante al menos 2h en solución de bloqueo (1x TBS, 0.1% Tween-20 con 5% (p/v) y leche desnatada en polvo). Posteriormente al bloqueo se incubó el anticuerpo adecuado durante al menos 1 h a temperatura ambiente disuelto en solución de bloqueo al 5% (Tabla 13). Después de la incubación con el anticuerpo, se realizaron 3 lavados con 1x TBST de 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Tras los lavados, en los casos en los que fue necesario, se añadió el anticuerpo secundario, el cual también se diluyó en una solución de bloqueo al 5%, incubándolo durante 1 hora. Para la detección, se realizaron primeramente 3 lavados como los descritos

anteriormente. y posteriormente se usó el Kit de detección de transferencia de western de quimioluminiscencia ECL advance (GE Healthcare).

La captura de imágenes se realizó con el analizador de imágenes LAS3000 y la cuantificación de la señal de proteína se realizó utilizando Image Gauge Software V4.0.

**Tabla 13.** Listado de anticuerpo usados para la determinación por western-blot.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
Anti-GFP	Monoclonal	Clontech, JL8	1:10.000
Anti-HA/HRP	Monoclonal	Roche, 3F10	1:2.000
Anti-GST	Polyclonal	Sigma, G7781	1:10.000
Anti-Actin	Polyclonal	Agrisera, AS13 2640	1:5.000
Anti-RFP (Biotin)	Policlonal	Abcam, ab3477	1:10.000
Anti-Ubiq (P4D1:cs-8017)	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology	1:1.000
Anti-PYL4	Policlonal	Yu <i>et al.</i> , 2016	1:2.000
Anti-PYR1	Policlonal	Agrisera	1:200
Anti-GFPn	Policlonal	Sigma	1:2.000
Anti-His	Monoclonal	Roche BMG-his	1:2.000
<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
Anti-IgG(mouse)-HRP	Polyclonal	GE Healthcare	1:5.000
Anti-IgG(rabbit)-HRP	Polyclonal	GE Healthcare	1:5.000
<b>Afinidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
Streptavidin-HRP	-	Fisher	1:5.000

## Ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H, “Yeast-Two – Hybrid”).

Las cotransformaciones se realizaron según lo descrito anteriormente. Las construcciones para Y2H que se utilizaron en esta tesis se resumen en la Tabla 14. Se creció la levadura cotransformada con los plásmidos que codifican GBD-cebo y GAD-presa en medio sintético carente de Leu y Trp, individualmente y cuando alcanzaron igual densidad celular, se realizaron diluciones seriadas de levaduras en medio de cultivo líquido (SD, -Trp, -Leu).

Posteriormente, se realizaron goteos de las diluciones anteriores en placas con medio sólido (control medio SD, -Trp, -Leu) y en medio sólido (SD, -Trp, -Leu, -His) suplementados o no con 50  $\mu$ M de ABA. Por último, las placas se incubaron durante 72 horas a 28°C en una cámara de cultivo. Una vez que se había producido el crecimiento suficiente las placas fueron escaneadas de la misma forma en que se ha descrito en tratamientos en medios sólidos.

**Tabla 14.** Listado de construcciones realizadas para los ensayos de doble híbrido de levadura.

Construcción	Plásmido	Selección en bacteria	Referencia
GBD-PYL4	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009
GBD-PYL5	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009
GBD-PYL6	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009
GBD-PYL8	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009
GBD-PYL9	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009
GBD-PYL10	pGBDKT7	Kan <sup>R</sup>	Santiago <i>et al.</i> ,2009

Continuación

GBD-UBC24	pGBKT7- GW	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
GBD-UBC26	pGBDT9	Amp <sup>R</sup>	Sabrina Iñigo
GAD-HA-RFA1	pGADT7- GW	Amp <sup>R</sup>	En este trabajo
GAD-HA-RFA4	pGADT7- GW	Amp <sup>R</sup>	En este trabajo
GAD-HA-RFA4 $\Delta$ C	pGADT7- GW	Amp <sup>R</sup>	En este trabajo
GAD-HA-PYL8	pGADT7- GW	Amp <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016

## Visualización de proteínas en expresión transitoria con *Agrobacterium*.

La expresión transitoria de proteínas, tanto para estudios de localización, estudios de interacción mediante BiFC, así como multicolor BiFC o simplemente para producción de las mismas *in vivo*, se realiza a través de la expresión en *Agrobacterium*. En la Tabla 15 se muestra las construcciones realizadas para estos estudios. Para ello, partimos de una colonia aislada de *A. tumefaciens*, transformada por electroporación como se ha detallado previamente, con la que iniciamos un precultivo en un volumen de 3 ml de medio líquido con el correspondiente antibiótico, en agitación y a 28°C desde 48 horas hasta saturación del cultivo. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 del precultivo en LB realizado al momento, y se dejó crecer durante la noche. El cultivo de bacterias de *A. tumefaciens* se fue recogido por centrifugación a 3000 g durante 30 min y resuspendido en solución de infiltración (tampón MES 10mM a pH 5,6, acetosiringona 100  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub>

10mM) a un OD<sub>660</sub> de 1. Estas células se mezclaron con un volumen igual de *A. tumefaciens* C58C1 (pCH32 35S:p19) que expresa el supresor de silenciamiento p19 (Voinnet, Rivas, Mestre, & Baulcombe, 2003). Las bacterias fueron incubadas durante 3 horas a temperatura ambiente para conseguir la expresión de los genes de infección. Posteriormente se infiltraron en hojas jóvenes completamente expandidas de plantas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad. Las hojas fueron examinadas 48–72h después de la infiltración.

**Tabla 15.** Construcciones utilizadas en los estudios de localización subcelular.

	Construcción	Plásmido	Selección en bacteria	Referencia
Construcciones estudios de localización subcelular	2x35S:RFA1-GFP	pMDC83	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-RFA1	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-RFA4	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-RFA4ΔC	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-RFA4ΔC <sup>C361A</sup>	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-UBC24	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	2x35S:GFP-UBC26	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	NOS:OFP-TM23	pGPTVII	Kan <sup>R</sup>	Batistic <i>et al.</i> ,2012
	2x35S:GFP	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2012
Construcciones usadas en interacción mediante ensayos de BIFC	YFP <sup>c</sup> -PYR1	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> ,2014
	YFP <sup>c</sup> -PYL4	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> ,2014
	YFP <sup>c</sup> -PYL5	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	Irigoyen <i>et al.</i> , 2014
	YFP <sup>c</sup> -PYL8	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	Irigoyen <i>et al.</i> , 2014
	YFP <sup>c</sup> -UBC26	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	YFP <sup>c</sup> -OSTΔ280	pYFC43	Kan <sup>R</sup>	Vlad <i>et al.</i> , 2009
	YFP <sup>N</sup> -RFA1	pYFN43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	YFP <sup>N</sup> -RFA4	pYFN43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	YFP <sup>N</sup> -RFA4ΔC	pYFN43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo

Continuación

Construcciones usadas para ensayos de multicolor BiFC	VENUS <sup>N</sup> -c-myc-RFA4	pDEST <sup>GW</sup> -VYNE (R)	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	RFA4 -HA-SCFP <sup>C</sup>	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	SCFP <sup>N</sup> -Flag-RSL1	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016
	VENUS <sup>N</sup> -c-myc-UBC26	pDEST <sup>GW</sup> -VYNE (R)	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
	PYR1-HA-SCFP <sup>C</sup>	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016
	PYL4-HA-SCFP <sup>C</sup>	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016
	SCFP <sup>N</sup> -Flag-PYL4	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016
	SCFP <sup>N</sup> -Flag-PYL8	pDEST <sup>GW</sup> -SCYCE (R)	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> ,2016

## Microscopía de láser confocal: ensayos de localización, BiFC y multicolorBiFC.

Las imágenes de confocal fueron tomadas con el microscopio de escaneo láser Zeiss LSM 780 AxioObserver.Z1 equipado con objetivo de inmersión en agua C-Appromat 403/1.20-W. En los experimentos de infiltración en hojas de tabaco se usaron los fluoróforos como los que indicados a continuación: SCFP (405nm/450-485nm), GFP (488nm/500–530nm) y YFP o SCFPC + VENUS<sup>N</sup> 863 (488nm/529-550nm), OFP (561nm/575-600-864nm) y clorofila (561nm/685-760nm), entre paréntesis se muestran las longitudes de onda de excitación y emisión respectiva para cada uno de ellos. La toma de imágenes en los casos que se necesitaba detectar más de un fluoróforo, como en los experimentos de multicolorBiFC, se realizó de manera secuencial para los canales determinados. El “pinhole” (colimador de orificio

delimitante) se ajustó a una unidad de aire por longitud de onda. El procesamiento de imagen posterior a la adquisición se realizó utilizando el software de imagen Lite ZEN (ZEISS Efficient) e ImageJ v1.37 (<http://rsb.info.gov/ij/>).

## Co-inmunoprecipitación (coIP).

Se realizaron experimentos coIP mezclando extractos de proteínas en tampón de lisis de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas que expresan las proteínas GFP o GFP-PYL4 con extractos de proteínas de líneas transgénicas de Arabidopsis que expresan RFA1 o RFA4 etiquetadas con HA (Tabla 16). Las proteínas GFP o GFP-PYL4 fueron inmunoprecipitadas usando microperlas superparamagnéticas micro MACS acopladas a un anticuerpo monoclonal anti-GFP, siguiendo las instrucciones del fabricante para la purificación de proteínas (Miltenyi Biotec). Posteriormente, los inmunocomplejos se eluyeron en tampón Laemmli 2x, se incubaron a 95°C procesándose en gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-GFP se transfirieron a las membranas Immobilon-P (Millipore) y se sondearon con anti-HA peroxidasa para detectar los coIP de RFA1 o RFA4 marcado con HA.

**Tabla 16.** Construcciones usadas para ensayos *in vitro/in vivo*

Construcción	Plásmido	selección en bacteria	Referencia
2x35S:GFP-PYL4	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	Belda-Palazon <i>et al.</i> , 2016
35S:3HA-PYR1	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
35S:3HA-PYL4	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
35S:3HA-RFA1	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
35S:3HA-RFA4	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo
35S:3HA-RFA4ΔC	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo
35S:3HA-RFA4ΔC <sup>C361A</sup>	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo

## Ensayo de reconstitución de luciferasa dividida ('Split-LUC').

El ensayo de complementación de Split-LUC fue realizado por agroinfiltración para la expresión transitoria en *N. benthamiana*, las construcciones utilizadas para este experimento se indican en la Tabla 17. En este caso la OD<sub>660</sub> final de la solución de *A. tumefaciens* fue de 0.1. 48h después de la infiltración se aplicó MG132 a una concentración de 50 μM, en la región infiltrada, manteniéndose durante 12h. Posteriormente las hojas que coexpresan diferentes construcciones fueron examinadas para determinar la actividad de LUC y se les aplicó 1 mM de D-luciferina manteniéndose en oscuridad durante 5 minutos antes de la toma de imágenes mediante el sistema de imágenes CCD (LAS3000, Fujifilm) utilizando exposiciones de 10 minutos.

**Tabla 17.** Construcciones creadas para ensayos de Split-LUC.

Construcción	Plásmido	Selección en bacteria	Referencia
PYR1-cLUC	pDEST <sup>GW</sup> -CLUC	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
PYL4-cLUC	pDEST <sup>GW</sup> -CLUC	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
PYL8-cLUC	pDEST <sup>GW</sup> -CLUC	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
RFA1-nLUC	pDEST <sup>GW</sup> -NLUC	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
RFA4-nLUC	pDEST <sup>GW</sup> -NLUC	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo

## Análisis de vida media de PYL4 y PYR1 en Arabidopsis.

Se crecieron plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes *rfa1 rfa4* en matraces con medio líquido MS durante 10 días. Transcurrido este tiempo, el medio se suplementó con 100  $\mu$ M de CHX. Se recogieron muestras al inicio (t0), 3 horas (t3), 6 horas (t6) y 9 horas (t9). Se extrajeron también proteínas totales mediante el homogenizado de las plántulas en tampón de lisis. La concentración de proteína total se determinó mediante ensayos de Bradford y las cantidades iguales de proteínas totales fueron mezclados con laemlli 2x como tampón de carga. Las muestras, previamente incubadas a 95°C fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE y analizadas por inmunotransferencia. El anticuerpo anti-PYL4 se usó para detectar PYL4 endógeno. La actina se analizó como control de carga utilizando anticuerpos anti-actina.

