



Caracterización funcional de un nuevo factor bHLH de *Zea mays*

Agnese Rabissi

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DOCTORAL DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DE UN NUEVO FACTOR bHLH DE *ZEA MAYS*

Agnese Rabissi

Barcelona 2014

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMÀCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DOCTORAL DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN NUEVO FACTOR bHLH DE *ZEA MAYS*

Memoria presentada por Agnese Rabissi para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado en el Departamento de Genética Molecular del Centre de Recerca e Agrigenómica (CRAG)

Directora de tesis

Tutor de tesis

Doctoranda

Dra. Montserrat Pagés Torrens

Dr. Albert Ferrer Prats

Agnese Rabissi

Agnese Rabissi
Barcelona 2014

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| TABLA DE CONTENIDO..... | 1 |
| LISTA DE TABLAS Y FIGURAS..... | 1 |
| ABREVIATURAS | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1.1 El ácido abscísico (ABA) | 8 |
| 1.1.1 ABA biosíntesis y transporte..... | 8 |
| 1.2 Señalización en plantas por ABA..... | 9 |
| 1.2.1 La proteínas PYR/PYL/RCAR: receptores de ABA..... | 10 |
| 1.2.2 Las fosfatasa PP2C de tipo A: reguladores negativos de la señalización por ABA..... | 10 |
| 1.2.3 La proteínas quinasas SnRK2s..... | 11 |
| 1.2.4 Mecanismo de señalización por ABA..... | 12 |
| 1.3 Los factores de transcripción | 14 |
| 1.3.1 Los factores de transcripción de tipo bHLH..... | 15 |
| 1.3.1.1 Características generales..... | 15 |
| 1.3.1.2 El dominio bHLH..... | 15 |
| 1.3.1.3 Clasificación de los TFs bHLH y otras características..... | 17 |
| 1.3.2 Los TFs bHLH en la adaptación a la sequía..... | 20 |
| 2. OBJETIVOS..... | 24 |
| 3. RESULTADOS | 28 |
| 3.1 Caracterización del factor de transcripción ZmKS..... | 31 |
| 3.1.1 Caracterización molecular..... | 31 |
| 3.1.2 Expresión en maíz..... | 37 |
| 3.1.3 Obtención de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el promotor génico de ZmKS fusionado a GUS..... | 39 |
| 3.1.4 Localización sub-celular de ZmKS..... | 41 |
| 3.1.5 Homo- y hetero-dimerización de ZmKS..... | 41 |
| 3.1.6 Detección de secuencias <i>cis</i> reconocidas por ZmKS2..... | 42 |
| 3.1.7 Fosforilación de ZmKS por ZmOST1..... | 45 |
| 3.1.8 Interacción <i>in planta</i> entre ZmKS2 y ZmOST1..... | 49 |
| 3.1.9 Co-trasformación en protoplastos de maíz..... | 51 |
| 3.2 Caracterización funcional del factor de transcripción ZmKS..... | 53 |
| 3.2.1 Obtención y análisis funcionales de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2..... | 54 |
| 3.2.1.1. Ensayo de germinación..... | 57 |
| 3.2.1.2 Regulación estomática..... | 60 |
| 3.2.1.3 Ensayo de tolerancia a la desecación..... | 64 |
| 3.2.1.4 Ensayo de floración..... | 66 |
| 3.2.2 Análisis de líneas transgénicas de <i>Zea mays</i> | 67 |
| 3.2.2.1 Ensayos de tolerancia a la desecación..... | 72 |
| 4. DISCUSIÓN | 74 |
| 5. CONCLUSIONES | 82 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 86 |

| | |
|---|------------|
| Materiales | 88 |
| 6.1.1 Material vegetal _____ | 88 |
| 6.1.1.1 Arabidopsis | 88 |
| 6.1.1.2. Maíz | 89 |
| 6.1.2 Cepas bacterianas _____ | 90 |
| 6.1.3 Plásmidos _____ | 91 |
| 6.1.3 Construcciones _____ | 92 |
| 6.1.4 Primers / cebadores _____ | 94 |
| Métodos | 96 |
| 6.2 Métodos de manipulación de ácidos nucleicos | 96 |
| 6.2.1 Técnicas empleadas para el clonaje de DNA _____ | 96 |
| 6.2.2 Preparación de células competentes _____ | 96 |
| 6.2.2.1. Obtención de células competentes por choque térmico de <i>E. coli</i> | 96 |
| 6.2.2.2 Obtención de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico..... | 96 |
| 6.2.2.3 Obtención de células de <i>A. tumefaciens</i> electro-competentes..... | 97 |
| 6.2.3 Transformación de células competentes _____ | 97 |
| 6.2.3.1 Transformación de células competentes de <i>Escherichia Coli</i> por choque térmico | 97 |
| 6.2.3.2 Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico | 98 |
| 6.2.3.3 Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación | 99 |
| 6.2.4 Obtención de DNA genómico _____ | 99 |
| 6.2.5 Obtención de DNA plasmídico _____ | 99 |
| 6.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) _____ | 100 |
| 6.2.7 Digestión enzimática del DNA plasmídico _____ | 101 |
| 6.2.8 Electroforesis de fragmentos de DNA y RNA en gel de agarosa _____ | 102 |
| 6.2.9 Extracción y purificación de fragmentos de DNA, reacción de ligación y recombinaciones __ | 102 |
| 6.2.10 Extracción de RNA total _____ | 103 |
| 6.2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos _____ | 103 |
| 6.2.12 Elaboración de cDNA _____ | 104 |
| 6.2.13 PCR cuantitativa/ Real time PCR _____ | 104 |
| 6.3 Métodos de manipulación de proteínas | 105 |
| 6.3.1 Obtención de extractos proteicos vegetales _____ | 105 |
| 6.3.2 Cuantificación de proteínas _____ | 106 |
| 6.3.3 Inmunoprecipitación de proteínas _____ | 106 |
| 6.3.4 Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE _____ | 107 |
| 6.3.5 Tinción de Coomassie _____ | 107 |
| 6.3.6 <i>Western Blot</i> _____ | 108 |
| 6.3.6.1 Transferencia de proteínas y tinción con <i>Ponceau</i> | 108 |
| 6.3.6.2 Hibridación y inmunodetección mediante ECL..... | 109 |
| 6.3.7 Obtención de proteínas recombinantes _____ | 109 |
| 6.3.7.1 Sobreexpresión de proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis o MBP en <i>E. coli</i> BL21 Rosetta | 110 |
| 6.3.7.2 Extracción y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis | 111 |
| 6.3.8 Ensayos de fosforilación _____ | 113 |
| 6.3.8.1 Ensayo quinasa <i>in vitro</i> | 113 |
| 6.3.8.2 Ensayo quinasa en gel..... | 114 |
| 6.3.8.2.1 Preparación del gel SDS-PAGE copolimerizado con ZmKS2. | 114 |
| 6.3.8.2.2 Renaturalización y reacción de fosforilación..... | 114 |
| 6.3.9 Ensayo de interacción proteína-proteína mediante el sistema de complementación Bimolecular (BiFC) _____ | 115 |
| 6.3.10 Técnica de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) __ | 116 |
| 6.4 Métodos de plantas | 117 |

| | |
|---|------------|
| 6.4.1 Obtención y transformación transitoria de protoplastos de maíz | 117 |
| 6.4.1.1 Obtención de protoplastos de maíz | 117 |
| 6.4.1.2 Transformacion transitoria de protoplastos por electroporación..... | 118 |
| 6.4.2 Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> | 118 |
| 6.4.3 Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 119 |
| 6.4.3.1 Transformación por “floral dip” | 119 |
| 6.4.3.2 Selección de las plantas transformadas..... | 120 |
| 6.4.4 Ensayos realizados con plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> | 121 |
| 6.4.4.1 Ensayo de germinación..... | 121 |
| 6.4.4.2 Ensayo de pérdida de agua..... | 122 |
| 6.4.4.3 Ensayo de cierre estomático..... | 122 |
| 6.4.4.4 Ensayo de abertura estomática | 123 |
| 6.4.4.5 Ensayo de Floración | 124 |
| 6.4.4.6 Tinción histoquímica de l’actividad GUS..... | 124 |
| 6.4.5 Obtención de plantas transgénicas de <i>Maíz</i> | 125 |
| 6.4.6 Ensayos realizados con plantas transgénicas de <i>Maíz</i> | 126 |
| 6.4.6.1 Ensayo de pérdida de agua..... | 126 |
| 6.4.6.2 Molde de hojas de <i>maíz</i> | 126 |
| 6.5 Análisis de datos..... | 127 |
| 7 BIBLIOGRAFIA..... | 130 |
| 8. ANEXOS..... | 144 |

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Las plantas son sujetas a numerosos estímulos bióticos y abióticos..... | 6 |
| Figura 1.2: Esquema del mecanismo de señalización por ABA..... | 12 |
| Figura 1.3: Logotipo del dominio bHLH..... | 16 |
| Figura 1.4: árbol filogenético de bHLH TFs en plantas..... | 18 |
| Figura 3.1: Estructura de los genes ZmKS1 y ZmKS2..... | 30 |
| Figura 3.2: Estructura génica, cDNA, secuencia aminoacídica y modelo de la proteína ZmKS2..... | 32 |
| Figura 3.3: Estructura génica, cDNA, secuencia aminoacídica y modelo de la proteína ZmKS1..... | 33 |
| Figura 3.4: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ZmKS2 y ZmKS1..... | 34 |
| Figura 3.5: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ZmKS2 y de las tres proteínas AKS de <i>Arabidopsis</i> | 36 |
| Figura 3.6: Real time PCR de la expresión de ZmKS en maíz..... | 37 |
| Figura 3.8: Localización sub-celular ZmKS..... | 41 |
| Figura 3.9: Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) de ZmKS..... | 42 |
| Figura 3.10: SELEX del ZmKS2..... | 44 |
| Figura 3.11: Posibles sitios de fosforilación de ZmKS por ZmOST..... | 46 |
| Figura 3.12: Fosforilación in vitro de ZmKS..... | 47 |
| Figura 3.13: Ensayo de quinasa en gel..... | 48 |
| Figura 3.14: Interacción <i>in planta</i> entre ZmKS y ZmOST1..... | 50 |
| Figura 3.15: Co-transformación de protoplastos de maíz..... | 52 |
| Figura 3.16: Transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 54 |
| Figura 3.17: Niveles de expresión de los factores ZmKS1 y ZmKS2 en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 56 |
| Figura 3.19: Ensayo de cierre estomático de las transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2..... | 61 |
| Figura 3.20: Ensayo de abertura estomática de las transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2..... | 63 |
| Figura 3.21: Ensayo de pérdida de agua de las plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2..... | 65 |
| Figura 3.22: Ensayo de floración de las plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2 en fondo LER..... | 66 |
| Figura 3.23: Construcción para la transformación de callos de maíz..... | 67 |
| Figura 3.24: Análisis de los niveles de expresión del factor ZmKS2 en los callos Transgénicos de <i>Zea mays</i> que sobre-expresan ZmKS2..... | 68 |
| Figura 3.25: Análisis de los niveles de expresión del factor ZmKS2 en las Plantas Transgénicas de <i>Zea mays</i> | 70 |
| Figura 3.26: Estudio del patrón estomático de las plantas transgénicas..... | 71 |
| de <i>Zea mays</i> | 71 |
| Figura 3.27 : Ensayo de pérdida de agua en plantas transgénicas de <i>Zea mays</i> que sobre-expresan el factor de transcripción ZmKS2..... | 73 |
| Tabla 6.1.: Lista de plásmidos utilizados..... | 91 |
| Tabla 6.2: Lista de las construcciones utilizadas en este trabajo..... | 92 |
| Tabla 6.3: lista de primers utilizados en este trabajo..... | 94 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|-----------------------------|
| ABA | Ácido Abscísico |
| | ABA responsive kinase |
| AKS | substrate |
| | Ampicilina resistance |
| Amp ^R | (Carbenicilina) |
| | Bimolecular Fluorescent |
| BiFC | Complementation |
| bp | base pairs (pares de bases) |
| | Carbelicilina resistance |
| Cb ^R | (Ampicilina) |
| Cf ^R | Cefotaxima resistance |
| Clf ^R | Chloranfenicol |
| Ct | Control |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DO | densidad óptica |
| DTT | Dithiothreitol |
| Fc | Fusicoccina |
| Fw | Forward |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| | hman influenza |
| HA | hemagglutinin |
| Hyg ^R | Higromicina resistance |
| IP | inmunoprecipitado |
| | Isopropyl-beta-thio |
| | galactopyranoside |
| IPTG | |
| IPTG | Immuno Precipitación |
| Km ^R | Kanamicina resistance |
| KS | Kinase Substrate |
| LB | medio Luria-Bertoni |
| ZmKS1 | ZmKS isoforma larga |
| Ma | Milliones de años |
| MBP | Mielin Basic Protein |
| min | minutos |
| MS | medio Murashige & Skoog |
| O/N | Over Night |
| qPCR | PCR cuantitativa |
| Rif ^R | Rifampicina resistance |
| Rw | Reverse |
| ZmKS2 | ZmKS isoforma corta |
| seg | segundos |
| TA | temperatura ambiente |
| tag | etiqueta |

| | |
|------------------|--|
| T _m | temperatura de fusión de primers |
| UTR | UnTranslated Region |
| WT | Wild type |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside |
| YEB | medio Yeast Extract Broth |
| YFP ^C | Yellow Fluorescent Protein, parte C-terminal |
| YFP ^N | Yellow Fluorescent Protein, parte N-terminal |

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles y por esto están continuamente expuestas a numerosos tipos de estreses bióticos y abióticos. En estos últimos se incluyen los factores ambientales (como salinidad, variaciones de las temperaturas, etc., entre los cuales destaca el estrés hídrico o sequía (Vinocur & Altman, 2005)) causas primarias de pérdida de hasta el 60% de la producción agrícola a nivel mundial (Bray et al., 2000).

