

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 ésta 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^{C334S}, RSL1^{C5S} y RSL1^{C6S} 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.