Para analizar el efecto de los tratamientos con ABA tanto en hojas, como en raíces, se crecieron plántulas en matraces de Col-0 y mutantes de pérdida de función *rfa1rfa4*, en medio de MS líquido durante 10 días. Posteriormente se eliminó el medio MS sobrante de los matraces, y seguidamente se sometieron a dos tratamientos: MS (control) y MS adicionado con 50  $\mu$ M ABA. Se mantuvieron 6 horas bajo estas condiciones. Tras este tiempo se procedió a la extracción de proteínas en hojas y raíces, usando tampón de lisis tal como se ha descrito anteriormente.

## Ensayo de ubiquitinación *in vitro*.

Para la ubiquitinación *in vitro* se realizaron reacciones enzimáticas en la columna usando HA-PYR1 inmunoprecipitado como sustrato, que se unió a microcapas superparamagnéticas micro MACS acopladas al anticuerpo monoclonal anti-HA. La inmunoprecipitación de HA-PYR1 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec) utilizando extractos de líneas de Arabidopsis HA-PYR1 que contenían 600  $\mu$ g de proteína total en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Sacarosa 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EDTA 10 mM, DTT 5 mM, MG132 10  $\mu$ M y cóctel inhibidor de proteasa. El sustrato inmovilizado se incubó a 30°C durante 2 h en tampón Ubi (Tris 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 0.2 mM, ZnCl<sub>2</sub> 50 mM y ATP 5 mM) que contiene 100 ng de E1 humano (BostonBiochem), 250 ng de 6HisAtUBC8 (E2), 2  $\mu$ g de MBP-RFA1 o MBP-RFA4 $\Delta$ C y 1  $\mu$ g de ubiquitina biotinilada (Enzo Life Sciences). La reacción se detuvo lavando la columna con tampón Ubi seguido de elución con tampón Laemmli 2X. Posteriormente el sustrato eluido se

sometió a SDS-PAGE seguido de su detección utilizando estreptavidina-HRP (St-HRP) o anti-HA-HRP para detectar proteínas ubiquitinadas o etiquetadas con 3HA, respectivamente.

## Ensayo de ubiquitinación *in vivo* en *N. Benthamiana*.

Cultivos de *Agrobacterium* que contienen construcciones que expresan GFP-PYL4, GFP-RFA4 (diluido 1: 4 con respecto a los otros cultivos), GFP-UBC26 y el supresor silenciador p19 se infiltraron conjuntamente en hojas de tabaco. Las muestras control carecían de GFP-RFA4 y GFP-UBC26. Tres días después de la infiltración, las muestras se recogieron en nitrógeno líquido y se trituraron e inmediatamente se les añadió tampón de lisis suplementado con 50  $\mu$ M MG132 e inhibidores de deubiquitininasas 10 nM ubiquitina aldehído y NEM 10 mM (N-etilmaleimida). Proteínas etiquetadas con GFP fueron inmunoprecipitadas utilizando microperlas superparamagnéticas de MACS acopladas al anticuerpo monoclonal anti-GFP siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Los inmunocomplejos purificados de proteínas se eluyeron en tampón Laemmli 2x. Se mantuvieron durante 5 min a 95°C y se procesaron en gel SDS-PAGE al 10%. Los inmunoprecipitados de proteínas con anticuerpo anti-GFP se transfirieron a Immobilon-P membranas (Millipore) y fueron detectados con anticuerpos anti-GFP, anti-PYL4 y anti-Ub.

## Ensayos de degradación de proteínas *in vivo* y *semi-in vivo*.

Los ensayos de degradación de proteínas se realizaron según lo descrito por Liu *et al.*, 2010 y Zhao *et al.*, 2013. con pequeñas modificaciones. Para los experimentos de degradación de proteínas *in vivo*, cultivos de *Agrobacterium* que contiene construcciones que expresan la E3 ligasa GFP-RFA1 o GFP-RFA4 con 3HA-PYR1 ó 3HA-PYL4. Las construcciones únicas de GFP o RFP se usaron como control interno. El silenciador supresor p19 se infiltró conjuntamente en diferentes proporciones en hojas de *N. benthamiana*. Tres días después de la infiltración, se recogieron las muestras en nitrógeno líquido, y se trituraron. Inmediatamente después se añadió tampón de lisis, para la extracción de proteínas (siempre en hielo). Los homogeneizados se eliminaron por centrifugación a 14000rpm, 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para el análisis mediante inmunotransferencia de proteínas. También fueron recolectadas muestras para el análisis de ARNm de actina. La Tabla 18 muestra los oligos que se utilizaron para su amplificación y PYR1/PYL4 para asegurarnos de la igualdad de expresión de las transcripciones de PYR1/PYL4 en infiltraciones diferentes. Para los experimentos de degradación de proteínas *semi-in vivo*, expresamos RFA1-GFP, HA-PYR1 y HA-PYL4 por separado a través de diferentes agroinfiltraciones en 24 hojas de *Benthamiana*. Las muestras fueron recolectadas por separado y las proteínas fueron extraídas con tampón de lisis. Los extractos fueron aclarados por centrifugación como se

mencionó anteriormente. Se añadió ATP a los extractos a una concentración final de 25  $\mu$ M para preservar la proteólisis causada por el proteosoma 26S. Posteriormente se procedió a la mezcla de cantidades iguales de extractos de HA-PYR1 ó HA-PYL4 con extractos de proteína de Nicotiana que carecen o que contienen RFA1-GFP y se incubaron a 4°C en rotación durante 1 h con y sin MG132 a 50  $\mu$ M. Las muestras se mezclaron con tampón Laemmli 5X y se sometieron al análisis por inmunotransferencia.

**Tabla 18.** Oligos y sus secuencias para la detección de actina.

Gen	Nombre del oligo	Secuencia 5' - 3'
Actina-8	$\beta$ -actin-8F (At1g49420)	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT
	$\beta$ -actin-8R (At1g49420)	GAGGATAGCATGTGGAAGTGAGAA
Actina-1	Factin1	CATCAGGAAGGACTTGTACGG
	Ractin1	GATGGACCTGACTCGTCATAC

## Ensayos de S-acilación de proteínas.

Los ensayos de S-acilación de proteínas se realizaron según el protocolo mejorado para la determinación de la S-acilación descrito en Hurst *et al.*, 2019. Para los experimentos de S- acilación se crearon las construcciones indicadas en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Construcciones creadas para los estudios de S-acilación.

Construcción	Plásmido	selección en bacteria	Referencia
35S:3HA-RSL1	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
2X35S:GFP-RSL1	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
35S:3HA-RSL1ΔTM	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	Bueso <i>et al.</i> , 2014
2X35S:GFP-RSL1ΔTM	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
35S:3HA-RSL1 <sup>C334S</sup>	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo
2X35S:GFP-RSL1 <sup>C334S</sup>	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
35S:3HA-RSL1 <sup>C5S</sup>	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo
2X35S:GFP-RSL1 <sup>C5S</sup>	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo
35S:3HA-RSL1 <sup>C6S</sup>	pALLIGATOR2	Spec <sup>R</sup>	En este trabajo
2X35S:GFP-RSL1 <sup>C6S</sup>	pMDC43	Kan <sup>R</sup>	En este trabajo

Para la realización de las mutaciones en el sitio de S-acilación se usó el Kit de NEB <https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit#Product%20Information>. Los cambios en la proteína se realizaron sobre la construcción pCR8:RSL1 (Tabla 20) y el diseño de oligos utilizados y las condiciones de amplificación de la construcción, se realizó a través de la web <http://nebasechanger.neb.com/>.

**Tabla 20.** Oligos y sus secuencias usadas para la creación de RSL1ΔTM descritos en Bueso *et al.*, (2014a), RSL1<sup>C334S</sup> y RSL1<sup>C5S</sup>. Nucleótidos en rojo muestran el codón de Stop y en azul el sitio añadido de corte HindIII,

Amplificación	Nombre del oligo	Secuencia 5' - 3'
RSL1ΔTM	FwRSL1ΔTM	ACCATGGAGGAAGATGACCTAAA
	RvRSL1ΔTM	AAGCTTTATCCAGCATCGGCTCCACATTGG
RSL1 <sup>C334S</sup>	RSL1Cys334Ser_F	TTCTTCTGGAAGCATCAGTGTAG
	RSL1Cys334Ser_R	AGTTCAATCATGTGTTTACAC
RSL1 <sup>C5S</sup>	RSL1Cys5TMSer_F	GAGCAGCTCTTTTGTCTTTTCTTTTGGTGATAATTG
	RSL1Cys5TMSer_R	GAACCAGAAGATTGTCAAATCCAGATC

Para generar la construcción pCR8:RSL1<sup>C6S</sup> se utilizó la construcción pCR8:RSL1<sup>C334S</sup> con los oligos para RSL1<sup>C5S</sup>.

Una vez generados todas las construcciones, para la realización de ensayos de S-amilación fueron infiltradas las construcciones 3HA-RSL1, 3HA-RSL1 $\Delta$ TM, 3HA-RSL1<sup>C334S</sup> y 3HA-RSL1<sup>C5S</sup> en hojas de *N. benthamiana*, con una OD<sub>660</sub> de 0.1 y tras 72 horas, se trataban con MG132 a una concentración de 50 $\mu$ M o con tratamientos de 50 $\mu$ M de ABA durante aproximadamente 12 horas.

Las construcciones GFP-RSL1, GFP-RSL1 $\Delta$ TM, GFP-RSL1<sup>C334S</sup> y GFP-RSL1<sup>C5S</sup>, fueron usadas para ensayos de localización subcelular de estas proteínas.

## Estadísticas y análisis de colocalización.

Para comparaciones individuales se usó el test de la T-Student. Los valores obtenidos son los promedios de tres experimentos independientes  $\pm$  SD (Desviación estándar). El análisis de colocalización de fluorescencia se realizó utilizando el complemento de colocalización PSC de ImageJ (French, Mills, Swarup, Bennett, & Pridmore, 2008). Los coeficientes de correlación de Pearson (Rp) y Spearman (Rs) en el rango 0.4-1 indican colocalización, mientras que los valores más bajos indican falta de colocalización.



# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, *15*(1), 63-78. <https://doi.org/10.1105/tpc.006130>
- Addicott, F. T., Lyon, J. L., Ohkuma, K., Thiessen, W. E., Carns, H. R., Smith, O. E., ... Wareing, P. F. (1968). Abscisic acid: A new name for Abscisin II (Dormin). *Science*, *159*(3822), 1493. <https://doi.org/10.1126/science.159.3822.1493>
- Ahn, M. Y., Oh, T. R., Seo, D. H., Kim, J. H., Cho, N. H., & Kim, W. T. (2018). Arabidopsis group XIV ubiquitin-conjugating enzymes AtUBC32, AtUBC33, and AtUBC34 play negative roles in drought stress response. *Journal of Plant Physiology*, *230*, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.010>
- Alam, I., Cui, D.-L., Batool, K., Yang, Y.-Q., & Lu, Y.-H. (2019). Comprehensive Genomic Survey, Characterization and Expression Analysis of the HECT Gene Family in Brassica rapa L. and Brassica oleracea L. *Genes*, *10*(5), 400. <https://doi.org/10.3390/genes10050400>
- Andersen, P., Kragelund, B. B., Olsen, A. N., Larsen, F. H., Chua, N. H., Poulsen, F. M., & Skriver, K. (2004). Structure and biochemical function of a prototypical Arabidopsis U-box domain. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(38), 40053-40061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405057200>
- Andersen, P. L., Zhou, H., Pastushok, L., Moraes, T., McKenna, S., Ziola, B., ... Xiao, W. (2005). Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *Journal of Cell Biology*, *170*(5), 745-755. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502113>
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G. A., & Rodriguez, P. L. (2012). Selective inhibition of Clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiology*, *158*(2), 970-980. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188623>
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & León, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development*, *14*(16), 2085-9096. <https://doi.org/10.1101/gad.14.16.2085>
- Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Huang, Y. T., Su, C. L., & Chiou, T. J. (2006). pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiology*, *141*(3), 1000-1011. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078063>
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M. J., & Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends in Plant Science*, Vol. 6, pp. 354-358. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01960-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01960-4)
- Baek, D., Kim, M. C., Kumar, D., Park, B., Cheong, M. S., Choi, W., ... Yun, D.-J. (2019). AtPR5K2, a PR5-Like Receptor Kinase, Modulates Plant Responses to Drought Stress

## BIBLIOGRAFÍA

- by Phosphorylating Protein Phosphatase 2Cs. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01146>
- Baena-González, E. (2010, marzo 1). Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular Plant*, Vol. 3, pp. 300-313. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp113>
- Bahmani, R., Kim, D. G., Lee, B. D., & Hwang, S. (2017). Over-expression of tobacco UBC1 encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Molecular Biology*, 94(4-5), 433-451. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0616-6>
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., & Scheible, W. R. (2006a). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141(3), 988-999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707>
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., & Scheible, W. R. (2006b). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141(3), 988-999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707>
- Bates, P. W., & Vierstra, R. D. (1999). UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin-protein ligases from *Arabidopsis thaliana* related to the HECT-domain protein family. *Plant Journal*, 20(2), 183-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00590.x>
- Batistič, O., Rehers, M., Akerman, A., Schlücking, K., Steinhorst, L., Yalovsky, S., & Kudla, J. (2012). S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Research*, 22(7), 1155-1168. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.71>
- Batistič, O., Sorek, N., Schültke, S., Yalovsky, S., & Kudla, J. (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca21 signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(5), 1346-1362. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058123>
- Beckman, J. S. (1994). Peroxynitrite versus Hydroxyl Radical: The Role of Nitric Oxide in Superoxide-Dependent Cerebral Injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738(1), 69-75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21791.x>
- Belda-Palazon, B., Gonzalez-Garcia, M. P., Lozano-Juste, J., Coego, A., Antoni, R., Julian, J., ... Rodriguez, P. L. (2018). PYL8 mediates ABA perception in the root through non-cell-autonomous and ligand-stabilization-based mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(50), E11857-E11863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815410115>
- Belda-Palazon, B., Julian, J., Coego, A., Wu, Q., Zhang, X., Batistic, O., ... Rodriguez, P. L. (2019). ABA inhibits myristoylation and induces shuttling of the RGLG1 E3 ligase to promote nuclear degradation of PP2CA. *Plant Journal*, 98(5), 813-825.

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://doi.org/10.1111/tpj.14274>
- Belda-Palazon, B., Rodriguez, L., Fernandez, M. A., Castillo, M. C., Anderson, E. M., Gao, C., ... Rodriguez, P. L. (2016). FYVE1/FREE1 interacts with the PYL4 ABA receptor and mediates its delivery to the vacuolar degradation pathway. *Plant Cell*, *28*(9), 2291-2311. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00178>
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., ... Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, *7*(10), e46907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J., & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated *ABI5* allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters*, *561*(1-3), 127-131. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00148-6)
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., ... Hellmann, H. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *47*(4), 591-603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02810.x>
- Bernhardt, A., Mooney, S., & Hellmann, H. (2010). *Arabidopsis* DDB1a and DDB1b are critical for embryo development. *Planta*, *232*(3), 555-566. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1195-9>
- Bhaskara, G. B., Wen, T. N., Nguyen, T. T., & Verslues, P. E. (2017). Protein phosphatase 2Cs and microtubule-associated stress protein 1 control microtubule stability, plant growth, and drought response. *Plant Cell*, *29*(1), 169-191. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00847>
- Bi, C., Ma, Y., Wang, X.-F., & Zhang, D.-P. (2017). Overexpression of the transcription factor NF-YC9 confers abscisic acid hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, *95*(4-5), 425-439. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0661-1>
- Blaskovic, S., Adibekian, A., Blanc, M., & Van Der Goot, G. F. (2014, mayo 1). Mechanistic effects of protein palmitoylation and the cellular consequences thereof. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 180, pp. 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.001>
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Laurière, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(40), 41758-41766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405259200>
- Bueso, E., Ibañez, C., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., Gonzalez-Guzmán, M., Rodriguez, P. L., & Serrano, R. (2014). A forward genetic approach in *Arabidopsis thaliana* identifies a RING-type ubiquitin ligase as a novel determinant of seed longevity. *Plant Science*, *215-216*, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.004>

## BIBLIOGRAFÍA

- Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., ... Rodriguez, P. L. (2014). The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant Journal*, *80*(6), 1057-1071. <https://doi.org/10.1111/tpj.12708>
- Cai, Z., Liu, J., Wang, H., Yang, C., Chen, Y., Li, Y., ... Wang, X. (2014). GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(26), 9651-9656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316717111>
- Callis, J., & Vierstra, R. (1989). Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants. *Oxford Surveys in Plant Mol. Biol*, *6*, 1-30. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302703654>
- Callis, Judy. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The Arabidopsis Book*, *12*, e0174. <https://doi.org/10.1199/tab.0174>
- Cao, Y., Dai, Y., Cui, S., & Ma, L. (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of Flowering Locus C regulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell*, *20*(10), 2586-2602. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062760>
- Capili, A. D., Edghill, E. L., Wu, K., & Borden, K. L. B. (2004). Structure of the C-terminal RING finger from a RING-IBR-RING/TRIAD motif reveals a novel zinc-binding domain distinct from a RING. *Journal of Molecular Biology*, *340*(5), 1117-1129. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.035>
- Castillo, M. C., Lozano-Juste, J., González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Rodríguez, P. L., & León, J. (2015). Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling*, *8*(392), 1-10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7981>
- Chamovitz, D. A., Wei, N., Osterlund, M. T., Von Arnim, A. G., Staub, J. M., Matsui, M., & Deng, X. W. (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, *86*(1), 115-121. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80082-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80082-3)
- Chaugule, V. K., Burchell, L., Barber, K. R., Sidhu, A., Leslie, S. J., Shaw, G. S., & Walden, H. (2011). Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO Journal*, *30*(14), 2853-2867. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.204>
- Chen, H. H., Qu, L., Xu, Z. H., Zhu, J. K., & Xue, H. W. (2018). EL1-like Casein Kinases Suppress ABA Signaling and Responses by Phosphorylating and Destabilizing the ABA Receptors PYR/PYLs in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *11*(5), 706-719. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.012>
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., ... Deng, X. W. (2006). Arabidopsis CULLIN4 forms an E3 ubiquitin ligase with RBX1 and the CDD complex in mediating

## BIBLIOGRAFÍA

- light control of development. *Plant Cell*, 18(8), 1991-2004. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043224>
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 62, pp. 25-54. <https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
- Chen, Q., Zhong, Y., Wu, Y., Liu, L., Wang, P., Liu, R., ... Xie, Q. (2016). HRD1-mediated ERAD tuning of ER-bound E2 is conserved between plants and mammals. *Nature Plants*, 2(7), 1-7. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.94>
- Chen, Z., Grefen, C., Donald, N., Hills, A., & Blatt, M. R. (2011). A bicistronic, Ubiquitin-10 promoter-based vector cassette for transient transformation and functional analysis of membrane transport demonstrates the utility of quantitative voltage clamp studies on intact Arabidopsis root epidermis. *Plant, Cell and Environment*, 34(4), 554-564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02262.x>
- Cheng, M.-C., Kuo, W.-C., Wang, Y.-M., Chen, H.-Y., & Lin, T.-P. (2017). UBC18 mediates ERF1 degradation under light-dark cycles. *New Phytologist*, 213(3), 1156-1167. <https://doi.org/10.1111/nph.14272>
- Cheng, M. C., Hsieh, E. J., Chen, J. H., Chen, H. Y., & Lin, T. P. (2012). Arabidopsis RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiology*, 158(1), 363-375. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189738>
- Chiu, J., March, P. E., Lee, R., & Tillett, D. (2004). Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic acids research*, 32(21), e174. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh172>
- Choi, C. M., Gray, W. M., Mooney, S., & Hellmann, H. (2014). Composition, Roles, and Regulation of Cullin-based Ubiquitin E3 Ligases. *The Arabidopsis Book*, 17. <https://doi.org/10.1199/tab.0175>
- Choi, H. I., Hong, J. H., Ha, J. O., Kang, J. Y., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1723-1730. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1723>
- Chung, E., Cho, C.-W., So, H.-A., Kang, J.-S., Chung, Y. S., & Lee, J.-H. (2013). Overexpression of VrUBC1, a Mung Bean E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Enhances Osmotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 8(6), e66056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066056>
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L., & Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), 1365-1368. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1365>

## BIBLIOGRAFÍA

- Clague, M. J., Barsukov, I., Coulson, J. M., Liu, H., Rigden, D. J., & Urbé, S. (2013). Deubiquitylases from genes to organism. *Physiological Reviews*, *93*(3), 1289-1315. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2013>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *16*(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Cohen, I., Wiener, R., Reiss, Y., & Ravid, T. (2015). Distinct activation of an E2 ubiquitin-conjugating enzyme by its cognate E3 ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(7), E625-E632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415621112>
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 58, pp. 453-508. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.002321>
- Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G., & Wareing, P. F. (1965). Chemistry and physiology of «dormins» in sycamore: Identity of sycamore «dormin» with abscisin II. *Nature*, *205*(4978), 1269-1270. <https://doi.org/10.1038/2051269b0>
- Cracker, L. E., & Abeles, F. B. (1969). Abscission: Role of Absciscic Acid. *Plant Physiology*, *44*(8), 1144-1149. <https://doi.org/10.1104/pp.44.8.1144>
- Creelman, R. A., Gage, D. A., Stults, J. T., & Zeevaart, J. A. D. (1987). Absciscic Acid Biosynthesis in Leaves and Roots of *Xanthium strumarium*. *Plant Physiology*, *85*(3), 726-732. <https://doi.org/10.1104/pp.85.3.726>
- Crow, J. P., & Beckman, J. S. (1995). Reactions between Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: Footprints of Peroxynitrite in Vivo. *Advances in Pharmacology*, *34*(C), 17-43. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)61079-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)61079-0)
- Cui, F., Liu, L., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Q., Lin, B., ... Xie, Q. (2012). Arabidopsis ubiquitin conjugase UBC32 is an ERAD component that functions in brassinosteroid-mediated salt stress tolerance. *Plant Cell*, *24*(1), 233-244. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093062>
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. En *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W. R. (2005, septiembre 1). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 139, pp. 5-17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. W., & Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO Journal*, *15*(24), 6798-