A pesar de esto, en el curso de la evolución las plantas han ido desarrollando diferentes mecanismos de respuesta a las condiciones adversas que limitan su crecimiento y/o desarrollo, para prevenir o minimizar los daños inducidos o para conseguir aclimatarse y superar las condiciones desfavorables (Bartels & Sunkar, 2005).

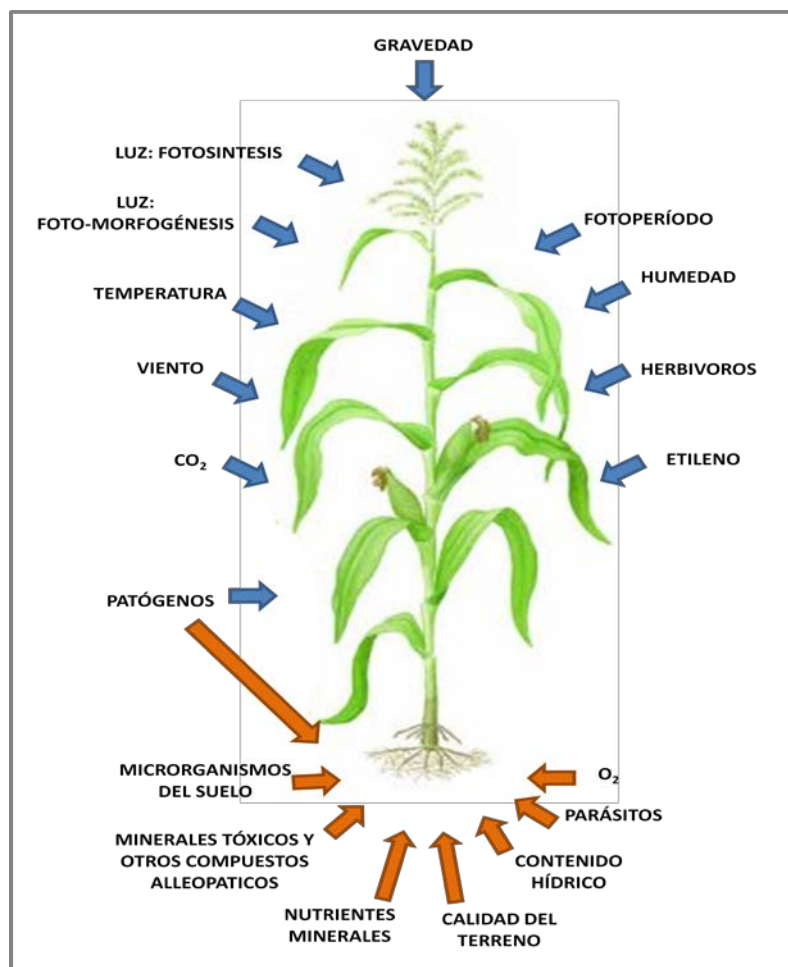


Figura 1.1: Las plantas son sujetas a numerosos estímulos bióticos y abióticos

La falta de agua en las plantas induce respuestas de tolerancia a estrés de tipo fisiológico, celular y molecular dirigidas hacia la ganancia de tolerancia. Un estado similar a la sequía se presenta en la planta no solamente en condiciones de falta de agua pero también durante estrés salino y bajas temperaturas, indicando que estos

1. INTRODUCCIÓN

estreses comparten algunas de las respuestas de tolerancia (Mian et al., 2011, Gollmack et al., 2011, Chinnusamy et al., 2004, Zhang et al., 2010).

El estrés hídrico se presenta cuando el agua que la planta pierde con la transpiración supera el agua absorbida por las raíces y las principales respuestas consisten en: pérdida de turgencia de la parte aérea con consecuente reducción de la elongación celular, disminución de la síntesis de proteínas y de la división celular; producción y acumulación de moléculas osmo-protectoras, cierre estomático y reducción del proceso fotosintético; elongación de las raíces principales con disminución de crecimiento de las laterales y producción de metabolitos tóxicos, hasta llegar a la muerte de la planta (Ahuja et al., 2010, Blum, 2011, CHAVES, 1991).

Debido al escenario actual de calentamiento global (Tester & Langridge, 2010) y a la necesidad de producir alimentos para una población mundial en continuo aumento, se vuelve siempre más necesario incrementar la producción agrícola. Ya en los años sesenta, con la “revolución verde”, se consiguieron buenos resultados por medio de mejora genética de las principales especies cultivadas, el incremento de la mecanización y la introducción de nuevos y más efectivos pesticidas y productos para aumentar la fertilidad del suelo (Khush, 2001). Hoy en día muchos científicos sostienen la necesidad de una “segunda revolución verde” para desarrollar cultivos estables frente a los estreses abióticos que se prevé vayan empeorando en el futuro. En comparación con la resistencia a estrés biótico, normalmente conferida por rasgos mono-génicos, la ingenierización de la tolerancia a estrés abiótico es genéticamente más compleja, debido a su naturaleza poli-génica (Wang et al., 2003, Bressan et al., 2009), y la utilización de las biotecnologías y técnicas de ingenierización genética de los cultivos podrían contribuir significativamente al logro de esta meta (Eckardt et al., 2009, Cominelli et al., 2013). De aquí surge el gran interés y la importancia de avanzar en el conocimiento de los mecanismos que están en la base de la respuesta de tolerancia a sequía para que en el futuro estos conocimientos se puedan aplicar a plantas de interés agrícola.

1.1 El ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) pertenece a la clase de los isoprenoides (terpenoides) (Nambara & Marion-Poll, 2005) y también es una de las fitohormonas más importantes involucrada en el crecimiento, desarrollo y adaptación a varias condiciones de estrés en las plantas (Schroeder et al., 2001, Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Verslues et al., 2006). La presencia de ABA ha sido detectada en todos los reinos a excepción de las arqueas bacterias (Hauser et al., 2011). Las cantidades de ABA a nivel celular están determinadas por un balance dinámico entre metabolismo y catabolismo, y en las plantas estos procesos están influenciados por factores relacionados al desarrollo y condiciones ambientales, como luz, salinidad y estrés hídrico (Cutler & Krochko, 1999).

En las plantas el ABA está involucrado en múltiples aspectos. Un alto nivel celular de ABA lleva a la síntesis de proteínas de reserva en semillas, promueve la tolerancia a desecación y la dormancia de las semillas (Finkelstein et al., 2002, Finkelstein et al., 2008) y inhibe la germinación. También juega un papel en el control de la formación de raíces laterales y el crecimiento de las plántulas (Xiong et al., 2006) y en la reducción de la cantidad de agua transpirada por la planta promoviendo el cierre estomático (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Además controla la expresión de un gran número de genes de respuesta a estrés (Hauser et al., 2011, Fujita et al., 2011, Raghavendra et al., 2010, Furihata et al., 2006, Gomez et al., 1988, Mundy & Chua).

1.1.1 ABA biosíntesis y transporte

La biosíntesis del ABA empieza en el cloroplasto por la vía independiente del ácido mevalónico, que lleva a la formación del carotenoide C₄₀ zeaxantina. Esto, después de varias reacciones, llega al último paso donde es transformado en xantoxina, un compuesto C₁₅, y otro metabolito C₂₅ por la enzima *9-cis-epoxy carotenoid dioxygenase* (NCED). Esta última reacción se considera el paso limitante y NCED la enzima llave en la biosíntesis del ABA (Tan et al., 1997).

La xantoxina es luego transferida al citosol donde es convertida a ABA por medio de dos reacciones enzimáticas: en la primera, es convertida a aldeído abscísico por una

enzima de la familia SDR (*short chain dehydrogenase/reductase*) y en el paso final es catalizado por una enzima AAO (*abscisic aldehyde oxidase*).

Como se ha dicho anteriormente, los niveles endógenos de ABA son mantenidos por medio de la interacción entre las vías metabólica y catabólica. Los productos del catabolismo del ABA (como el ABA glucosíl ester y el ácido fásico) son almacenados dentro de la vacuola o en el apoplasto. En condiciones de estrés hídrico, el ABA es liberado de la forma conjugada por las enzimas β -glucosidasa (Lee et al., 2006) y es transportado hasta las células de guardia donde su acumulación determina el cierre del estoma.

El transporte del ABA puede tener lugar de forma pasiva o activa. Se ha demostrado que el transporte de ABA hacia el exterior de la célula en respuesta a cambios en los valores de pH puede ocurrir sin transportadores específicos (Seo & Koshiba, 2011). La absorción de ABA al interior de la célula puede tener lugar por difusión o por medio de transportadores específicos. En *A. thaliana* donde por ejemplo han sido descubiertos varios transportadores de la familia *ATP-binding cassette* (ABC), entre los cuales se encuentran el AtABCG25 presente en el tejido vascular (Kuromori & Shinozaki, 2010) y el AtABCG40 presente en estomas y ambos están involucrados en la señalización por ABA (Kuromori & Shinozaki, 2010)

1.2 Señalización en plantas por ABA

El ABA juega un rol muy importante en la respuesta de las plantas a estrés hídrico y muchos trabajos han sido llevados a cabo para aclarar el mecanismo y los componentes esenciales de la señalización por esta fitohormona (Osakabe et al., 2014, Cutler et al., 2010, Umezawa et al., 2010).

El núcleo de la señalización comprende tres componentes principales, que forman un sistema de doble regulación negativa:

Los receptores de ABA PYR/PYL/RCAR (*pyrabactin resistance/pyrabactin like/regulatory component of ABA receptor*), las proteínas fosfatasa de tipo C grupo A

(PP2Cs, reguladores negativos) y las proteínas quinasas de tipo SnRK2 (*Sucrose non-fermenting(SNF)-1 related protein kinase 2*) (Ma et al., 2009b, Park et al., 2009b, Mustilli et al., 2002, Soon et al., 2012).

1.2.1 La proteínas PYR/PYL/RCAR: receptores de ABA

En *Arabidopsis*, estudios moleculares y estructurales han demostrado el rol central de los receptores PYR/PYL/RCAR en la percepción del ABA (Ma et al., 2009b, Park et al., 2009b, Miyazono et al., 2009, Melcher et al., 2009, Nishimura et al., 2009, Gonzalez-Guzman et al., 2012, Klingler et al., 2010).

El genoma de *Arabidopsis* codifica 14 PYR/PYL/RCAR, pequeñas proteínas altamente conservadas a nivel de secuencia aminoacídica, de las cuales 13 son capaces de interactuar con ABA y activar la señalización (Fujii et al., 2009): la unión con ABA determina cambios conformacionales que permiten a los receptores acoplarse con el sitio activo de las PP2Cs y inhibirlas (Yin et al., 2009).

1.2.2 Las fosfatasas PP2C de tipo A: reguladores negativos

de la señalización por ABA

En *Arabidopsis thaliana*, 76 genes codifican proteínas fosfatasas de tipo PP2C, clasificadas en 10 grupos distintos (A → J) y las PP2C que se han confirmado estar involucradas en la señalización por ABA pertenecen al grupo A (Schweighofer et al., 2004). Evidencias genéticas de por lo menos seis PP2Cs de este sub-grupo (ABI1, ABI2, PP2CA/AHG3, AHG1, HAB1 Y HAB2) demuestran su acción como reguladores negativos de la señalización por ABA (Leonhardt et al., 2004, Leung et al., 1994, Merlot et al., 2001, Meyer et al., 1994, Rodriguez et al., 1998, Umezawa et al., 2010). A nivel molecular presentan redundancia de funciones, pero actúan de forma específica en los distintos órganos y tejidos (Rubio et al., 2009, González-García et al., 2003).

