

INTRODUCCIÓN	25
Ácido abscísico y componentes principales de la ruta de señalización	26
Cascada de señalización del ABA	29
Receptores de ABA en Arabidopsis	30
Proteínas fosfatasa en Arabidopsis.....	35
Familia Protein Kinasa 2 relacionada con SNF1 (SnRK2) en Arabidopsis	38
Factores de transcripción implicados en la respuesta a ABA	40
Regulación de los componentes principales de la ruta de señalización de ABA en Arabidopsis: modificaciones post-traduccionales	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
OBJETIVOS	88
RESULTADOS I	91
Expresión de los genes RFA1-RFA5, estructura comparada con la rama RSL1 y localización subcelular de RFA1 y RFA4	92
La interacción de RSL1, RFA1 y RFA4 con los receptores de ABA se localiza en diferentes localizaciones subcelulares	103
RFA1 y RFA4 promueven la ubiquitinación de PYR1 in vitro	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
RESULTADOS II.....	149
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
RESULTADOS III	165
Generación de dobles y triples mutantes de la familia RSL1/RFAs.....	166
DISCUSIÓN	171
CONCLUSIONES.....	184
MATERIAL Y MÉTODOS.....	188
Material bacteriológico y vegetal usado: manejo y condiciones de crecimiento.....	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
Métodos de extracción y análisis de ácidos nucleicos.	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
Vectores de clonación utilizados.	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
Extracción de ARN y análisis de la expresión del gen por PCR o PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	220
Tecnología de proteínas	221
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
Ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H, “Yeast-Two – Hybrid”)	229
Visualización de proteínas en expresión transitoria con <i>Agrobacterium</i>	230
Microscopía de láser confocal: ensayos de localización, BiFC y multicolorBiFC ...	232
Co-inmunoprecipitación (coIP)	233
Ensayo de reconstitución de luciferasa dividida (“Split-LUC’)	234
Análisis de vida media de PYL4 y PYR1 en <i>Arabidopsis</i>	235
Ensayo de ubiquitinación <i>in vitro</i>	236
Ensayo de ubiquitinación <i>in vivo</i> en <i>N. Benthamiana</i>	237
Ensayos de degradación de proteínas <i>in vivo</i> y <i>semi-in vivo</i>	238
Ensayos de S-acilación de proteínas	239
Estadísticas y análisis de colocalización	241
BIBLIOGRAFÍA	243
ABREVIATURAS	279