## BIBLIOGRAFÍA

6809. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01071.x>
- Deblaere, R., Bytebier, B., de Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, *13*(13), 4777-4788. <https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4777>
- Del Pozo, J. C., & Estelle, M. (1999). The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15342-15347. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15342>
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Bedu, M., ... Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, *8*(9), 864-870. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>
- Dietrich, D., Pang, L., Kobayashi, A., Fozard, J. A., Boudolf, V., Bhosale, R., ... Bennett, M. J. (2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants*, *3*(6), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.57h>, D., Pang, L., Kobayashi, A., Fozard, J. A., Boudolf, V., Bhosale, R., ... Bennett, M. J. (2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants*, *3*(6), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.57>
- Ding, Y., Lv, J., Shi, Y., Gao, J., Hua, J., Song, C., ... Yang, S. (2019). EGR 2 phosphatase regulates OST 1 kinase activity and freezing tolerance in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, *38*(1). <https://doi.org/10.15252/embj.201899819>
- Dittrich, M., Mueller, H. M., Bauer, H., Peirats-Llobet, M., Rodriguez, P. L., Geilfus, C. M., ... Hedrich, R. (2019). The role of Arabidopsis ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature Plants*, *5*(9), 1002-1011. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0490-0>
- Dove, K. K., Olszewski, J. L., Martino, L., Duda, D. M., Wu, X. S., Miller, D. J., ... Klevit, R. E. (2017). Structural Studies of HHARI/UbcH7~Ub Reveal Unique E2~Ub Conformational Restriction by RBR RING1. *Structure*, *25*(6), 890-900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.013>
- Dove, K. K., Stieglitz, B., Duncan, E. D., Rittinger, K., & Klevit, R. E. (2016). Molecular insights into RBR E3 ligase ubiquitin transfer mechanisms. *EMBO reports*, *17*(8), 1221-1235. <https://doi.org/10.15252/embr.201642641>
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, *19*: 11-15.
- Downes, B. P., Stupar, R. M., Gingerich, D. J., & Vierstra, R. D. (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant Journal*, *35*(6), 729-742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01844.x>

## BIBLIOGRAFÍA

- Duda, D. M., Borg, L. A., Scott, D. C., Hunt, H. W., Hammel, M., & Schulman, B. A. (2008). Structural Insights into NEDD8 Activation of Cullin-RING Ligases: Conformational Control of Conjugation. *Cell*, *134*(6), 995-1006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.022>
- Duda, D. M., Olszewski, J. L., Schuermann, J. P., Kurinov, I., Miller, D. J., Nourse, A., ... Schulman, B. A. (2013). Structure of HHARI, a RING-IBR-RING ubiquitin ligase: Autoinhibition of an Ariadne-family E3 and insights into ligation mechanism. *Structure*, *21*(6), 1030-1041. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.04.019>
- Dupeux, F., Santiago, J., Betz, K., Twycross, J., Park, S. Y., Rodriguez, L., ... Márquez, J. A. (2011). A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO Journal*, *30*(20), 4174-4184. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.294>
- Eagles, C. F., & Wareing, P. F. (1963). Dormancy regulators in woody plants: Experimental induction of dormancy in *Betula pubescens*. *Nature*, *199*(4896), 874-875. <https://doi.org/10.1038/199874a0>
- Eifler, K. (2010). *The PHO2 family of ubiquitin conjugating enzymes in Arabidopsis thaliana and its contribution to plant programmed cell death*. University of Koln.
- Elmehdawi, F., Wheway, G., Szymanska, K., Adams, M., High, A. S., Johnson, C. A., & Robinson, P. A. (2013). Human Homolog of Drosophila Ariadne (HHARI) is a marker of cellular proliferation associated with nuclear bodies. *Experimental Cell Research*, *319*(3), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.10.002>
- Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerström, M., & Rask, L. (2000). Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant Journal*, *24*(1), 57-66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00857.x>
- Fares, A., Rossignol, M., & Peltier, J.-B. (2011). Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *416*(3-4), 331-336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.036>
- Feussner, K., Feussner, I., Leopold, I., & Wasternack, C. (1997). Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato - the first stress-induced UBC of higher plants <sup>1</sup> <sup>2</sup>. *FEBS Letters*, *409*(2), 211-215. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00509-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00509-7)
- Finkelstein, R., Lynch, T., Reeves, W., Petitfils, M., & Mostachetti, M. (2011). Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally. *Journal of Experimental Botany*, *62*(11), 3971-3979. <https://doi.org/10.1093/jxb/err093>
- Finkelstein, R. R. (1994). Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *105*(4), 1203-1208.

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1203>
- Finkelstein, Ruth R., Li Wang, M., Lynch, T. J., Rao, S., & Goodman, H. M. (1998). The arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell*, *10*(6), 1043-1054. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.1043>
- Finkelstein, Ruth R., & Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, *12*(4), 599-609. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.599>
- Forrester, M. T., Hess, D. T., Thompson, J. W., Hultman, R., Moseley, M. A., Stamler, J. S., & Casey, P. J. (2011). Site-specific analysis of protein S-acylation by resin-assisted capture. *Journal of Lipid Research*, *52*(2), 393-398. <https://doi.org/10.1194/jlr.D011106>
- French, A. P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M. J., & Pridmore, T. P. (2008). Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols*, *3*(4), 619-628. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.31>
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., & Schweighofer, A. (2013, enero). Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal*, Vol. 280, pp. 681-693. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x>
- Fuchs, S., Tischer, S. V., Wunschel, C., Christmann, A., & Grill, E. (2014). Abscisic acid sensor RCAR7/PYL13, specific regulator of protein phosphatase coreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15), 5741-5746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322085111>
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., ... Zhu, J. K. (2009). In vitro Reconstitution of an ABA Signaling Pathway. *Nature*, *462*(7273), 660-664. <https://doi.org/10.1038/nature08599>
- Fujii, H., Verslues, P. E., & Zhu, J. K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, *19*(2), 485-494. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048538>
- Fujii, H., & Zhu, J. K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8380-8385. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903144106>
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, *17*(12), 3470-3488. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035659>
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of

## BIBLIOGRAFÍA

- abscisic acid signaling in response to water stress in arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2123-2132. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp147>
- Fülöp, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horváth, G., Kevei, Z., Nikovics, K., ... Kondorosi, E. (2005). Arabidopsis anaphase-promoting complexes: Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle*, 4(8), 4084-4092. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1856>
- Galan, J. M., & Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO Journal*, 16(19), 5847-5854. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5847>
- García-Andrade, J., González, B., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, P. L., & Vera, P. (2020). The Role of ABA in Plant Immunity is Mediated through the PYR1 Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5852. <https://doi.org/10.3390/ijms21165852>
- García-León, M., Cuyas, L., Abd El-Moneim, D., Rodriguez, L., Belda-Palazón, B., Sanchez-Quant, E., ... Rubio, V. (2019). Arabidopsis ALIX regulates stomatal aperture and turnover of abscisic acid receptors. *Plant Cell*, 31(10), 2411-2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00399>
- Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., & Aasland, R. (1998, julio 30). FYVE fingers bind PtdIns(3)P [5]. *Nature*, Vol. 394, pp. 432-433. <https://doi.org/10.1038/28767>
- Gehl, C., Kaufholdt, D., Hamisch, D., Bikker, R., Kudla, J., Mendel, R. R., & Hänsch, R. (2011). Quantitative analysis of dynamic protein-protein interactions in planta by a floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors. *Plant Journal*, 67(3), 542-553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04607.x>
- Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R. R., & Hänsch, R. (2009). New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Plant*, 2(5), 1051-1058. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp040>
- Genschik, P., Sumara, I., & Lechner, E. (2013, agosto 28). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): Cellular functions and disease implications. *EMBO Journal*, Vol. 32, pp. 2307-2320. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.173>
- Gingerich, D. J., Gagne, J. M., Salter, D. W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., & Vierstra, R. D. (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18810-18821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413247200>
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., & Goodman, H. M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell*, 4(10), 1251-1261.

<https://doi.org/10.2307/3869411>

- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., ... Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: Experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant Journal*, *55*(3), 526-542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03510.x>
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., ... Rodríguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell*, *14*(8), 1833-1846. <https://doi.org/10.1105/tpc.002477>
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G. W., ... Rodriguez, P. L. (2012). Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell*, *24*(6), 2483-2496. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098574>
- Gray, W. M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2002). Role of the Arabidopsis RING-H2 Protein RBX1 in RUB Modification and SCF Function. *The Plant Cell*, *14*, 2137-2144. <https://doi.org/10.1105/tpc.003178>
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal*, *64*(2), 355-365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x>
- Grisvard, J., Aubusson-Fleury, A., & Baroin-Tourancheau, A. (2010). Multiple uses of Lys63-polyubiquitination in the ciliate *Sterkiella histriomuscorum*. *Protist*, *161*(3), 479-488. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.01.004>
- Haas, A. L., & Rose, I. A. (1982). The Mechanism of Ubiquitin Activating Enzyme A KINETIC AND EQUILIBRIUM ANALYSIS\*. En *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 257).
- Haas, A. L., Warme, J. V. B., & Rose, I. A. (1983a). Ubiquitin Adenylate: Structure and Role in Ubiquitin Activation. *Biochemistry*, *22*(19), 4388-4394. <https://doi.org/10.1021/bi00288a007>
- Haas, A. L., Warme, J. V. B., & Rose, I. A. (1983b). Ubiquitin Adenylate: Structure and Role in Ubiquitin Activation. *Biochemistry*, *22*(19), 4388-4394. <https://doi.org/10.1021/bi00288a007>
- Haglund, K., Di Fiore, P. P., & Dikic, I. (2003, noviembre 1). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 28, pp. 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.09.005>
- Halford, N. G., Boulyz, J. P., & Thomas, M. (2000, enero 1). SNF1-related protein kinases

## BIBLIOGRAFÍA

- (SnRKs) — Regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Advances in Botanical Research*, Vol. 32, pp. 405-434. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)32031-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)32031-6)
- Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., ... Yan, N. (2011). The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. *Molecular Cell*, 42(5), 662-672. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.011>
- Hatfield, P. M., Gosink, M. M., Carpenter, T. B., & Vierstra, R. D. (1997). The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 11(2), 213-226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11020213.x>
- He, X., Zhu, L., Xu, L., Guo, W., & Zhang, X. (2016). GhATAF1, a NAC transcription factor, confers abiotic and biotic stress responses by regulating phytohormonal signaling networks. *Plant Cell Reports*, 35(10), 2167-2179. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2027-6>
- He, Y., Hao, Q., Li, W., Yan, C., Yan, N., & Yin, P. (2014). Identification and characterization of ABA receptors in *Oryza sativa*. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095246>
- He, Y. J., McCall, C. M., Hu, J., Zeng, Y., & Xiong, Y. (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes and Development*, 20(21), 2949-2954. <https://doi.org/10.1101/gad.1483206>
- Hemberg, T. (1949a). Growth-Inhibiting Substances in Terminal Buds of *Fraxinus*. *Physiologia Plantarum*, 2(1), 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1949.tb07646.x>
- Hemberg, T. (1949b). Significance of Growth-Inhibiting Substances and Auxins for the Rest-Period of the Potato Tuber. *Physiologia Plantarum*, 2(1), 24-36. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1949.tb07645.x>
- Hemsley, P. A. (2017, junio 1). An outlook on protein S-acylation in plants: What are the next steps? *Journal of Experimental Botany*, Vol. 68, pp. 3155-3164. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw497>
- Hemsley, P. A., Weimar, T., Lilley, K. S., Dupree, P., & Grierson, C. S. (2013). A proteomic approach identifies many novel palmitoylated proteins in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 197(3), 805-814. <https://doi.org/10.1111/nph.12077>
- Herhaus, L., & Dikic, I. (2015). Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO reports*, 16(9), 1071-1083. <https://doi.org/10.15252/embr.201540891>
- Higa, L., & Zhang, H. (2007, febrero 6). Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Division*, Vol. 2, p. 5. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-5>