1.2.3 La proteínas quinasas SnRK2s.

La identificación de las PP2Cs indica que la fosforilación de proteínas es un componente importante de la señalización por ABA, y de hecho se ha descubierto que muchas quinasas, sobretodo de tipo SnRKs (Soon et al., 2012), están involucradas en esta vía.

La familia de SnRKs (*SNF-1 related protein kinase*) comprende proteínas con propiedades serina/treonina quinasa, y se divide en tres sub-familias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3 (Kulik et al., 2011)

La sub-familia SnRK2 comprende quinasas específicas de las plantas involucradas en la respuesta a estreses abióticos y en aspectos del desarrollo dependientes del ABA (Hrabak et al., 2003, Yoshida et al., 2002). Las proteínas SnRK2s se dividen en tres sub-grupos (I, II y III) según su activación por ABA (Hrabak et al., 2003, Yoshida et al., 2002). Los miembros de grupo I se activan rápidamente por estrés osmótico pero no por ABA, mientras los de los grupos II y III se activan por ambos, aunque el sub-grupo II con ABA se activa solo débilmente (Boudsocq et al., 2004).

Los primeros resultados de la participación de las SnRK2s en la señalización por ABA se encontró en trigo (PKABA1, aislada de una librería de cDNA de embriones de trigo tratados con ABA (Anderberg & Walker-Simmons, 1992)) y en *Vicia faba* (AAPK (Li et al., 2000)), indicando una alta conservación en el reino vegetal. Estas quinasas pertenecen al subgrupo III, que comprenden las que son consideradas llaves fundamentales de la regulación de la transcripción génica dependiente de ABA. En *Arabidopsis* la familia de las SnRK2s comprende 10 miembros, y al grupo III pertenecen la SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6/OST1 (*Open Stomata 1*). Estas tres quinasas presentan redundancia parcial de las funciones, hecho demostrado con estudios del triple mutante que presenta incapacidad casi total de cerrar los estomas y insensibilidad al ABA con consecuente alteración de de la expresión génica relacionada a la respuesta de tolerancia, y de hecho estas plantas resultan ser muy sensibles a la sequía (Nakashima et al., 2009, Yoshida et al., 2002, Yoshida et al., 2006, Fujii & Zhu, 2009).

De las tres SnRK2s de *Arabidopsis*, OST1 tiene un papel fundamental en la regulación del cierre estomático en condiciones de falta de agua: su mutante es incapaz de resistir en condiciones de baja humedad debido a un grado insuficiente de

cierre de los estomas, indicando su importancia en la respuesta al estrés ambiental (Yoshida et al., 2002).

1.2.4 Mecanismo de señalización por ABA

El mecanismo de señalización dependiente de ABA, de la percepción hasta la regulación de la expresión génica, se resume en figura 1.2 (Umezawa et al., 2009)

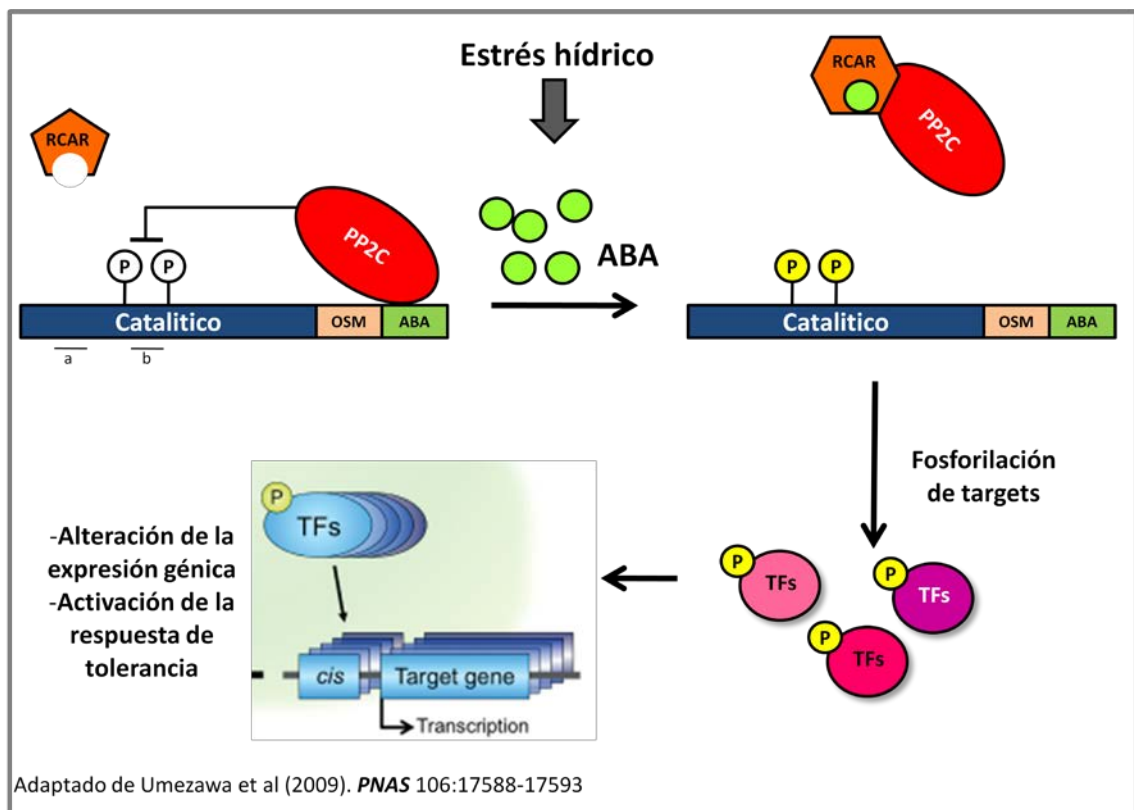


Figura 1.2: Esquema del mecanismo de señalización por ABA.

En condiciones óptimas para la planta (ausencia de ABA), la fosfatasa PP2Cs de tipo A inhibe la quinasa de tipo SnRK2 interaccionando de una forma constitutiva en la región C-terminal (en el dominio ABA) y de forma transitoria en el dominio catalítico, donde defosforila las serinas S171 y S175 en el *loop* de activación (b) (Soon et al., 2012). (a) ATP binding site. En presencia de ABA, el receptor PYR/PYL/RCAR se une a la fitohormona determinando un cambio conformacional en su estructura. El receptor puede así unirse a la fosfatasa inhibiéndola y determinando la liberación del *loop* de activación de la SnRK2 que así puede ser fosforilada (por auto-fosforilación o por otras

1. INTRODUCCIÓN

proteínas quinasas) y puede actuar la transducción de la señal, fosforilando moléculas sustrato (Umezawa et al., 2009).

En los últimos años muchos estudios han sido llevados a cabo con el intento de definir los sustratos de SnRK2 regulados en respuesta a ABA, con particular interés hacia los de la SnRK2.6/OST1, implicada en cierre de estomas, fundamental en la respuesta a sequía. Los principales sustratos de esta quinasa son factores de transcripciones, como los de la familia AREB/ABF (*ABRE-binding protein/ ABRE-binding factor*), específicos de la respuesta a ABA (Furihata et al., 2006)), NAC (Vilela et al., 2013) y de otras familias, como bZIP y bHLH (que se activan también bajo otros tipos de estreses, como osmótico y bajas temperaturas), que presentan un aumento de la transcripción en condiciones de falta de agua (Govind et al., 2009). Estos TFs una vez fosforilados reconocen y se unen a elementos *cis* en las secuencias promotoras de los genes targets y activan la cascada de la señal reprogramando la expresión génica y determinando la amplia gama de respuestas.

Analizando la secuencias promotoras de los genes que sufren cambios de los niveles transcripcionales debido al aumento de ABA, se ha visto que algunos elementos *cis* resultan muy representados a nivel de toda la planta mientras otros son específicos de ciertos tejidos. Las cajas ABREs (*ABA-responsive elements*, elementos *cis* de tipo G-box), a menudo en combinación con *coupling elements* (CEs), están muy representadas en los promotores de genes activados durante la sequía a nivel de toda la planta (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005, Fujita et al., 2011). La caja GTCGG es específica de las células guardia de los estomas y la caja TGCAA parece ser hoja-específica, las dos muy representadas entre los genes activados por ABA, mientras el motivo CAAGTTG resulta enriquecido en los genes inhibidos por ABA en ambos tejidos (Wang et al., 2011).

1.3 Los factores de transcripción

La regulación de la expresión génica es esencial para todos los organismos. Para ello se han desarrollado mecanismos de control complejos por medio de los cuales las plantas modulan su proceso de desarrollo y responden a situaciones de estrés biótico y abiótico.

El mecanismo más importante en esta regulación coordinada está mediado por los factores de transcripción que mediante su posibilidad de unión a secuencias específicas de DNA reconocen elementos *cis*-reguladores en el conjunto de sus genes diana. Dado su papel crucial en la regulación de la actividad génica coordinada se cree que los factores de transcripción han jugado un papel importante en la evolución de las plantas.

Además de reconocer motivos específicos de DNA en las regiones reguladoras de los genes (característica esencial para que una proteína se pueda definir como factor de transcripción), los TFs pueden modular la transcripción de genes interaccionando con otras proteínas. Dependiendo de la interacción proteína-proteína, un TF puede actuar como activador de algunos genes o represor de otros. En todos los organismos, una proporción elevada de genes codificantes se encuentra dedicada al control de la expresión génica, como por ejemplo en el caso de *Arabidopsis thaliana*: de los 27.416 genes que codifican proteínas el 6% codifica TFs (más de 1.700).

Se han identificado grandes familias de factores de transcripción en todos los eucariotas, dado que contienen regiones muy conservadas, que delimitan dominios de unión a ADN y de interacciones entre proteínas fácilmente identificables en las bases de datos nucleotídicas.

La función de algunos TFs se ha conservado entre plantas y animales aunque separados por más de mil millones de años de evolución, como por ejemplo miembros de la familia E2F que controlan funciones fundamentales del ciclo celular (**Inzé & De Veylder, 2006**). De todas formas, la mayoría de TFs se han alejado significativamente a nivel funcional a partir de la separación de plantas y animales, de hecho el 45% de los TFs de *Arabidopsis* pertenecen a familias específicas de las plantas. Como sucede en los animales, algunas familias de TFs se han expandido notablemente en determinadas especies de plantas, sugiriendo su implicación en la regulación de funciones específicas

(Dias et al., 2003, Shiu et al., 2005). Entre las familias de TFs que se han expandido significativamente en los últimos 600-1000 millones de años se encuentran proteínas MADs box, proteínas bZIP (basic-region leucine zipper proteins), MYB y proteínas bHLH (Becker et al., 2000, Riechmann et al., 2000, Shiu et al., 2005, Chen & Rajewsky, 2007)

1.3.1 Los factores de transcripción de tipo bHLH

1.3.1.1 Características generales

El dominio basic/helix-loop-helix (bHLH) es un motivo amino-acídico altamente conservado que define una superfamilia de factores de transcripción, la segunda clase más numerosa de TFs en plantas. Fue descrito por primera vez en animales (Murre et al., 1989) y luego encontrado en los principales linajes eucariotas. Las proteínas que contienen este dominio están involucradas en numerosos procesos esenciales tanto fisiológicos como de desarrollo (algunos ejemplos: neurogénesis, miogénesis y desarrollo del corazón en animales (Massari & Murre, 2000b, Jones, 2004); absorción de fosfato y glicolisis en levadura (Robinson & Lopes, 2000), modulación de varias rutas del metabolismo secundario, diferenciación de la epidermis y de los estomas y respuestas a factores ambientales y estrés en plantas (Pillitteri & Torii, 2012, Ramsay & Glover, 2005, Castillon et al., 2007, Liu et al., 2014)).

1.3.1.2 El dominio bHLH

El motivo bHLH, altamente conservado, está constituido por aproximadamente 60 amino ácidos; a lo largo de esta secuencia se distinguen dos regiones funcionalmente diferentes (figura): una zona básica y un dominio HLH (helix-loop-helix).