## BIBLIOGRAFÍA

- Hong, M. J., & Seo, Y. W. (2014). A potential role of UBC28 interacting RING finger protein TaRF1 in spike development of wheat. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(4), 421-429. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0227-5>
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J. P., Hanafey, M. K., Tingey, S. V., & Chua, N. H. (2002). Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science*, 115(24), 4891-4900. <https://doi.org/10.1242/jcs.00175>
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., ... Harmon, A. C. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132(2), 666-680. <https://doi.org/10.1104/pp.102.011999>
- Hristova, V. A., Beasley, S. A., Rylett, R. J., & Shaw, G. S. (2009). Identification of a novel Zn<sup>2+</sup>-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 14978-14986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808700200>
- Hu, J., McCall, C. M., Ohta, T., & Xiong, Y. (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nature Cell Biology*, 6(10), 1003-1009. <https://doi.org/10.1038/ncb1172>
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J. W., ... Shi, Y. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, 111(7), 1041-1054. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01199-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01199-6)
- Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 299-334. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112256>
- Huang, Y., Li, C. Y., Qi, Y., Park, S., & Gibson, S. I. (2014). SIS8, a putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates sugar-resistant seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 77(4), 577-588. <https://doi.org/10.1111/tpj.12404>
- Hurst, C. H., Turnbull, D., & Hemsley, P. A. (2019). Determination of protein S-acylation state by enhanced Acyl-switch methods. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2009, pp. 3-11). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9532-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9532-5_1)
- Hwang, J.-U., Yim, S., Do, T. H. T., Kang, J., & Lee, Y. (2018). *Arabidopsis thaliana* Raf22 protein kinase maintains growth capacity during postgerminative growth arrest under stress. *Plant, Cell & Environment*, 41(7), 1565-1578. <https://doi.org/10.1111/pce.13199>
- Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., ... Dikic, I. (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- $\kappa$ B activity and apoptosis. *Nature*, 471(7340), 637-641. <https://doi.org/10.1038/nature09814>
- Imai, Y., Soda, M., & Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-

## BIBLIOGRAFÍA

- induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35661-35664. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000447200>
- Imura, Y., Molho, M., Chuang, C., & Nagy, P. D. (2015). Cellular Ubc2/Rad6 E2 ubiquitin-conjugating enzyme facilitates tombusvirus replication in yeast and plants. *Virology*, 484, 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.022>
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 377-403. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>
- Irigoyen, M. L., Iniesto, E., Rodriguez, L., Puga, M. I., Yanagawa, Y., Pick, E., ... Rubio, V. (2014). Targeted degradation of abscisic acid receptors is mediated by the ubiquitin ligase substrate adaptor DDA1 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26(2), 712-728. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122234>
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 43(2), 134-144. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<134::AID-PROT1025>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<134::AID-PROT1025>3.0.CO;2-I)
- Jeon, E. H., Pak, J. H., Kim, M. J., Kim, H. J., Shin, S. H., Lee, J. H., ... Chung, Y. S. (2012). Ectopic expression of ubiquitin-conjugating enzyme gene from wild rice, OgUBC1, confers resistance against UV-B radiation and Botrytis infection in Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(2), 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.048>
- Julian, J., Coego, A., Lozano-Juste, J., Lechner, E., Wu, Q., Zhang, X., ... Rodriguez, P. L. (2019). The MATH-BTB BPM3 and BPM5 subunits of Cullin3-RING E3 ubiquitin ligases target PP2CA and other clade A PP2Cs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(31), 15725-15734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908677116>
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., ... Youle, R. J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Cell Biology*, 205(2), 143-153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402104>
- Katsuta, S., Masuda, G., Bak, H., Shinozawa, A., Kamiyama, Y., Umezawa, T., ... Sakata, Y. (2020). Arabidopsis Raf-like kinases act as positive regulators of subclass III SnRK2 in osmostress signaling. *The Plant Journal*, tpj.14756. <https://doi.org/10.1111/tpj.14756>
- Kazlauskaite, A., Kelly, V., Johnson, C., Baillie, C., Hastie, C. J., Peggie, M., ... Muqit, M. M. K. (2014). Phosphorylation of parkin at serine65 is essential for activation: Elaboration of a miro1 substrate-based assay of parkin E3 ligase activity. *Open Biology*, 4(MARCH). <https://doi.org/10.1098/rsob.130213>
- Kee, Y., & Huibregtse, J. M. (2007, marzo 9). Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 354, pp.

## BIBLIOGRAFÍA

- 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.025>
- Kellsall, I. R., Duda, D. M., Olszewski, J. L., Hofmann, K., Knebel, A., Langevin, F., ... Alpi, A. F. (2013). TRIAD1 and HHARI bind to and are activated by distinct neddylated Cullin-RING ligase complexes. *The EMBO Journal*, *32*(21), 2848-2860. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.209>
- Kerchev, P. I., Pellny, T. K., Vivancos, P. D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S., ... Foyer, C. H. (2011). The transcription factor ABI4 is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Cell*, *23*(9), 3319-3334. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090100>
- Kim, D. Y., Scalf, M., Smith, L. M., & Vierstra, R. D. (2013). Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(5), 1523-1540. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108613>
- Kim, H. C., & Huibregtse, J. M. (2009). Polyubiquitination by HECT E3s and the Determinants of Chain Type Specificity. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(12), 3307-3318. <https://doi.org/10.1128/mcb.00240-09>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., ... Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605-608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in Arabidopsis thaliana L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Molecular Biology*, *25*(5), 791-798. <https://doi.org/10.1007/BF00028874>
- Kleiger, G., Saha, A., Lewis, S., Kuhlman, B., & Deshaies, R. J. (2009). Rapid E2-E3 Assembly and Disassembly Enable Processive Ubiquitylation of Cullin-RING Ubiquitin Ligase Substrates. *Cell*, *139*(5), 957-968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.030>
- Kline, K. G., Barrett-Wilt, G. A., & Sussman, M. R. (2010). In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(36), 15986-15991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007879107>
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C. M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*, *61*(3), 377-383. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06343.x>
- Koornneef, Maarten, Hanhart, C. J., Hilhorst, H. W. M., & Karssen, C. M. (1989). In Vivo Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Abscisic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, *90*(2), 463-469. <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.463>

## BIBLIOGRAFÍA

- Kowarschik, K., Hoehenwarter, W., Marillonnet, S., & Trujillo, M. (2018). UbiGate: a synthetic biology toolbox to analyse ubiquitination. *New Phytologist*, 217(4), 1749-1763. <https://doi.org/10.1111/nph.14900>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, 510(7503), 162-166. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Kraft, E., Stone, S. L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O. S., ... Callis, J. (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(4), 1597-1611. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067983>
- Kuhn, J. M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M. B., Maktabi, M. H., & Schroeder, J. I. (2006). The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiology*, 140(1), 127-139. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070318>
- Kumar, A., Chaugule, V. K., Condos, T. E. C., Barber, K. R., Johnson, C., Toth, R., ... Walden, H. (2017). Parkin-phosphoubiquitin complex reveals cryptic ubiquitin-binding site required for RBR ligase activity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(5), 475-483. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3400>
- Kumar, M., Wightman, R., Atanassov, I., Gupta, A., Hurst, C. H., Hemsley, P. A., & Turner, S. (2016). S-acylation of the cellulose synthase complex is essential for its plasma membrane localization. *Science*, 353(6295), 166-169. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4009>
- Laby, R. J., Kincaid, M. S., Kim, D., & Gibson, S. I. (2000). The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant Journal*, 23(5), 587-596. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00833.x>
- Lang-Mladek, C., Xie, L., Nigam, N., Chumak, N., Binkert, M., Neubert, S., & Hauser, M. T. (2012). UV-B signaling pathways and fluence rate dependent transcriptional regulation of ARIADNE12. *Physiologia Plantarum*, 145(4), 527-539. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01561.x>
- Lange, O. F., Lakomek, N. A., Farès, C., Schröder, G. F., Walter, K. F. A., Becker, S., ... De Groot, B. L. (2008). Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science*, 320(5882), 1471-1475. <https://doi.org/10.1126/science.1157092>
- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., ... Genschik, P. (2011). MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental Cell*, 21(6), 1116-1128. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.018>
- Lechner, Esther, Xie, D., Grava, S., Pigaglio, E., Planchais, S., Murray, J. A. H., ... Genschik, P.

## BIBLIOGRAFÍA

- (2002). The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 50069-50080. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204254200>
- Lechtenberg, B. C., Rajput, A., Sanishvili, R., Dobaczewska, M. K., Ware, C. F., Mace, P. D., & Riedl, S. J. (2016). Structure of a HOIP/E2~ubiquitin complex reveals RBR E3 ligase mechanism and regulation. *Nature*, 529(7587), 546-550. <https://doi.org/10.1038/nature16511>
- Lee, J. H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J. B. F., Yoon, H. J., Chen, H., ... Deng, X. W. (2008). Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell*, 20(1), 152-167. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055418>
- Lee, S. J., Lee, M. H., Kim, J. Il, & Kim, S. Y. (2015). Arabidopsis putative MAP kinase kinases raf10 and raf11 are positive regulators of seed dormancy and ABA response. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 84-97. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu148>
- Leitner, J., Petrášek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Pařezová, M., Korbei, B., ... Luschnig, C. (2012). Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8322-8327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200824109>
- Lemmon, M. A. (2008, febrero). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 9, pp. 99-111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>
- Leonhardt, N., Kwak, J. M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., & Schroeder, J. I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell*, 16(3), 596-615. <https://doi.org/10.1105/tpc.019000>
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P. C., Guerrier, D., Cheddor, F., & Giraudat, J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264(5164), 1448-1452. <https://doi.org/10.1126/science.7910981>
- Leung, J., Merlot, S., & Giraudat, J. (1997). The arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9(5), 759-771. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.5.759>
- Li, D., Zhang, L., Li, X., Kong, X., Wang, X., Li, Y., ... Yang, Y. (2018). AtRAE1 is involved in degradation of ABA receptor RCAR1 and negatively regulates ABA signalling in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, 41(1), 231-244. <https://doi.org/10.1111/pce.13086>

## BIBLIOGRAFÍA

- Li, J., & Assmann, S. M. (1996). An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *The Plant Cell*, 8(12), 2359-2368. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.12.2359>
- Li, Jie, Wen, R., Andersen, P., Liang, Y., Li, Q., Xiao, W., & Cui, Z. (2010). Zebrafish Ubc13 is required for Lys63-linked polyubiquitination and DNA damage tolerance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 343(1-2), 173-182. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0511-9>
- Li, Wenfeng, & Schmidt, W. (2010). A lysine-63-linked ubiquitin chain-forming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Journal*, 62(2), 330-343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04150.x>
- Li, Wenqi, Wang, L., Sheng, X., Yan, C., Zhou, R., Hang, J., ... Yan, N. (2013). Molecular basis for the selective and ABA-independent inhibition of PP2CA by PYL13. *Cell Research*, 23(12), 1369-1379. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.143>
- Li, Xiaoyi, Kong, X., Huang, Q., Zhang, Q., Ge, H., Zhang, L., ... Yang, Y. (2019). CARK1 phosphorylates subfamily III members of ABA receptors. *Journal of Experimental Botany*, 70(2), 519-528. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery374>
- Li, Xu, Chang, Y., Ma, S., Shen, J., Hu, H., & Xiong, L. (2019). Genome-Wide Identification of SNAC1-Targeted Genes Involved in Drought Response in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 10, 982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00982>
- Li, Y., Zhang, L., Li, D., Liu, Z., Wang, J., Li, X., & Yang, Y. (2016). The Arabidopsis F-box E3 ligase RIFP1 plays a negative role in abscisic acid signalling by facilitating ABA receptor RCAR3 degradation. *Plant Cell and Environment*, 39(3), 571-582. <https://doi.org/10.1111/pce.12639>
- Lin, Q., Wu, F., Sheng, P., Zhang, Z., Zhang, X., Guo, X., ... Wan, J. (2015). The SnRK2-APC/CTE regulatory module mediates the antagonistic action of gibberellic acid and abscisic acid pathways. *Nature Communications*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8981>
- Lin, Z., Li, Y., Zhang, Z., Liu, X., Hsu, C. C., Du, Y., ... Wang, P. (2020). A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14477-9>
- Liu, H., & Stone, S. L. (2010). Abscisic acid increases Arabidopsis ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *Plant Cell*, 22(8), 2630-2641. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076075>
- Liu, L., Zhang, Y., Tang, S., Zhao, Q., Zhang, Z., Zhang, H., ... Xie, Q. (2010). An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, 61(5), 893-903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04109.x>

## BIBLIOGRAFÍA

- Liu, T. Y., Huang, T. K., Tseng, C. Y., Lai, Y. S., Lin, S. I., Lin, W. Y., ... Chioua, T. J. (2012). PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(5), 2168-2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096636>
- Liu, W., Tang, X., Qi, X., Fu, X., Ghimire, S., Ma, R., ... Si, H. (2020, abril 2). The ubiquitin conjugating enzyme: An important ubiquitin transfer platform in ubiquitin-proteasome system. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21, p. 2894. <https://doi.org/10.3390/ijms21082894>
- Liu, Y. C., Wu, Y. R., Huang, X. H., Sun, J., & Xie, Q. (2011). AtPUB19, a U-Box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*, 4(6), 938-946. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr030>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. *METHODS*, 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., & Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4782-4787. <https://doi.org/10.1073/pnas.081594298>
- Lopez-Molina, Luis, & Chua, N. H. (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 41(5), 541-547. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.5.541>
- Lopez-Molina, Luis, Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T., & Chua, N. H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal*, 32(3), 317-328. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01430.x>
- Lozano-Juste, J., & León, J. (2010). Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. *Plant Signaling and Behavior*, 5(3), 314-316. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.11235>
- Luan, S. (2003, noviembre 28). Protein Phosphatases in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 54, pp. 63-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743>
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- Malik, S. I., Hussain, A., Yun, B.-W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2011). GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science*, 181(5), 540-544. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.004>
- Manzano, C., Abraham, Z., López-Torrejón, G., & Del Pozo, J. C. (2008). Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 68(1-2), 145-158.

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9358-9>
- Maor, R., Jones, A., Nühse, T. S., Studholme, D. J., Peck, S. C., & Shirasu, K. (2007). Multidimensional protein identification technology (Mud(PIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(4), 601-610. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600408-MCP200>
- Marín, I. (2010). Diversification and specialization of plant RBR ubiquitin ligases. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011579>
- Marín, I. (2013). Evolution of Plant HECT Ubiquitin Ligases. *PLoS ONE*, 8(7), e68536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068536>
- Marín, I., & Ferrúst, A. (2002). Comparative genomics of the RBR family, including the Parkinson's disease-related gene parkin and the genes of the ariadne subfamily. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2039-2050. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004029>
- Marín, I., Lucas, J. I., Gradilla, A.-C., & Ferrú, A. (2004). and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases. *Physiol Genomics*, 17, 253-263. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00226.2003.-Mutations>
- Maruyama, M., Ikeuchi, T., Saito, M., Ishikawa, A., Yuasa, T., Tanaka, H., ... Tsuji, S. (2000). Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, and possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Annals of Neurology*, 48(2), 245-250. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200008\)48:2<245::AID-ANA15>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200008)48:2<245::AID-ANA15>3.0.CO;2-2)
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A., Guerra, D., Di Fonzo, N., ... Mastrangelo, A. (2006). The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics*, 7(8), 509-522. <https://doi.org/10.2174/138920206779315728>
- McCarty, D. R. (1995). Genetic Control and Integration of Maturation and Germination Pathways in Seed Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46(1), 71-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.000443>
- Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., & Kaiser, P. (2008). Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 7(10), 4566-4576. <https://doi.org/10.1021/pr800468j>
- Meinhard, M., Rodriguez, P. L., & Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, 214(5), 775-782. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0675-3>
- Melcher, K., Ng, L. M., Zhou, X. E., Soon, F. F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., ... Xu, H. E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors.

## BIBLIOGRAFÍA

- Nature*, 462(7273), 602-608. <https://doi.org/10.1038/nature08613>
- Meyer, H. J., & Rape, M. (2014). Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*, 157(4), 910-921. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.037>
- Meyer, K., Leube, M. P., & Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 264(5164), 1452-1455. <https://doi.org/10.1126/science.8197457>
- Miao, C., Xiao, L., Hua, K., Zou, C., Zhao, Y., Bressan, R. A., & Zhu, J. K. (2018). Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 6058-6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804774115>
- Michelle, C., Vourc'H, P., Mignon, L., & Andres, C. R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *Journal of Molecular Evolution*, 68(6), 616-628. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9225-6>
- Millyard, L., Lee, J., Zhang, C., Yates, G., & Sadanandom, A. (2016). The ubiquitin conjugating enzyme, TaU4 regulates wheat defence against the phytopathogen *Zymoseptoria tritici*. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep35683>
- Miyazono, K. I., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H. J., Asano, A., ... Tanokura, M. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature*, 462(7273), 609-614. <https://doi.org/10.1038/nature08583>
- Morett, E., & Bork, P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(6), 229-231. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01381-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01381-X)
- Mosquna, A., Peterson, F. C., Park, S. Y., Lozano-Juste, J., Volkman, B. F., & Cutler, S. R. (2011). Potent and selective activation of abscisic acid receptors in vivo by mutational stabilization of their agonist-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20838-20843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112838108>
- Moynihan, T. P., Ardley, H. C., Nuber, U., Rose, S. A., Jones, P. F., Markham, A. F., ... Robinson, P. A. (1999). The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30963-30968. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30963>
- Müller-Rischart, A. K., Pils, A., Beaudette, P., Patra, M., Hadian, K., Funke, M., ... Winklhofer, K. F. (2013). The E3 Ligase Parkin Maintains Mitochondrial Integrity by Increasing Linear Ubiquitination of NEMO. *Molecular Cell*, 49(5), 908-921. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.036>
- Mural, R. V., Liu, Y., Rosebrock, T. R., Brady, J. J., Hamera, S., Connor, R. A., ... Zeng, L. (2013).

## BIBLIOGRAFÍA

- The tomato Fni3 Lysine-63-specific ubiquitin-conjugating enzyme and suv ubiquitin E2 variant positively regulate plant immunity. *Plant Cell*, 25(9), 3615-3631. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117093>
- Mustilli, A. C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., & Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, 14(12), 3089-3099. <https://doi.org/10.1105/tpc.007906>
- Nagels Durand, A., Iñigo, S., Ritter, A., Iniesto, E., De Clercq, R., Staes, A., ... Goossens, A. (2016). The arabidopsis iron-sulfur protein GRXS17 is a target of the Ubiquitin E3 Ligases RGLG3 and RGLG4. *Plant and Cell Physiology*, 57(9), 1801-1813. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw122>
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1345-1363. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp083>
- Nguyen, Q. T. C., Lee, S. J., Choi, S. W., Na, Y. J., Song, M. R., Hoang, Q. T. N., ... Kim, S. Y. (2019). Arabidopsis Raf-Like Kinase Raf10 Is a Regulatory Component of Core ABA Signaling. *Molecules and cells*, 42(9), 646-660. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0173>
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., ... Getzoff, E. D. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, 326(5958), 1373-1379. <https://doi.org/10.1126/science.1181829>
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., & Hirayama, T. (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant Journal*, 50(6), 935-949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03107.x>
- Norris, S. R., Meyer, S. E., & Callis, J. (1993). The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 21(5), 895-906. <https://doi.org/10.1007/BF00027120>
- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., & Swain, S. M. (2009). Arabidopsis Dehiscence Zone Polygalacturonase1 (ADPG1), ADPG2, and Quartet2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(1), 216-233. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063768>
- Ohkuma, K., Lyon, J. L., Addicott, F. T., & Smith, O. E. (1963). Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science*, 142(3599), 1592-1593. <https://doi.org/10.1126/science.142.3599.1592>

## BIBLIOGRAFÍA

- Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., ... Kanno, J. (2015). Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO reports*, *16*(2), 192-201. <https://doi.org/10.15252/embr.201439152>
- Ordureau, A., Sarraf, S. A., Duda, D. M., Heo, J. M., Jedrychowski, M. P., Sviderskiy, V. O., ... Harper, J. W. (2014). Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Molecular Cell*, *56*(3), 360-375. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.007>
- Orman-Ligeza, B., Morris, E. C., Parizot, B., Lavigne, T., Babé, A., Ligeza, A., Klein, S., Sturrock, C., Xuan, W., Novák, O., Ljung, K., Fernandez, M. A., Rodriguez, P. L., Dodd, I. C., De Smet, I., Chaumont, F., Batoko, H., Périlleux, C., Lynch, J. P., ... Draye, X. (2018). The Xerobranching Response Represses Lateral Root Formation When Roots Are Not in Contact with Water. *Current Biology*, *28*(19), 3165-3173.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.074>
- Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenaer-Tsapis, R., Casal, M., & Urban-Grimal, D. (2009). Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter. Role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19228-19236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008318>
- Pan, I. C., Tsai, H. H., Cheng, Y. T., Wen, T. N., Buckhout, T. J., & Schmidt, W. (2015). Post-transcriptional coordination of the Arabidopsis iron deficiency response is partially dependent on the E3 ligases RING DOMAIN LIGASE1 (RGLG1) and RING DOMAIN LIGASE2 (RGLG2). *Molecular and Cellular Proteomics*, *14*(10), 2733-2752. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.048520>
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, *324*(5930), 1068-1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Pick, E., Lau, O.-S., Tsuge, T., Menon, S., Tong, Y., Dohmae, N., ... Wei, N. (2007). Mammalian DET1 Regulates Cul4A Activity and Forms Stable Complexes with E2 Ubiquitin-Conjugating Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(13), 4708-4719. <https://doi.org/10.1128/mcb.02432-06>
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015, enero 21). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*, Vol. 85, pp. 257-273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Popovic, D., Vucic, D., & Dikic, I. (2014, noviembre 1). Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nature Medicine*, Vol. 20, pp. 1242-1253. <https://doi.org/10.1038/nm.3739>
- Qin, B. (2013). The function of Rad6 gene in *Hevea brasiliensis* extends beyond DNA repair. *Plant Physiology and Biochemistry*, *66*, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.013>

## BIBLIOGRAFÍA

- Rankin, C. A., Roy, A., Zhang, Y., & Richter, M. (2011). Parkin, A Top Level Manager in the Cells Sanitation Department. *The Open Biochemistry Journal*, 5, 9-26. <https://doi.org/10.2174/1874091x01105010009>
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., ... Gong, Z. (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 63(3), 417-429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04248.x>
- Resh, M. D. (2006). Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, Vol. 2006. <https://doi.org/10.1126/stke.3592006re14>
- Riley, B. E., Loughheed, J. C., Callaway, K., Velasquez, M., Brecht, E., Nguyen, L., ... Johnston, J. A. (2013). Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nature Communications*, 4(May), 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms2982>
- Rittinger, K., & Ikeda, F. (2017). Linear ubiquitin chains: Enzymes, mechanisms and biology. *Open Biology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.170026>
- Robaglia, C., Thomas, M., & Meyer, C. (2012, junio). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 15, pp. 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.012>
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., ... Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10), 3871-3884. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114066>
- Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Diaz, M., Rodrigues, A., Izquierdo-Garcia, A. C., Peirats-Llobet, M., ... Rodriguez, P. L. (2014). C2-domain abscisic acid-related proteins mediate the interaction of PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors with the plasma membrane and regulate abscisic acid sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26(12), 4802-4820. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129973>
- Rodriguez, P. L., Benning, G., & Grill, E. (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 421(3), 185-190. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01558-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01558-5)
- Romero-Barrios, N., & Vert, G. (2018, febrero 1). Proteasome-independent functions of lysine-63 polyubiquitination in plants. *New Phytologist*, Vol. 217, pp. 995-1011. <https://doi.org/10.1111/nph.14915>
- Ron, M., Saez, M. A., Williams, L. E., Fletcher, J. C., & McCormick, S. (2010). Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in Arabidopsis. *Genes and Development*, 24(10), 1010-1021. <https://doi.org/10.1101/gad.1882810>

## BIBLIOGRAFÍA

- Roth, A. F., Wan, J., Bailey, A. O., Sun, B., Kuchar, J. A., Green, W. N., ... Davis, N. G. (2006). Global Analysis of Protein Palmitoylation in Yeast. *Cell*, *125*(5), 1003-1013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.042>
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S., & Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO Journal*, *17*(17), 4909-4919. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.17.4909>
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., ... Rodriguez, P. L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiology*, *150*(3), 1345-1355. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137174>
- Running, M. P. (2014, febrero 18). The role of lipid post-translational modification in plant developmental processes. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00050>
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O., & Rodriguez, P. L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Journal*, *37*(3), 354-369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01966.x>
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R., & Rodriguez, P. L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology*, *141*(4), 1389-1399. <https://doi.org/10.1104/pp.106.081018>
- Saez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S., & Rodriguez, P. L. (2008). HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*, *20*(11), 2972-2988. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056705>
- Saha, A., & Deshaies, R. J. (2008). Multimodal Activation of the Ubiquitin Ligase SCF by Nedd8 Conjugation. *Molecular Cell*, *32*(1), 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.021>
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., ... Márquez, J. A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, *462*(7273), 665-668. <https://doi.org/10.1038/nature08591>
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., ... Rodriguez, P. L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant Journal*, *60*(4), 575-588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x>
- Saracco, S. A., Hansson, M., Scalf, M., Walker, J. M., Smith, L. M., & Vierstra, R. D. (2009).