1. INTRODUCCIÓN

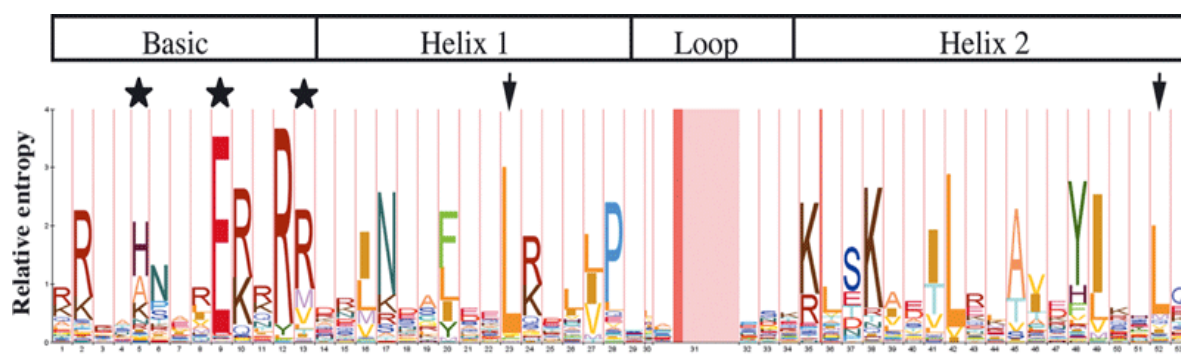


Figura 1.3: Logotipo del dominio bHLH.

Los residuos aminoacídicos H5, E9 y R13 en el dominio básico, fundamentales para la unión a DNA, están marcados con estrellas. Los residuos importantes para la capacidad de dimerización en el dominio HLH están indicados por flechas. El logotipo fue generado por el método descrito en [Schuster-Boeckler *et al.* \(2004\)](#), disponible en <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/software/analysis/logomat-m.cg> (Feller *et al.*, 2011)

La **región básica**, ubicada en la parte N-terminal del dominio, consiste en 13-17 aminoácidos principalmente básicos y es normalmente responsable de la unión a DNA. Dominios básicos que contienen por lo menos 5 residuos aminoacídicos básicos y que conservan el HER motif (Histidina5, Glutamina9 y Arginina13, marcados con estrella en la figura; es un motivo destacado en más del 50% de las bHLH de plantas) que presentan capacidad de unión al DNA (Atchley & Fitch, 1997, Massari & Murre, 2000a, Toledo-Ortiz *et al.*, 2003a). La secuencia canónica de DNA reconocida por estas proteínas es el hexámero E-BOX (5'-CANNTG-3'), donde las N pueden ser cualquier nucleótido, y la más comúnmente reconocida es la palindrómica G-BOX (5'-CACGTG-3', el HER motif de hecho es de unión a la G-BOX). En la zona básica, algunos residuos determinan el reconocimiento del núcleo de la secuencia consenso, mientras otros residuos definen la específica E-BOX reconocida (Robinson & Lopes, 2000). Además, para la afinidad y fuerza de esta interacción contribuyen también los nucleótidos flanqueantes de los hexámeros de unión (Grove *et al.*, 2009, Gordân *et al.*, 2013, Atchley *et al.*, 1999, Massari & Murre, 2000a).

Hay algunos casos en que esta zona no es tan básica y/o faltan de los residuos Glu9 y Arg13 (necesarios para la unión a las E-BOX), dando como resultado la incapacidad de contactar con el DNA (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003a). Estas proteínas pueden actuar como reguladores negativos, formando heterodímeros incapaces de unirse al DNA (o sea secuestrando bHLHs que de otra manera crearían dímeros funcionales (Fairman *et al.*, 1993)).

La **región HLH** (helix-loop-helix), localizada en la zona C-terminal, está constituida principalmente por residuos aminoácidos hidrofóbicos que forman dos α -hélices anfipáticas separadas por un bucle con secuencia y longitud variable (Nair & Burley, 2000). Esta región confiere a la proteína capacidades de homo/hétero-dimerización (Murre et al., 1989) con otras proteínas bHLH, pre-requisito para el reconocimiento del DNA y especificidad de unión. La estructura dimérica es estabilizada por residuos hidrofóbicos, como Isoleucina (I) Leucina (L) y Valina (V) (Atchley et al., 1999). Por ejemplo, para que la dimerización tenga lugar, los residuos de Leucina23 (presente en el 99% de los bHLH de plantas) y Leucina52 son estructuralmente necesarios para la proteína MAX de mamíferos (Brownlie et al., 1997) y la proteína PAR1 de *Arabidopsis* (Carretero-Paulet et al., 2010). Una Prolina (P) altamente conservada termina la primera hélice y empieza el loop (generalmente de 6 a 9 residuos aminoácidos en plantas (Atchley et al., 1999)).

La capacidad de dimerizar de esta clase de TFs puede estar afectada *in-vivo* por numerosas variables, como la interacción entre las cargas de los residuos aminoácidos, la inter-relación entre cargas hidrofóbicas y la disponibilidad de “partners” (Toledo-Ortiz et al., 2003a).

Además, el dominio bHLH en algunas proteínas puede dimerizar también con otras proteínas no-bHLH (Herold et al., 2002, Hernandez et al., 2007).

El reconocimiento de diferentes E-BOX y la capacidad de dimerizar proporcionan características por las que los TFs bHLH pueden determinar una muy amplia y variada gama de programas de transcripción (Fairman et al., 1993).

1.3.1.3 Clasificación de los TFs bHLH y otras características

Fuera del dominio bHLH, las proteínas de la familia divergen considerablemente (Atchley et al., 1999, Li et al., 2006, Heim et al., 2003). Los TFs bHLH han sido clasificados en base a varias características. El sistema más frecuentemente utilizado se basa en las relaciones evolutivas y considera la especificidad de unión al DNA, la presencia de residuos aminoácidos conservados en ciertas posiciones del dominio y la posible presencia de otros motivos repetidos (en plantas han sido encontrados 28 de estos motivos conservados (Pires & Dolan, 2010)) o dominios funcionales además del

1. INTRODUCCIÓN

bHLH (Atchley & Fitch, 1997). Según estos criterios, en animales las proteínas bHLH han sido clasificadas en seis grupos principales (definidos con letras de la A a la F) ([Atchley and Fitch 1997](#)).

El análisis filogenético más reciente, realizado con más de 500 secuencias de bHLHs, ha permitido clasificar los TFs bHLH de plantas en 26 subgrupos (Pires & Dolan, 2010)(figura 1.4) y un análisis filogenético de los bHLHs atípicos ha llevado a extender el número de subgrupos a 32 (Carretero-Paulet et al., 2010).

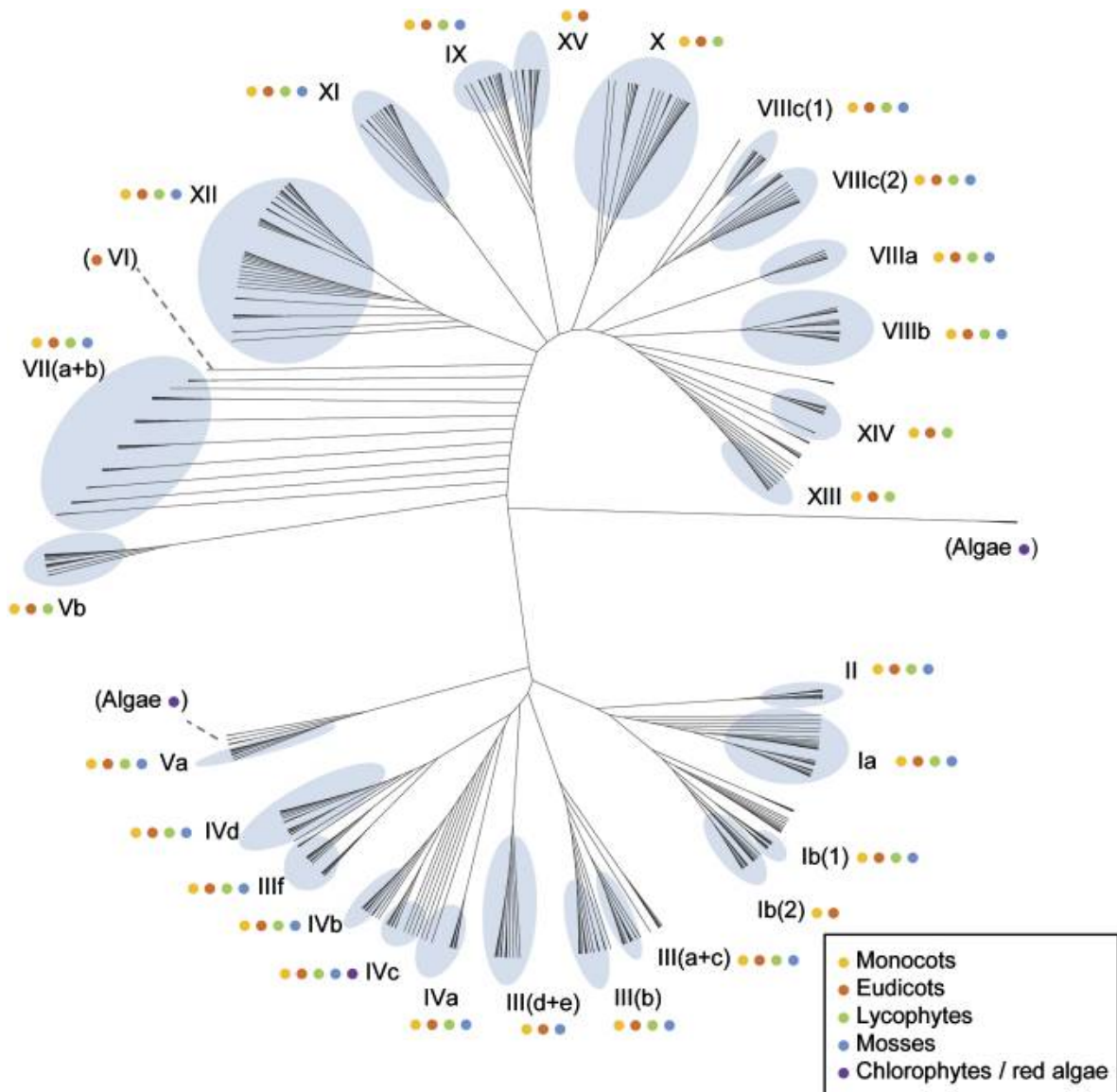


Figura 1.4: árbol filogenético de bHLH TFs en plantas

El análisis de la alineación de 544 bHLHs de plantas muestra un cladograma sin raíces. Los círculos azules delimitan las 26 subfamilias de proteínas bHLH en plantas. Los puntos de colores simbolizan las especies a las que pertenecen la proteínas en cada grupo (amarillo: *Oryza sativa* [monocot]; rojo: *Arabidopsis thaliana* [eudicot]; verde: *Selaginella moellendorffii* [lycophyte]; azul: *Physcomitrella patens* [moss]; lila: *Volvox carteri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Ostreococcus tauri*, y *Cyanidioschyzon merolae* (chlorophytas y algas rojas). (Pires & Dolan, 2010)

1. INTRODUCCIÓN

De la grafica resulta que de los 26 subgrupos, 20 se encontraban ya en las primeras plantas terrestres hace 443 Ma, por la cual época los musgos se separaron de las plantas vasculares; no obstante los numerosos eventos de duplicaciones génicas (*intra-cromosomal* y *inter-cromosomal*) en algunos linajes y de perdida en otros, estas subfamilias se han conservado a lo largo de la evolución de las plantas (Pires & Dolan, 2010). Siempre Pires y Dolan (2010) evidenciaron la falta de agrupamiento de bHLHs de plantas con las de otros organismos eucariotas, confirmado por estudios anteriores que resaltaban el parentesco lejano entre las bHLHs de angiospermas y las de animales (Ledent & Vervoort, 2001, Buck & Atchley, 2003, Toledo-Ortiz et al., 2003a). La falta de relaciones filogenéticas distinguibles entre las subfamilias de plantas y de otros organismos eucariotas soporta la hipótesis que las bHLHs de plantas sean monophyleticas (Pires & Dolan, 2010).

Miembros de los mismos subgrupos comparten características como: la organización intrón-exón, la posición a lo largo de los cromosomas (Toledo-Ortiz et al., 2003b) y presencia de secuencias conservadas o de dominios funcionales alternativos (como el dominio leucine-zipper, ubicado adyacente al bHLH y que resulta importante para la estabilidad de dimerización y especificidad de unión a DNA (Kanaoka et al., 2008) (Bresnick & Felsenfeld, 1994); así como el dominio ACT fold, que en los factores bHLH actúa como dominio de dimerización (Feller et al., 2006)).