## BIBLIOGRAFÍA

- Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in Arabidopsis. *Plant Journal*, 59(2), 344-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03862.x>
- Saruhashi, M., Ghosh, T. K., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., ... Takezawa, D. (2015). Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), E6388-E6396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511238112>
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., & Fukai, S. (2009). Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO Journal*, 28(16), 2461-2468. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.160>
- Schroeder, D. F., Gahrtz, M., Maxwell, B. B., Cook, R. K., Kan, J. M., Alonso, J. M., ... Chory, J. (2002). De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis. *Current Biology*, 12(17), 1462-1472. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01106-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01106-5)
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517-527. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.018>
- Schweighofer, A., Hirt, H., & Meskiene, I. (2004, mayo). Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science*, Vol. 9, pp. 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.007>
- Scott, D. C., Rhee, D. Y., Duda, D. M., Alpi, A. F., Harper, J. W., Schulman, B. A. H., & Edu, J. W. H. ). (2016). Two Distinct Types of E3 Ligases Work in Unison to Regulate Substrate Ubiquitylation. *Cell*, 166, 1198-1214.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.027>
- Seo, D. H., Ryu, M. Y., Jammes, F., Hwang, J. H., Turek, M., Kang, B. G., ... Kim, W. T. (2012). Roles of four Arabidopsis U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses. *Plant Physiology*, 160(1), 556-568. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202143>
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z. Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., ... Zhang, D. P. (2010). The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell*, 22(6), 1909-1935. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073874>
- Shi, Y., Ding, Y., & Yang, S. (2018, julio 1). Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Trends in Plant Science*, Vol. 23, pp. 623-637. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.002>
- Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D., & Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor

## BIBLIOGRAFÍA

- endocytosis. *Nature Cell Biology*, 4(5), 389-393. <https://doi.org/10.1038/ncb790>
- Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E., & Hicke, L. (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO Journal*, 19(2), 187-198. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.2.187>
- Shimizu, Y., Taraborrelli, L., & Walczak, H. (2015). Linear ubiquitination in immunity. *Immunological Reviews*, 266(1), 190-207. <https://doi.org/10.1111/imr.12309>
- Shinozawa, A., Otake, R., Takezawa, D., Umezawa, T., Komatsu, K., Tanaka, K., ... Sakata, Y. (2019). SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment. *Communications biology*, 2, 30. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0281-1>
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C. H., & Zhang, H. (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *Plant Journal*, 28(6), 655-662. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01185.x>
- Sims, J. J., Haririnia, A., Dickinson, B. C., Fushman, D., & Cohen, R. E. (2009). Avid interactions underlie the Lys63-linked polyubiquitin binding specificities observed for UBA domains. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(8), 883-889. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1637>
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010, junio 1). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 13, pp. 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>
- Smit, J. J., & Sixma, T. K. (2014). RBR E3-ligases at work. *EMBO Reports*, Vol. 15, pp. 142-154. <https://doi.org/10.1002/embr.201338166>
- Söderman, E. M., Brocard, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2000). Regulation and function of the arabidopsis ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology*, 124(4), 1752-1765. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1752>
- Soma, F., Takahashi, F., Suzuki, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2020). Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK2 kinases under drought stress. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15239-3>
- Spratt, D. E., Walden, H., & Shaw, G. S. (2014, marzo 15). RBR E3 ubiquitin ligases: New structures, new insights, new questions. *Biochemical Journal*, Vol. 458, pp. 421-437. <https://doi.org/10.1042/BJ20140006>
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B. H., & D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24048-24054. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.24048>
- Stevenson, S. R., Kamisugi, Y., Trinh, C. H., Schmutz, J., Jenkins, J. W., Grimwood, J., ...

## BIBLIOGRAFÍA

- Cuming, A. C. (2016). Genetic analysis of *Physcomitrella patens* identifies ABCSISIC ACID NON-RESPONSIVE, a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *Plant Cell*, 28(6), 1310-1327. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00091>
- Stieglitz, B., Morris-Davies, A. C., Koliopoulos, M. G., Christodoulou, E., & Rittinger, K. (2012). LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate. *EMBO Reports*, 13(9), 840-846. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.105>
- Stieglitz, B., Rana, R. R., Koliopoulos, M. G., Morris-Davies, A. C., Schaeffer, V., Christodoulou, E., ... Rittinger, K. (2013). Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP. *Nature*, 503(7476), 422-426. <https://doi.org/10.1038/nature12638>
- Stone, S. L. (2019). Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 343, 65-110. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.012>
- Stone, S. L., Hauksdóttir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., & Callis, J. (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137(1), 13-30. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052423>
- Sun, C.-W., & Callis, J. (1997). Independent modulation of Arabidopsis thaliana polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *The Plant Journal*, 11(5), 1017-1027. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11051017.x>
- Swaney, D. L., Rodríguez-Mias, R. A., & Villén, J. (2015). Phosphorylation of ubiquitin at Ser65 affects its polymerization, targets, and proteome-wide turnover. *EMBO reports*, 16(9), 1131-1144. <https://doi.org/10.15252/embr.201540298>
- Takahashi, Y., Zhang, J., Hsu, P. K., Ceciliato, P. H. O., Zhang, L., Dubeaux, G., ... Schroeder, J. I. (2020). MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13875-y>
- Tan, N. G. S., Ardley, H. C., Scott, G. B., Rose, S. A., Markham, A. F., & Robinson, P. A. (2003). Human homologue of ariadne promotes the ubiquitylation of translation initiation factor 4E homologous protein, 4EHP. *FEBS Letters*, 554(3), 501-504. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01235-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01235-3)
- Tanno, H., & Komada, M. (2013, junio). The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. *Journal of Biochemistry*, Vol. 153, pp. 497-504. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt028>
- Tian, M., & Xie, Q. (2013). Non-26S Proteasome Proteolytic Role of Ubiquitin in Plant Endocytosis and Endosomal Trafficking. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(1), 54-63. <https://doi.org/10.1111/jipb.12007>

## BIBLIOGRAFÍA

- Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S. I., ... Iwai, K. (2011). SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 471(7340), 633-636. <https://doi.org/10.1038/nature09815>
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., ... Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17588-17593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907095106>
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11632-11637. <https://doi.org/10.1073/pnas.190309197>
- van Nocker, S., & Ludwig, P. (2003, diciembre 12). The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: Conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, Vol. 4, p. 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-50>
- Vazquez-Vilar, M., Quijano-Rubio, A., Fernandez-Del-Carmen, A., Sarrion-Perdigones, A., Ochoa-Fernandez, R., Ziarolo, P., ... Orzaez, D. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic acids research*, 45(4), 2196-2209. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1326>
- Vierstra, R. D. (2009, junio). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 10, pp. 385-397. <https://doi.org/10.1038/nrm2688>
- Vijay-kumar, S., Bugg, C. E., & Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 194(3), 531-544. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90679-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90679-6)
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., ... Merlot, S. (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(10), 3170-3184. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069179>
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, 33(5), 949-956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., ... Provard, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell*, 29(8), 1806-1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>

## BIBLIOGRAFÍA

- Wang, Pengcheng, Du, Y., Hou, Y. J., Zhao, Y., Hsu, C. C., Yuan, F., ... Zhu, J. K. (2015). Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(2), 613-618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423481112>
- Wang, Pengcheng, Xue, L., Batelli, G., Lee, S., Hou, Y. J., Van Oosten, M. J., ... Zhu, J. K. (2013). Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(27), 11205-11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308974110>
- Wang, Pengcheng, Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C. C., Liu, X., Fu, L., ... Zhu, J. K. (2018). Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response. *Molecular Cell*, *69*(1), 100-112.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002>
- Wang, Pengjie, Zheng, Y., Guo, Y., Chen, X., Sun, Y., Yang, J., & Ye, N. (2019). Identification, expression, and putative target gene analysis of nuclear factor-Y (NF-Y) transcription factors in tea plant (*Camellia sinensis*). *Planta*, *250*(5), 1671-1686. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03256-6>
- Wang, Q., Chen, Y. Y., Li, S. P., Yang, W. Di, Sun, L. F., Jang, M. Q., ... Wu, Y. K. (2020). Ca<sup>2+</sup>-based allosteric switches and shape shifting in RGLG1 VWA domain. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 821-833. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.023>
- Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>
- Wei, N., Chamovitz, D. A., & Deng, X. W. (1994). Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, *78*(1), 117-124. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90578-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90578-9)
- Wen, R., Newton, L., Li, G., Wang, H., & Xiao, W. (2006). Arabidopsis thaliana UBC13: Implication of error-free DNA damage tolerance and Lys63-linked polyubiquitylation in plants. *Plant Molecular Biology*, *61*(1-2), 241-253. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0007-x>
- Wenzel, D. M., & Klevit, R. E. (2012). Following Ariadne's thread: A new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC Biology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-24>
- Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S., & Klevit, R. E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*, *474*(7349), 105-108. <https://doi.org/10.1038/nature09966>
- Wiborg, J., O'Shea, C., & Skriver, K. (2008). Biochemical function of typical and variant

- Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases. *Biochemical Journal*, 413(3), 447-457. <https://doi.org/10.1042/BJ20071568>
- Wickliffe, K. E., Williamson, A., Meyer, H. J., Kelly, A., & Rape, M. (2011, noviembre). K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends in Cell Biology*, Vol. 21, pp. 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.08.008>
- Wiesner, S., Ogunjimi, A. A., Wang, H. R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J. L., & Forman-Kay, J. D. (2007). Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell*, 130(4), 651-662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.050>
- Wijk, S. J. L., & Timmers, H. T. M. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *The FASEB Journal*, 24(4), 981-993. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136259>
- Wu, Q., Zhang, X., Peirats-Llobet, M., Belda-Palazon, B., Wang, X., Cui, S., ... An, C. (2016). Ubiquitin ligases RGLG1 and RGLG5 regulate abscisic acid signaling by controlling the turnover of phosphatase PP2CA. *Plant Cell*, 28(9), 2178-2196. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00364>
- Xu, L., Ménard, R., Berr, A., Fuchs, J., Cognat, V., Meyer, D., & Shen, W.-H. (2009). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of *FLC* expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 57(2), 279-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03684.x>
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., ... Peng, J. (2009). Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell*, 137(1), 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.041>
- Xu, R. Y., Xu, J., Wang, L., Niu, B., Copenhaver, G. P., Ma, H., ... Wang, Y. (2019). The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex/cyclosome subunit 8 is required for male meiosis. *New Phytologist*, 224(1), 229-241. <https://doi.org/10.1111/nph.16014>
- Yanagawa, Y., Sullivan, J. A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., ... Deng, X. W. (2004). *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes and Development*, 18(17), 2172-2181. <https://doi.org/10.1101/gad.1229504>
- Yang, Y., & Guo, Y. (2018, enero 1). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, Vol. 217, pp. 523-539. <https://doi.org/10.1111/nph.14920>
- Yee, D., & Goring, D. R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: From upstream activators to downstream target substrates. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1109-1121. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern369>

## BIBLIOGRAFÍA

- Yik, J. H. N., & Weigel, P. H. (2002). The position of cysteine relative to the transmembrane domain is critical for palmitoylation of H1, the major subunit of the human asialoglycoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47305-47312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208751200>
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., ... Yan, N. (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(12), 1230-1236. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1730>
- Yin, X. J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Dolezal, K., Ditengou, F., ... Bachmair, A. (2007). Ubiquitin lysine 63 chain-forming ligases regulate apical dominance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(6), 1898-1911. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052035>
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., ... Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1473-1483. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf188>
- Yoshida, Takuya, Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 38(1), 35-49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>
- Yoshida, Takuya, Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant Journal*, 61(4), 672-685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>
- Yoshida, Tomo, Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., ... Hirayama, T. (2006). ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiology*, 140(1), 115-126. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070128>
- Yu, F., Lou, L., Tian, M., Li, Q., Ding, Y., Cao, X., ... Xie, Q. (2016). ESCRT-I Component VPS23A Affects ABA Signaling by Recognizing ABA Receptors for Endosomal Degradation. *Molecular Plant*, 9(12), 1570-1582. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.11.002>
- Yu, F., & Xie, Q. (2017, noviembre 1). Non-26S Proteasome Endomembrane Trafficking Pathways in ABA Signaling. *Trends in Plant Science*, Vol. 22, pp. 976-985. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.009>
- Yu, Z., Zhang, D., Xu, Y., Jin, S., Zhang, L., Zhang, S., ... Murphy, A. (2019). CEPR2 phosphorylates and accelerates the degradation of PYR/PYLs in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 70(19), 5457-5469. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz302>

- Yuan, L., Lv, Z., Atkison, J. H., & Olsen, S. K. (2017). Structural insights into the mechanism and E2 specificity of the RBR E3 ubiquitin ligase HHARI. *Nature Communications*, *8*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00272-6>
- Yuan, X., Yin, P., Hao, Q., Yan, C., Wang, J., & Yan, N. (2010). Single amino acid alteration between valine and isoleucine determines the distinct pyrabactin selectivity by PYL1 and PYL2. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(37), 28953-28958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160192>
- Zang, Y., Wang, Q., Xue, C., Li, M., Wen, R., & Xiao, W. (2012). Rice UBC13, a candidate housekeeping gene, is required for K63-linked polyubiquitination and tolerance to DNA damage. *Rice*, *5*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-5-24>
- Zentgraf, U., Laun, T., & Miao, Y. (2010, febrero). The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 89, pp. 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.014>
- Zhang, H., Cui, F., Wu, Y., Lou, L., Liu, L., Tian, M., ... Xie, Q. (2015). The RING finger ubiquitin E3 ligase SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *27*(1), 214-227. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134163>
- Zhang, L., Li, X., Li, D., Sun, Y., Li, Y., Luo, Q., ... Yang, Y. (2018). CARK1 mediates ABA signaling by phosphorylation of ABA receptors. *Cell Discovery*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0029-y>
- Zhang, Xingliang, Jiang, L., Wang, G., Yu, L., Zhang, Q., Xin, Q., ... Chen, Z. (2013). Structural Insights into the Abscisic Acid Stereospecificity by the ABA Receptors PYR/PYL/RCAR. *PLoS ONE*, *8*(7), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067477>
- Zhang, Xu, Wu, Q., Cui, S., Ren, J., Qian, W., Yang, Y., ... An, C. (2015). Hijacking of the jasmonate pathway by the mycotoxin fumonisin B1 (FB1) to initiate programmed cell death in *Arabidopsis* is modulated by RGLG3 and RGLG4. *Journal of Experimental Botany*, *66*(9), 2709-2721. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv068>
- Zhang, Xu, Wu, Q., Ren, J., Qian, W., He, S., Huang, K., ... An, C. (2012). Two novel RING-type ubiquitin ligases, RGLG3 and RGLG4, are essential for jasmonate-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *160*(2), 808-822. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203422>
- Zhao, J., Zhao, L., Zhang, M., Zafar, S. A., Fang, J., Li, M., ... Li, X. (2017). *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligases PUB22 and PUB23 negatively regulate drought tolerance by targeting ABA receptor PYL9 for degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091841>
- Zhao, Q., Tian, M., Li, Q., Cui, F., Liu, L., Yin, B., & Xie, Q. (2013). A plant-specific in vitro ubiquitination analysis system. *Plant Journal*, *74*(3), 524-533. <https://doi.org/10.1111/tpj.12127>

## BIBLIOGRAFÍA

- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., ... Zhu, J. K. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), 1949-1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522840113>
- Zhao, Y., Zhang, Z., Gao, J., Wang, P., Hu, T., Wang, Z., ... Zhu, J. K. (2018). Arabidopsis Duodecuple Mutant of PYL ABA Receptors Reveals PYL Repression of ABA-Independent SnRK2 Activity. *Cell Reports*, 23(11), 3340-3351.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.044>
- Zhou, G. A., Chang, R. Z., & Qiu, L. J. (2010). Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 72(4), 357-367. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9575-x>
- Zhu, J. K. (2016, octubre 6). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, Vol. 167, pp. 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zhuang, M., Calabrese, M. F., Liu, J., Waddell, M. B., Nourse, A., Hammel, M., ... Schulman, B. A. (2009). Structures of SPOP-Substrate Complexes: Insights into Molecular Architectures of BTB-Cul3 Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell*, 36(1), 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.022>
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136(1), 2621-2632. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046367>
- Zolman, B. K., Monroe-Augustus, M., Silva, I. D., & Bartel, B. (2005). Identification and functional characterization of Arabidopsis Peroxin4 and the interacting protein Peroxin22. *Plant Cell*, 17(12), 3422-3435. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035691>



# ABREVIATURAS

---

AAPK: "ABA ACTIVATED SERINE THREONINE PROTEIN KINASE"  
ABA Acido Abscísico  
ABFs: "ABRE Binding Factors"  
ABI1: "ABA INSENSITIVE 1"  
ABRE: "ABA Responsive Element"  
ACT: Actina  
AD: "Activation Domain"  
ADNc: ADN Complementario  
ALIX: "ALG-2 INTERACTING PROTEIN-X"  
Ala (A): Alanina  
AMP: Monofosfato De Adenosina  
APC/C: "Anaphase Promoting Complex/Cyclosome"  
Arg (R): Arginina  
ARNm: ARN Mensajero  
amiR: Micro ARN Artificial  
ASK: "GSK3s/Shaggy-Like Kinases"  
Asp (D): Ácido Aspártico  
ATP: Adenosin Trifosfato  
BD: "Binding Domain"  
BiFC: "Bimolecular Fluorescence Complementation"  
BIN2: "Brassinosteroid Insentive 2"  
BR: Brasinosteroides  
BTB/POZ: ("Broad-Complex, Tramtrack, And Bric-À-Brac/ Pox Virus And Zinc Finger")  
CAR: "C2-DOMAIN ABA-RELATED"  
CDD: COP10-DET1-DDB1  
CHX: Cicloheximida  
CIPK: CBL-Interacting Protein Kinases  
CoIP: Co-Inmunoprecipitación  
COP10: "Constitutively Photomorphogenic 10"

CPK3: "Calcium-Dependent Protein Kinase 3"  
CRL: "Cullin-RING Based E3 Ligase"  
CTAB: Bromuro de Cetil Trimetilamonio  
Cys (C): Cisteína  
DCAF: "Cul4-Associated Factors"  
DDA1: "DET1, DDB1-Associated 1"  
DDB1: DNA Damage-Binding Protein  
DET1: DE-ETIOLATED  
DRE: Drought Response Element  
DUB: Proteínas Deubiquitizantes  
DWD: DDB1/WD-40  
E1: Enzima Activadora De Ubiquitina  
E2: Enzima Conjugadora De Ubiquitina.  
E3: Enzima Ligasa De Ubiquitina  
EGR2: CLADE-E GROWTH-REGULATING 2  
ER: Retículo Endoplasmático  
ESCRT-I: "ENDOSOMAL SORTING COMPLEXES REQUIRED FOR TRANSPORT-I"  
FREE 1: FYVE DOMAIN PROTEIN REQUIRED FOR ENDOSOMAL SORTING 1  
FYVE 1: FYVE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1  
GFP: Green Fluorescence Protein  
Gln (G): Glicina  
GSK3s: Glucógeno Sintasa Quinasa 3s  
HAB1: HYPERSENSITIVE TO ABA 1  
His (H): Histidina  
IBR: "In-Between RING"  
Ile (I): Isoleucina  
ILV: "Intraluminal Vesicles"  
IPTG: Isopropil-B-Tiogalactopiranosido.  
JA: Jasmónico

Kda: Kilodaltons

LB: Medio "Lysogeny Broth"

Leu (L): Leucina

LUC: Luciferasa

MAKKs: "Mitogen-Activated Protein Kinase Makes Kinases"

MASP1: "Mannose-Associated Serine Protease 1"

MES: Ácido 2-(N -Morfolino) Etanosulfónico

Min: Minutos

MPTs: Modificaciones Post-Transduccionales

MS: Medio Murashige-Skoog

NEDD8/RUB1: "Neuronal Precursor Cell Expressed Developmentary Downregulated8/  
Related To Ubiquitin"

NLS : ("Nuclear Localization Site")

NMT1: miristoiltransferasa 1

°C: Grados Centígrados

OD: Densidad Óptima A 600 Nanometros.

OE: Líneas Sobreexpresoras

OFP: ("Orange Fluorescent Protein")

PD: ("Pull-Down")

PEG: Polietilenglicol ("Polyethylene Glycol")

Phe (F): Fenilalanina

PIPES: "1,4-Piperazinediethanesulfonic Acid, Piperazine-1,4-Bis (2- Ethanesulfonic Acid),  
Piperazine-N,N'-Bis (2-Ethanesulfonic Acid)

PP2A: Proteína Fosfatasa 2 A

PP2B: Proteína Fosfatasa 2B

PP2C: Proteína Fosfatasa 2C

PPs: Proteínas Fosfatasas

PUB: "Plant U-Box")

PYL: PYR1-LIKE

PYR1: "Pyrabactin Resistance 1"  
RBR: "RING BETWEEN RING"  
RBX1: "RING BOX 1"  
RCAR: "Regulatory Components of ABA Receptors"  
RDK1: "Receptor Dead Kinase 1"  
RFAS: "RING Finger ABA-Related"  
RGLG: "RING Domain Ligase 1"  
RING: "Really Interesting New Gen"  
Rpm: Revoluciones por minuto  
RPT: "Regulatory Particle Triple A-Atpase"  
RSL1: "RING Finger of Seed Longevity"  
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS  
SNRk2: "ABA-Activated SNF1-Related Protein Kinases"  
SOS2: "Non-specific serine/threonine protein kinase"  
Split-LUC: split-luciferase  
START: "Star-related lipid-transfer"  
TF: "Transcription Factor"  
Thr (T): Treonina  
TOR: "Target Of Rampamycin")  
Trp (W): Triptófano  
Ub: Ubiquitina  
UBA1: "Ubiquitin Activating 1"  
UBC: "Ubiquitin Conjugating"  
UPL: LIGASAS DE PROTEÍNA DE UBIQUITINA  
UPS: "Ubiquitin Protease Sistem"  
Val (V): Valina  
Vps23A: "VACUOLAR PROTEIN SORTING 23A"  
Y2H: "Yeast Two Hybrid"  
YFP: "Yellow Fluorescent Protein"