Los bHLHs del mismo subgrupo a menudo están involucrados en los mismos procesos biológicos, y sus funciones se solapan, como por ejemplo GL3, EGL3 y TT8 tienen funciones redundantes en el control de la biosíntesis de antocianinas (Zhang et al., 2003, Nesi et al., 2000), aunque en estos casos a menudo resultan haber desarrollado funciones adicionales (Zhang et al., 2003, Nesi et al., 2000, Zimmermann et al., 2004).

Los patrones de expresión y el espectro de acción son muy distintos entre los diferentes bHLHs: algunos se expresan constitutivamente en la planta, otros solo en tejidos específicos o estadios de desarrollo, algunos están involucrados en varios procesos biológicos y otros exclusivamente en procesos específicos. Por ejemplo, ICE1 es una proteína bHLH expresada constitutivamente en *Arabidopsis* y tiene un amplio espectro de acción: actúa en la respuesta de aclimatación al frío y de tolerancia a la congelación y ha demostrado ser capaz de unirse a distintas cajas E-BOX en ensayos *in-vitro* y de activar la transcripción en ensayos de expresión transitoria en *Arabidopsis*,

sugiriendo su capacidad de poder actuar sin otros bHLHs (Chinnusamy et al., 2003). También, ICE1, junto con SCRM2, son necesarios en cada paso de la diferenciación de los estomas (de célula meristemática hasta célula de guardia), mientras otros bHLH altamente relacionados y tejido-específico MUTE, FAMA y SPCH regulan cada uno exclusivamente un paso de este proceso de diferenciación (Pillitteri & Torii, 2012, Ohashi-Ito & Bergmann, 2006, Kanaoka et al., 2008, Pillitteri et al., 2007).

1.3.2 Los TFs bHLH en la adaptación a la sequía.

Los TFs bHLH están involucrado en varios procesos importantes de las plantas para hacer frente a la falta de agua, como el desarrollo de los estomas (Pillitteri & Torii, 2007), la formación de raíces aéreas (Zhao et al., 2008), y la regulación del metabolismo hormonal del ABA (Abe et al., 2003).

La densidad estomática en las hoja está controlada por dos vías genéticas: una basal que lleva a la diferenciación del estoma y una vía de regulación negativa que inhibe este proceso (MacAlister et al., 2007). Tres TFs bHLH representan la vía basal: SPCH, MUTE y FAMA.

SPCH (*SPEECHLESS*), expresado en la epidermis, regula la división celular asimétrica que produce un meristemoide (Pillitteri & Torii, 2007, MacAlister et al., 2007). MUTE, altamente expresado en la célula del meristemoide y a niveles bajos en la célula madre de las células de guardia, activa la transición entre los dos tipos de células (Pandey et al., 2013). Finalmente, FAMA determina la diferenciación de las células de guardia (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006). La acción secuencial de estos tres genes está influenciada por los genes SCRM/ICE1 (*SCREAM/INCUCER OF CBF EXPRESSION 1*) y SCRM2, permitiendo a las células iniciar el proceso de diferenciación estomática (Kanaoka et al., 2008).

En respuesta a señales ambientales, como la deshidratación, se activa la inhibición de la vía basal, de la que forman parte dos genes principales: en situación de falta de agua, el TFs GTL1 afecta a la densidad estomática inhibiendo la expresión del regulador negativo SDD1 (*STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1*) y determinando la activación de la vía de la MAPK que reprime la vía basal. El resultado es un menor

1. INTRODUCCIÓN

número de estomas, pues la transpiración se reduce mejorando la eficiencia de retención del agua en la planta (Yoo et al., 2011).

La manipulación genética de los genes de la vía basal SPCH, MUTE y FAMA determina cambios radicales en el fenotipo de desarrollo estomático (Ohashi-Ito & Bergmann, 2006) (Pillitteri & Torii, 2007), mientras la manipulación genética de los genes reguladores o inhibidores de la vía basal podría llevar a resultados interesantes para potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Dos estructuras que pueden mejorar la tolerancia de las plantas a la sequía son los tricomas y las raíces aéreas: los primeros protegen del estrés incrementando la superficie de las hojas y reduciendo la absorción de la radiación solar (Tezara et al., 2011), mientras las segundas aumentan la capacidad de absorción de agua y nutrientes del terreno (Tanaka et al., 2014). Muchos genes de la familia bHLH forman parte de las vías de desarrollo de estas estructura (Payne et al., 2000, Bernhardt et al., 2003, Masucci & Schiefelbein, 1994).

Entre los genes que responden a ABA en condiciones de falta de agua, dos proteínas bHLH, RD29A y RD29B, resultan fuertemente activados. En *Arabidopsis*, el promotor de RD29A contiene una caja ABRE (*ABA- Responsive Element*) y también una caja DRE (*Dehydration- Responsive Element*), mientras el estudio del promotor de RD29B ha demostrado su relación con la síntesis de ABA en condiciones de déficit hídrico (Bihmidine et al., 2013). Otro bHLH descrito es el RD22 (*RESPONSIVE TO DESSICATION 22*): su promotor contiene motivos de unión típicos de los factores de transcripción MYC y MYB (Abe et al., 2003), muy representadas en los genes inducidos por sequía en células de guardia de los estomas de *Arabidopsis* (Pellegrineschi et al., 2004).

Los promotores de varios genes bHLH han sido utilizados para la transgénesis eficiente de genes de interés para mejorar la respuesta de tolerancia a estrés hídrico, y esta estrategia ya ha sido aplicada con buenos resultados en varias especies, como trigo (Pellegrineschi et al., 2004) y soja (Bihmidine et al., 2013).

Otros factores de transcripción bHLHs tienen roles importantes en mecanismos de protección. El PIF4 (*Phytochrome-Interactin Factor 4*) por ejemplo en condiciones de

1. INTRODUCCIÓN

altas temperaturas aumenta su expresión y contribuye a la aceleración de la floración activando el gen *Flowering Locus T* (Kumar et al., 2012). SPT (*SPATULA*) responde a estímulos ambientales reduciendo la región meristemática en los primordios de las hojas, influyendo en la determinación del tamaño final de las hojas (Ichihashi et al., 2010).

En *Arabidopsis*, el TF AKS2 (*ABA Responsive Kinase Substrate*) de tipo bHLH está involucrado en abertura de estomas. Estimula la transcripción del gen codificante del canal iónico KAT1 (que facilita la entrada del ion potasio al interior de la célula) en las células guardia de los estomas. Además, ha sido comprobado que la acción del AKS2 resulta inhibida consecuentemente a su fosforilación actuada por la quinasa AtOST1, y que esto ocurre en condiciones de estrés que llevan a un aumento del ABA (Takahashi et al., 2013).

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El maíz (*Zea mays*) se encuentra entre las principales especies cultivadas a nivel mundial. Teniendo un sistema radical poco profundo, su producción resulta ser estrictamente dependiente del aporte de agua proporcionado por las precipitaciones atmosféricas y la irrigación. Su sensibilidad a la falta de agua hace que su mejora genética sea de particular interés para incrementar su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y su eficiencia de utilización del agua.

El ABA es la principal fito-hormona involucrada en la respuesta de tolerancia a sequía y estrés osmótico de las plantas. El núcleo de la señalización por ABA comprende tres componentes principales: los receptores PYR/PYL/RCAR las proteínas fosfatasas PP2Cs del grupo A y las proteínas quinasa de tipo SnRK2 (Mustilli et al., 2002, Ma et al., 2009a, Park et al., 2009a, Soon et al., 2012)

Trabajos realizados en nuestro laboratorio permitieron caracterizar una proteína quinasa SnRK2 en maíz, la ZmOST1 que complementa el mutante de pérdida de función de *Arabidopsis* (*ost1-2*) en la respuesta a sequía (Vilela et al., 2013). Con el fin de identificar posibles sustratos de la quinasa, involucrados en la vía de señalización por ABA se realizó un estudio de interacción proteína-proteína llevado a cabo por medio de un cribado de doble híbrido en levadura, en el que se utilizó ZmOST1 como anzuelo frente a una librería de cDNAs de hoja joven de maíz deshidratada.

La finalidad de este trabajo es la caracterización de una proteína interactora con ZmOST1 que contiene un dominio bHLH y que puede estar involucrada en la regulación de la respuesta al ABA y al estrés abiótico en el maíz.

2. OBJETIVOS

Para ello nos planteamos 2 Objetivos principales:

1- Caracterización Molecular del factor de transcripción ZmKS

1.1 Estudio del patrón de expresión y localización subcelular

1.2 Determinación de su capacidad de unión a DNA y detección de secuencias cis reconocidas por bHLH

1.3 Estudio de la interacción y fosforilación *in vitro* e *in vivo* de ZmKS por ZmOST1

2- Caracterización Funcional del factor de transcripción ZmKS

2.1 Obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y maíz con alteraciones en los niveles de expresión de ZmKS.

2.2 Estudio en planta del efecto de la sobre-expresión del factor en distintos procesos fisiológicos. Se han realizado los siguientes ensayos funcionales:

2.2.1 Ensayo de Germinación

2.2.2 Cierre y apertura estomática

2.2.3 Ensayo de pérdida de agua

2.2.4 Ensayo de floración

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Como se ha descrito en la sección anterior, por medio de un cribado de doble híbrido en levadura, en nuestro grupo se encontraron posibles sustratos de la quinasa SnRK2.8/ZmOST1 de maíz. Se ha decidido caracterizar el clon 44, definido por el gen GRMZM2G114873 en maíz, correspondiente a una proteína de tipo bHLH.

Inicialmente se empezó este trabajo con la secuencia extraída del cribado de doble híbrido y se realizaron varios experimentos de caracterización de la proteína como factor de transcripción y de interacción con la quinasa ZmOST1. A este factor se le denominó ZmKS (*kinase substrate*).

Posteriormente, debido a actualizaciones en la secuenciación del genoma de maíz, encontramos que el gen tenía otro inicio de traducción a 5' y que codificaba para una proteína más larga con una secuencia central aminoacídica idéntica a la caracterizada previamente (dominio bHLH) que pero difería en su extremo N-terminal por 129 aminoácidos más y por un C-terminal más corto (40 aminoácidos menos). Por tanto hay dos isoformas que corresponden a dos formas de *splicing* diferencial del mismo gen. Por esta razón se denominará ZmKS1 a la proteína resultante del primer inicio de traducción y ZmKS2 a la del segundo (Figura 3.1).

Este dato nos ha dado la opción de poder explorar posibles diferencias funcionales de las dos isoformas en el último período de este trabajo.

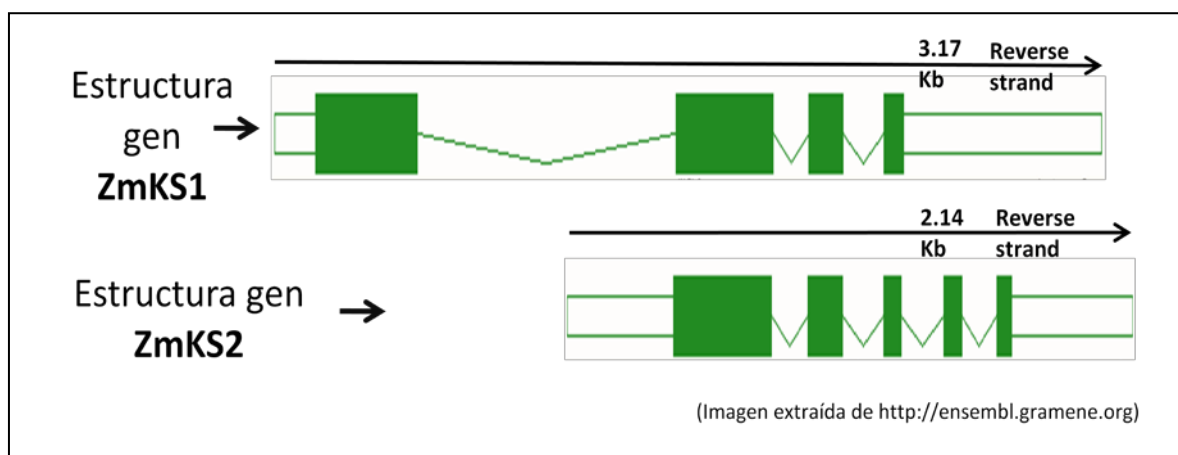


Figura 3.1: Estructura de los genes ZmKS1 y ZmKS2.

3.1 Caracterización del factor de transcripción ZmKS.

3.1.1 Caracterización molecular

Con el fin de identificar las posibles proteínas interactoras de la quinasa ZmOST1, en nuestro laboratorio se realizó un estudio preliminar de interacción proteína-proteína llevado a cabo por medio de un cribado doble híbrido en levadura, en el que una librería de cDNA de hoja joven de maíz deshidratada durante 3 horas fue utilizada como cebo contra la ZmOST1 utilizada como anzuelo. Además se comprobó que la interacción fuera directa por medio del ensayo *in vitro* "TnT pull-down". (Vilela et al., 2013).

Entre las proteínas que dieron resultado positivo se decidió caracterizar el clon 44, definido por el gen no caracterizado GRMZM2G114873 de maíz (ubicado en el cromosoma 3) que codifica un factor de transcripción de tipo bHLH.

Como se ha dicho en la sección anterior, la primera isoforma aislada fue el ZmKS2 (figura 3.2): a nivel de secuencia, el gen está constituido por 5 exones y 4 intrones y codifica una proteína de 228 aa, donde en la zona C-terminal se ubica el dominio bHLH (del aa 155 al 205). En el caso de la isoforma ZmKS1 (mas larga; figura 3.3) está constituido por 4 exones y 3 intrones y codifica una proteína de 318 aa, donde el dominio bHLH se ubica al final de la zona C-ter (del aa 284 al 318).

En las figuras 3.2 y 3.3, el dominio bHLH se ha subrayado en naranja, y se han marcado con triángulos los aminoácidos muy conservados en este tipo de dominio: en verde los que corresponden al motivo HER de unión a DNA (en verde oscuro está marcado el cambio con el otro aa básico arginina, R, en lugar de una histidina, H) y en azul la leucina, L, necesaria para la dimerización.

3. RESULTADOS

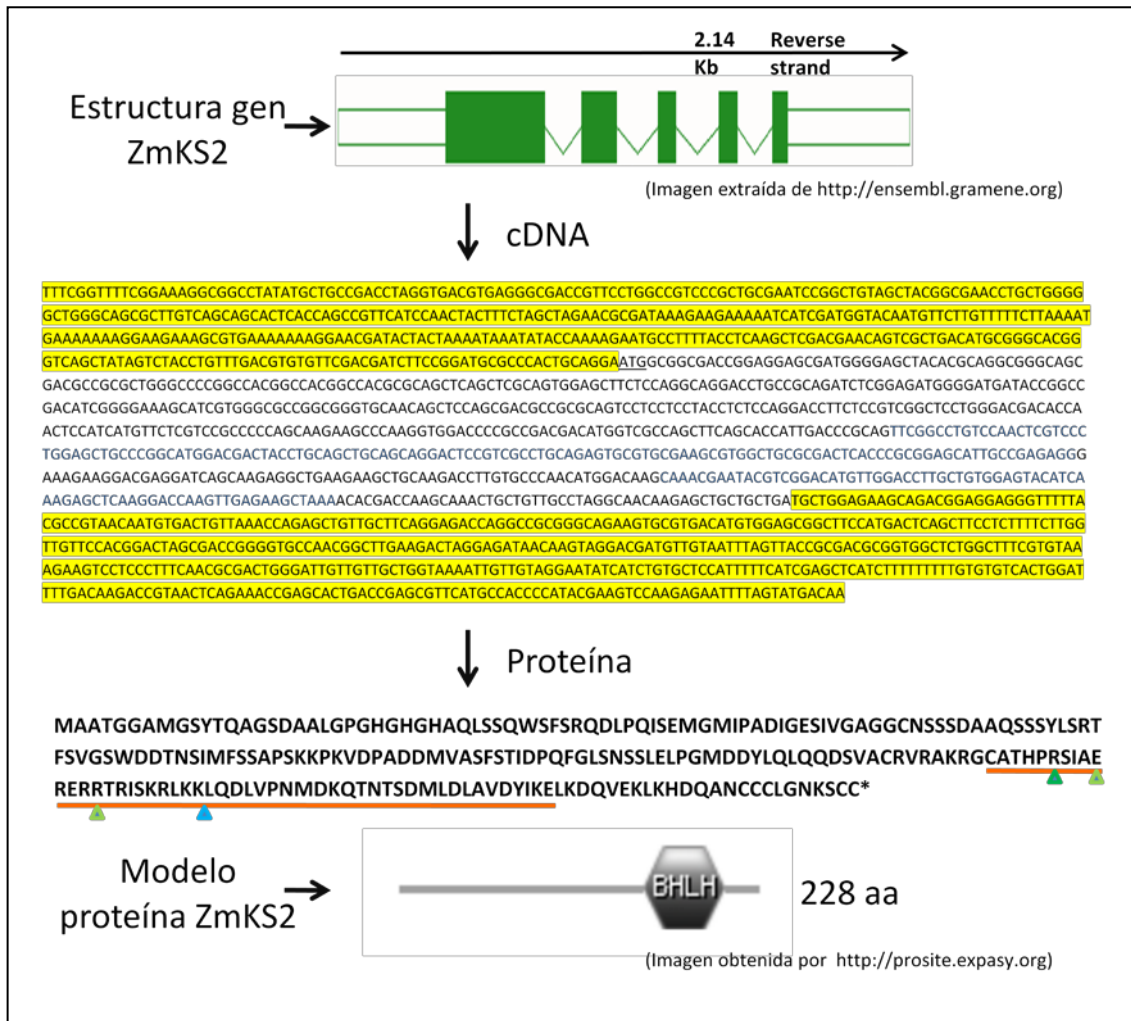


Figura 3.2: Estructura génica, cDNA, secuencia aminoacídica y modelo de la proteína ZmKS2.

En la secuencia de cDNA, las regiones 3'UTR y 5'UTR están marcadas en amarillo, mientras en la secuencia codificante los diferentes exones están marcados en negro y azul. En la secuencia aminoacídica de la proteína se han marcado en naranja los aa que constituyen el dominio bHLH y con triángulos los aa conservados en la zona básica.

3. RESULTADOS

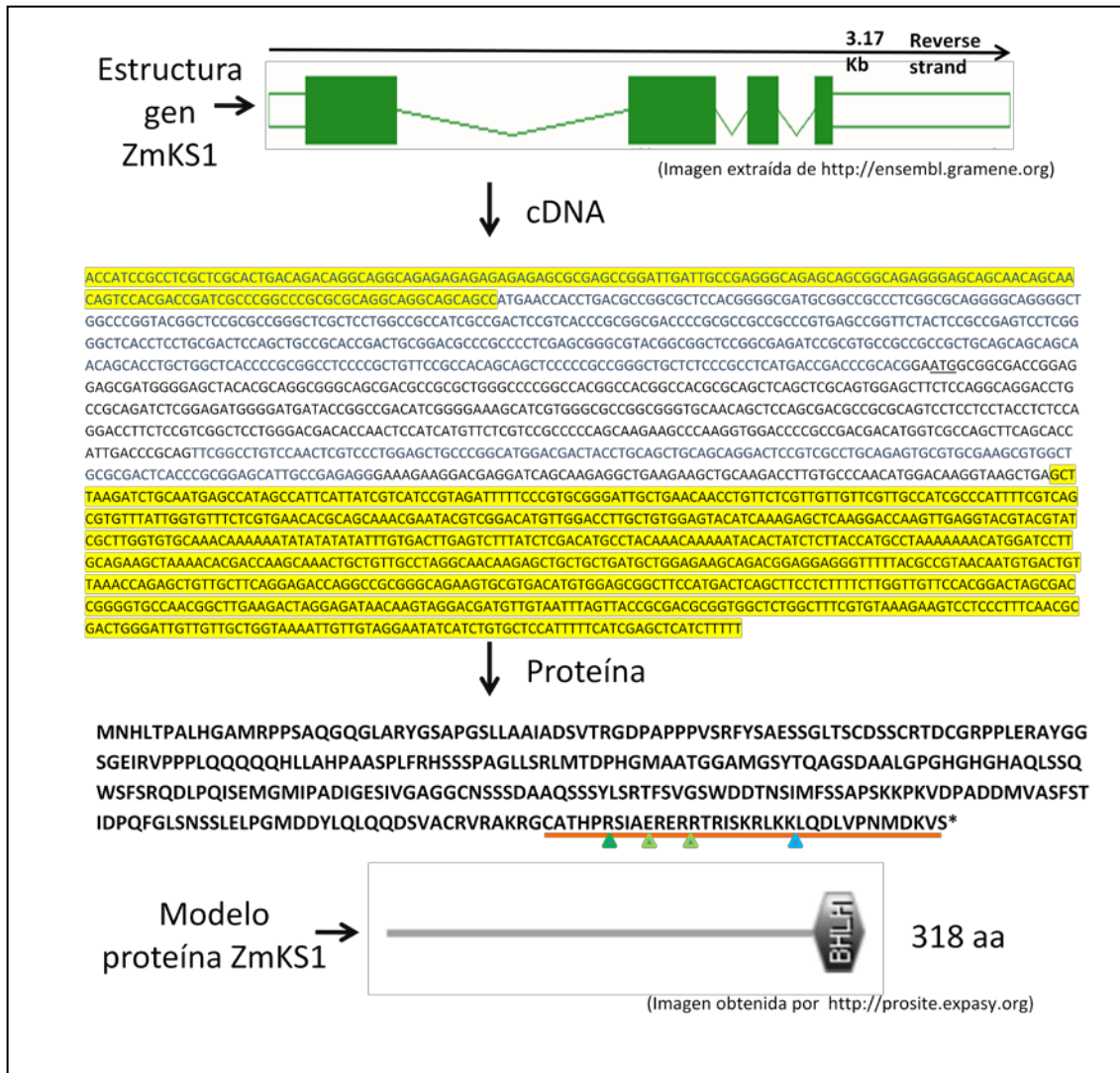


Figura 3.3: Estructura génica, cDNA, secuencia aminoacídica y modelo de la proteína ZmKS1.

En la secuencia de cDNA, las regiones 3'UTR y 5'UTR están marcadas en amarillo, mientras en la secuencia codificante los diferentes exones están marcados en negro y azul. En la secuencia aminoacídica de la proteína se han marcado en naranja los aa que constituyen el dominio bHLH y con triángulos los aa conservados en la zona básica.

Analizando las secuencias de las dos isoformas, hemos visto que en la base de datos de maíz se identifican 7 genes descritos como parálogos: en algunos han sido indentificados los dominios bHLH, mientras otros han sido descritos solo como codificantes de proteínas de posible unión a DNA (fuente: www.gramene.org). En realidad, las homologías de secuencias con las ZmKSs son muy bajas y se concentran en el dominio bHLH, lo que parece indicar que pertenecen a la super-familia de TFs

3. RESULTADOS

bHLH, pero no hay informaciones suficientes para suponer que constituyen una sub-familia de este grupo.

Comparando las dos proteínas (figura 3.4), ZmKS1 tiene alrededor de 130 aa mas en la zona N-ter (codificados por el primer exón, figura 3.3) y faltan los últimos 16 aa en el dominio bHLH (figura 3.4), mientras la proteína ZmKS2 posee 41 aa mas en la zona C-ter (correspondientes a los últimos 2 exones del gen (figura 3.2)).

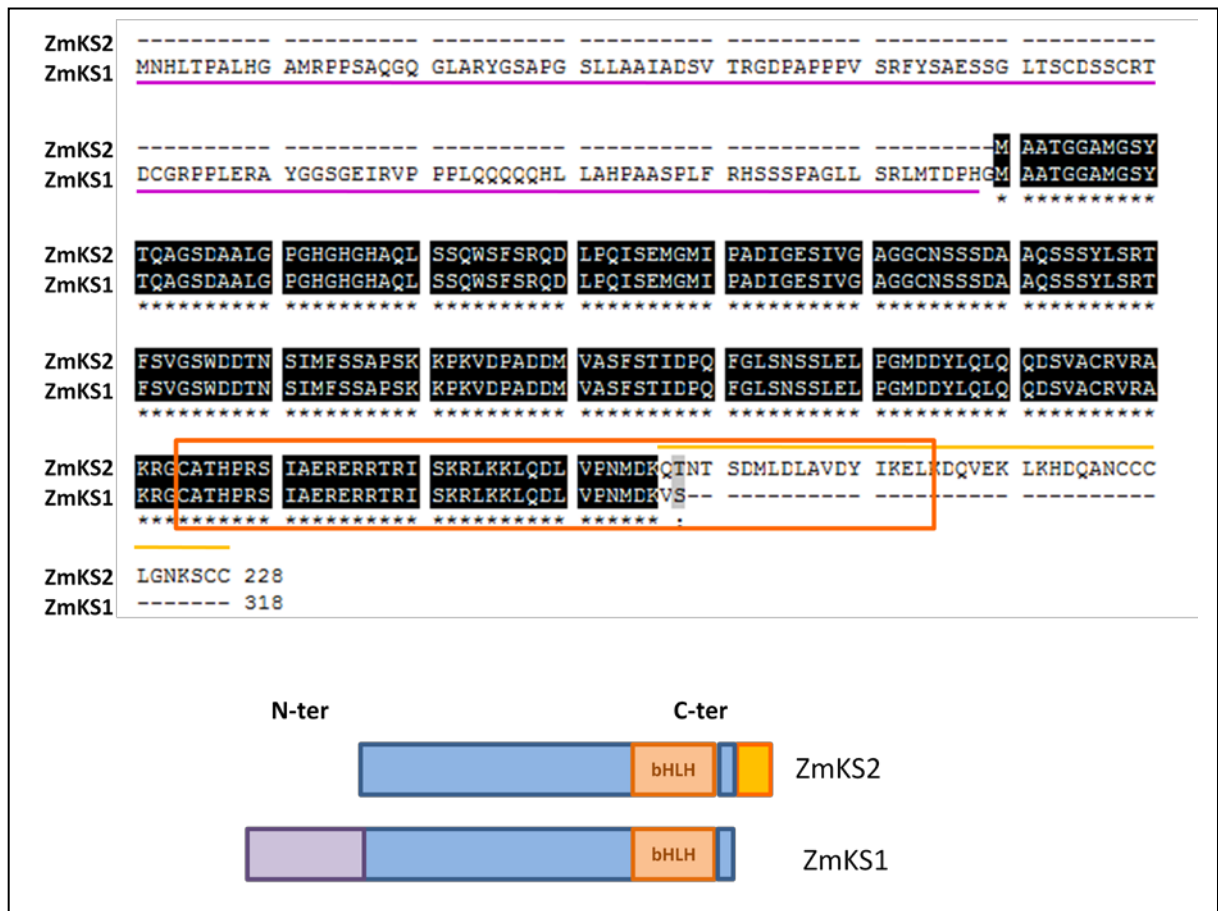


Figura 3.4: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ZmKS2 y ZmKS1

En lila se marcan los 129 aa presentes solo en la zona N-ter del ZmKS1; en amarillo, los 41 aa presentes solo en la zona C-ter del ZmKS2; con recuadro naranja, el dominio bHLH. En los modelos de las proteínas se han marcado también las dos zonas divergentes en lila y amarillo.

En otras especies se han encontrado 48 genes definidos como ortólogos de ZmKS. La gran mayoría de estos no ha sido descritos en detalle, aunque para casi todos se detallan características particulares como la capacidad de dimerización, de

3. RESULTADOS

unión a DNA y/o la presencia del dominio bHLH (fuente: www.gramene.org). En general, como en el caso de los genes parálogos, la homología se concentra en la zona del dominio bHLH.

Dos de estos genes han sido descritos en *Arabidopsis thaliana* como TFs de tipo bHLH y nombrados AKS1 (gene codificante: At1g51140) y AKS2 (gene codificante: At1g05805), juntos con el AKS3 (gene codificante: At2g4228) que pero no salía en la lista de potenciales ortólogos. AKS1 y 2 han sido relacionados con abertura de estomas, estimulando la transcripción del gen codificante del canal iónico KAT1 (que facilita la entrada del ion potasio al interno de la célula) en las células guardia de los estomas. Además, han sido reconocidos como sustratos de fosforilación de la quinasa AtOST1: la fosforilación inhibe la acción de los dos TFs contribuyendo así al cierre estomático y esto ocurre en condiciones de estrés que llevan a un aumento del ABA (Takahashi et al., 2013).

Debido a estas características, se ha decidido analizar más en detalle similitudes a nivel de secuencias aminoacídicas.

En la figura 3.5, se han alineado las secuencias aminoacídicas de ZmKS1 y 2 con las de AtAKS1, 2 y 3.

El grado de identidad entre las proteínas de maíz y AKS1 y 2 de *Arabidopsis thaliana* es alrededor de 20%.

Sin embargo, los dominios bHLH (marcados con rectángulo naranja) y unos doce aminoácidos anteriores resultan ser muy conservados entre las 5 proteínas, prácticamente idénticas en la zona responsable de la unión a DNA (la primera parte del dominio). Esto nos sugirió una conservación de esta funcionalidad.

En azul se han evidenciados dos motivos de unión a las proteínas 14:3:3 (RXXpSXP) conservados en la zona N-terminal de la proteína larga ZmKS1 y de las tres AKSs. Se ha descrito que los factores AKSs se unen a las proteínas 14:3:3 de forma dependiente de ABA y consecuentemente a ser fosforilados por la quinasa AtOST1 (Takahashi et al., 2013). Pues, este mecanismo podría ser conservado para ZmKS1, y ser causa de una regulación diferencial de las dos isoformas de ZmKSs, debido a la falta en la isoforma más corta, ZmKS2, de los dos motivos de unión a proteínas 14:3:3.

3. RESULTADOS



Figura 3.5: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ZmKS2 y de las tres proteínas AKS de *Arabidopsis*.

Marcado con el rectángulo naranja se evidencia el dominio bHLH. En azul están marcados los motivos RXXpSXP de unión a las proteína 14:3:3.

3.1.2 Expresión en maíz

Por medio de análisis de real time PCR, se ha realizado un análisis por rtPCR de la expresión en diferentes tejidos del gen *ZmKS* en maíz, y para averiguar variaciones en diferentes condiciones de estrés abiótico. Los primers utilizados para cada isoforma fueron: C-ter_largo_F1 *forward* y 3'UTR-largo_R1 *reverse* para el *ZmKS1*; C-ter_F2 *forward* y 3'UTR_R1 *reverse* para *ZmKS2*.

Debido a que *ZmKS* es sustrato de OST1, kinasa que responde a ABA y a estrés hiperosmótico y que los genes ortólogos ASKs en *Arabidopsis* también responden a ABA, se estudió si el gen *ZmKS* en maíz respondía también a estos tratamientos. El tratamiento se ha realizado con plántulas de maíz de 7 días crecidas en sistema hidropónico: la raíz se ha sumergido en medio líquido 0,5X MS, suplementado o no con 100 μ M ABA y 250 mM NaCl.

Para comprobar que los tratamientos habían tenido lugar correctamente, como control positivo se han analizado los niveles de expresión de la proteína de maíz Rab17 (Goday et al., 1994)(gráfica no incluida).

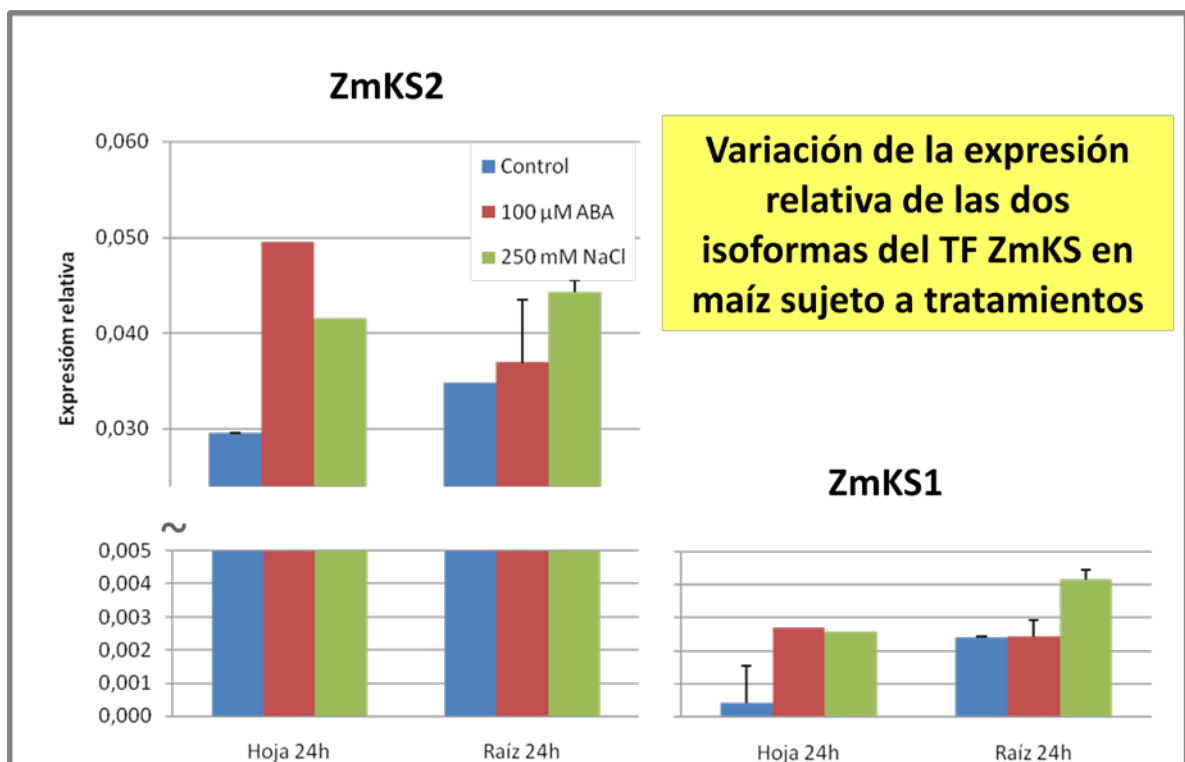


Figura 3.6: Real time PCR de la expresión de *ZmKS* en maíz

3. RESULTADOS

Sin embargo es evidente que los niveles de transcritos de la isoforma más larga ZmKS1 son mucho más bajos respecto a los de ZmKS2.

En hoja, a las 24 horas de tratamientos con ABA y NaCl los niveles de expresión de ambas isoformas muestran un aumento, comparando con los respectivos controles, especialmente para ZmKS1 que aumenta cerca de 5 veces. En raíz, el estrés salino determina un ligero aumento de la expresión de ambos transcritos, mientras que el tratamiento con ABA no determina cambios sustanciales en los valores de expresión relativa de ZmKS1 y 2 comparados con los respectivos controles. La respuesta a ABA de todas formas es evidente pero no comparable a la de otros genes involucrados en la respuesta de tolerancia a estreses abióticos como sequía y estrés hiperosmótico. Un ejemplo es el gen de maíz *rab28*, codificante una proteína LEA (*Late Embryogenesis Abundant protein*) que incrementa considerablemente sus niveles de expresión tras tratamiento con esta fitohormona (Pla et al., 1991).

3.1.3 Obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con el promotor génico de ZmKS fusionado a GUS

Para obtener informaciones sobre el patrón de expresión del ZmKS en planta, hemos generado plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* transformando plantas LER (ecotipo Landsberg erecta) por *floral dip* con una construcción de 1100 bp del promotor del gen ZmKS fusionado a GUS.

De un análisis previamente hecho *in silico* de estas 1100 bp ([HTTP://PLANTPAN.MBC.NCTU.EDU.TW/SEQ_ANALYSIS.PHP](http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php)), se han encontrado una TATA box, dos cajas CE1 (CACCG) reconocidas por el TF ABI4 de maíz (Abscisic Acid Insensitive 4, también involucrado en la señalización por ABA durante la germinación (Wind et al., 2012)), un motivo GTCGG y dos cajas TGCAA, asociados a la expresión génica inducida por ABA en *Arabidopsis*, la primera específica de las células de guardia de los estomas y la segunda de los genes inducidos en la hoja (Wang et al., 2011) (figura 3.7).

Una vez originadas las plantas, se ha efectuado la tinción histoquímica de la actividad del GUS de semillas, embriones, plántulas de 8 días y tejidos adultos (hoja, silicuas y raíz). Se ha obtenido tinción solo para embriones y raíz de plántulas de 8 días (figura 3.7): en embriones la tinción es visible en el ápice radical y en plántulas solo en una porción de raíz, donde se localiza a lo largo de los vasos

En resumen, el estudio del patrón de transcripción del factor ZmKS muestra su expresión en hoja y raíz de maíz así como en embrión y radícula en plantas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras del promotor ZmKS fusionado a GUS.

La comparación de los niveles de transcripción de las dos isoformas ZmKS1 y ZmKS2 indican que los niveles de transcritos de ZmKS2 son más elevados que los detectados para ZmKS1 sin embargo su respuesta a los distintos tratamientos es similar para ambas isoformas detectándose un aumento de su RNA en hoja tras el tratamiento con ABA y en hoja y raíz tras tratamiento con NaCl.

3. RESULTADOS

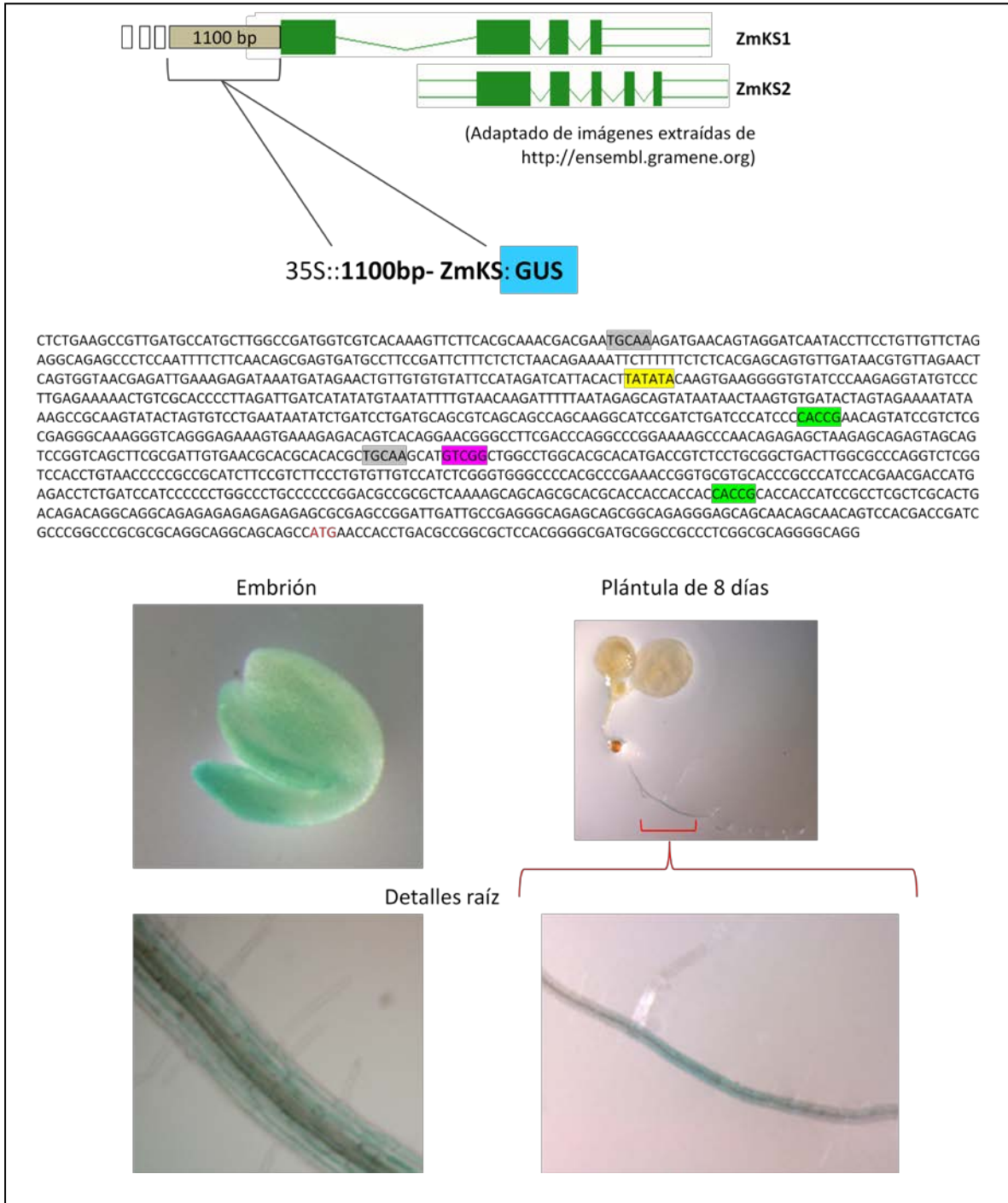


Figura 3.7: Análisis del promotor de ZmKS fusionado a GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Secuencia de 1100 bp clonadas en pauta con en el GUS. Abajo, imágenes sacadas con lupa.

3.1.4 Localización sub-celular de ZmKS

Para determinar si la localización *in vivo* de las dos isoformas de ZmKS es diferente a nivel celular, se ha realizado un experimento de agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* utilizando las construcciones de ZmKS1 y ZmKS2 fusionadas a GFP y bajo el promotor constitutivo 2X35S CaMV y detectando la fluorescencia por microscopio confocal.

Como se ve en figura 3.8, las dos isoformas se localizan exclusivamente en el núcleo, como se espera de los factores de transcripción.

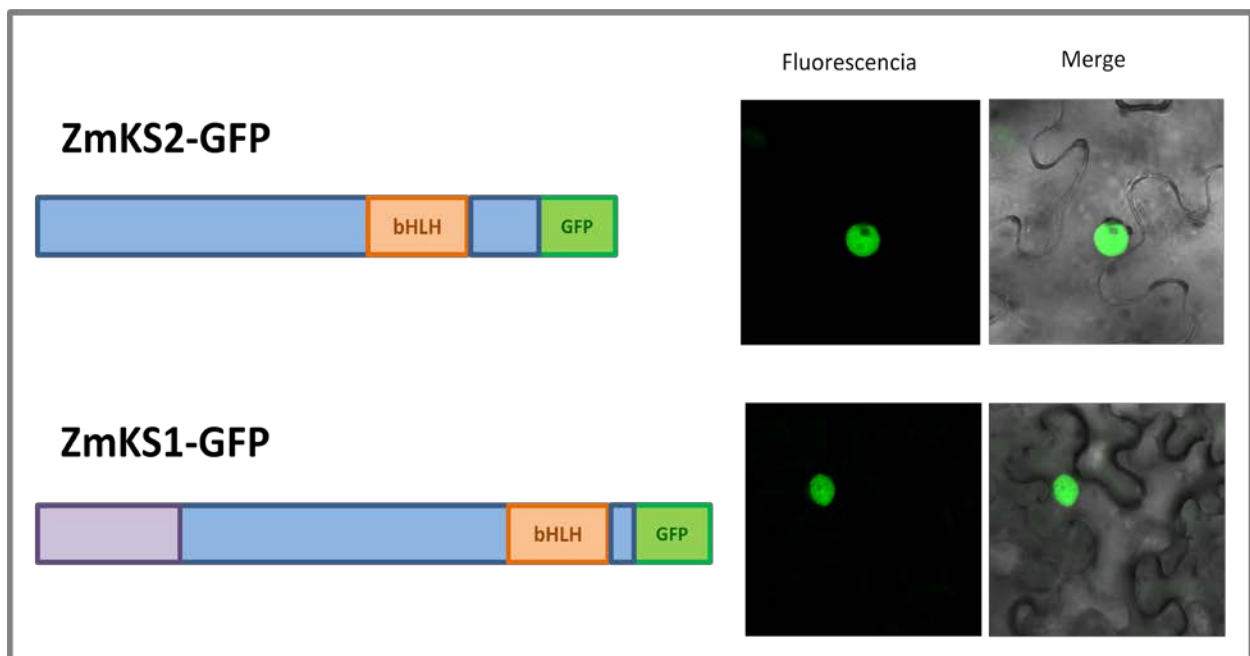


Figura 3.8: Localización sub-celular ZmKS

2X35S::ZmKS2-GFP y 2X35S::ZmKS1-GFP localizan en núcleo de células de *Nicotiana benthamiana* transformada transitoriamente por agroinfiltración.

3.1.5 Homo- y hetero-dimerización de ZmKS

Existe una amplia información en la literatura describiendo la posibilidad de formar homo- y hetero-dímeros de los factores con dominio bHLH.

Para comprobar si ZmKS1 y ZmKS2 presentan estas capacidades, se ha realizado un experimento de BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*). Las secuencias

3. RESULTADOS

codificantes de las dos isoformas se han clonado en pauta con la parte N-ter y con la C-ter de la YFP, y se han co-agroinfiltrado en hoja de *Nicotiana benthamiana*. Como se ve en la figura 3.9, ambas isoformas son capaces de homodimerizar y de formar un hetero-dimero entre ellas. Todas las interacciones se localizan en núcleo.

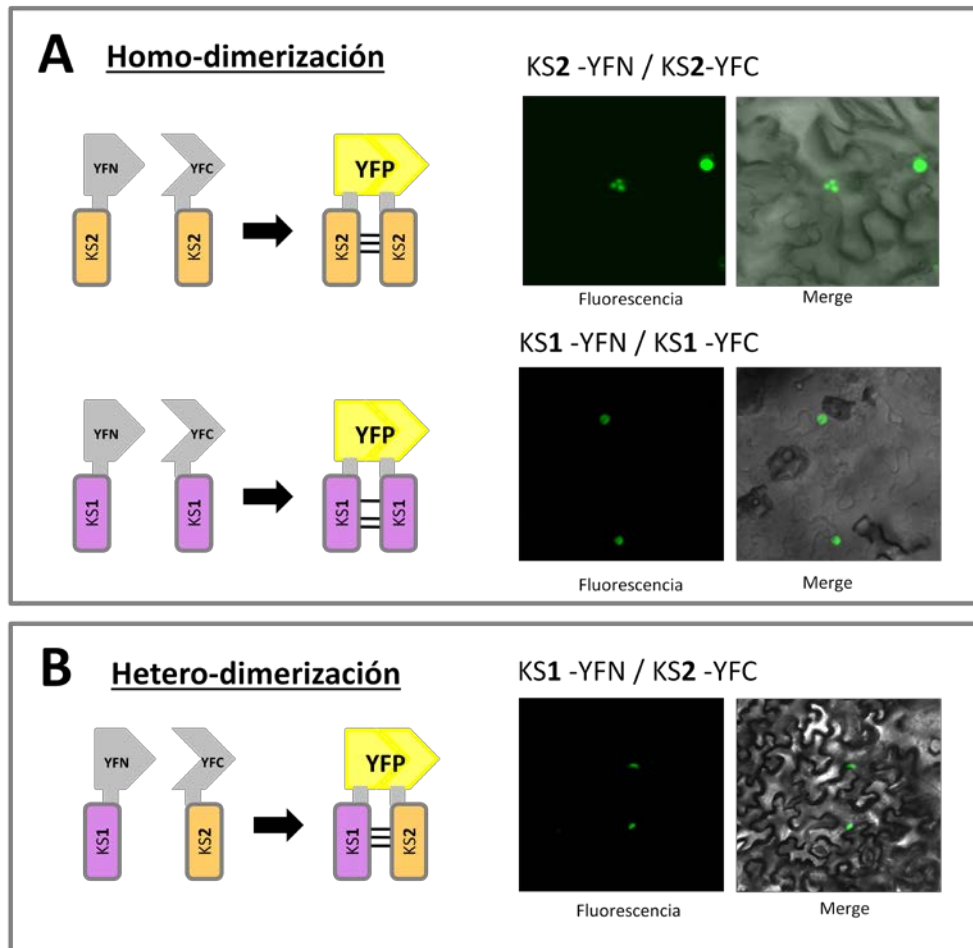


Figura 3.9: Complementación bimolecular fluorescente (BiFC) de ZmKS.

A: homo-dimerización de los TFs ZmKS1 y ZmKS2. B: hetero-dimerización de las dos isoformas

3.1.6 Detección de secuencias *cis* reconocidas por ZmKS2

Siendo los bHLH una familia de factores de transcripción, en colaboración con el CNB-Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, se ha realizado un análisis SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) para identificar las posibles secuencias nucleotídicas reconocidas por el ZmKS2.

El E-score es la medida que se emplea para conocer la afinidad de un TF por una secuencia concreta. El mínimo es -0.5 y el máximo +0.5.

3. RESULTADOS

Los dos motivos que parecen tener mayor afinidad (E-score más altos) se han marcado en rojo (CCACTTG) y en verde (CAAGTTG) (fig. 3.10 A).

El primer motivo contiene una caja E (CANNTG), mientras que en el segundo se reconoce una caja E "alargada" (el equivalente a CANNNTG).

Se puede ver claramente que esta proteína necesita un motivo de 7 bp para el reconocimiento: los motivos de 8 bp que presentan mayor afinidad tienen E-scores entre 0.48 y 0.49, que se considera una unión con muy alta afinidad. Al calcular las puntuaciones para los heptámeros, el E-score es 0.47, que sigue siendo alto, mientras para 6 nucleótidos cae el E-score hasta 0.26.

En la figura 3.10 B, se han representado variantes posibles de los dos heptámeros: es evidente la baja capacidad del ZmKS2 para reconocerlos.

De estos datos resulta que el ZmKS2 necesita la secuencia de 7 nucleótidos CCACTTG (en rojo) para el reconocimiento del DNA y en segunda posición, con una afinidad menor, la variante de E-box alargada CAAGTTG (en verde).

Tanto la localización subcelular exclusivamente nuclear de ZmKS como su posibilidad de formar homo y heterodímeros y su interacción preferente con la secuencia de DNA E-box like de 7 CCACTTG indica un comportamiento como corresponde a un factor de transcripción.

3. RESULTADOS

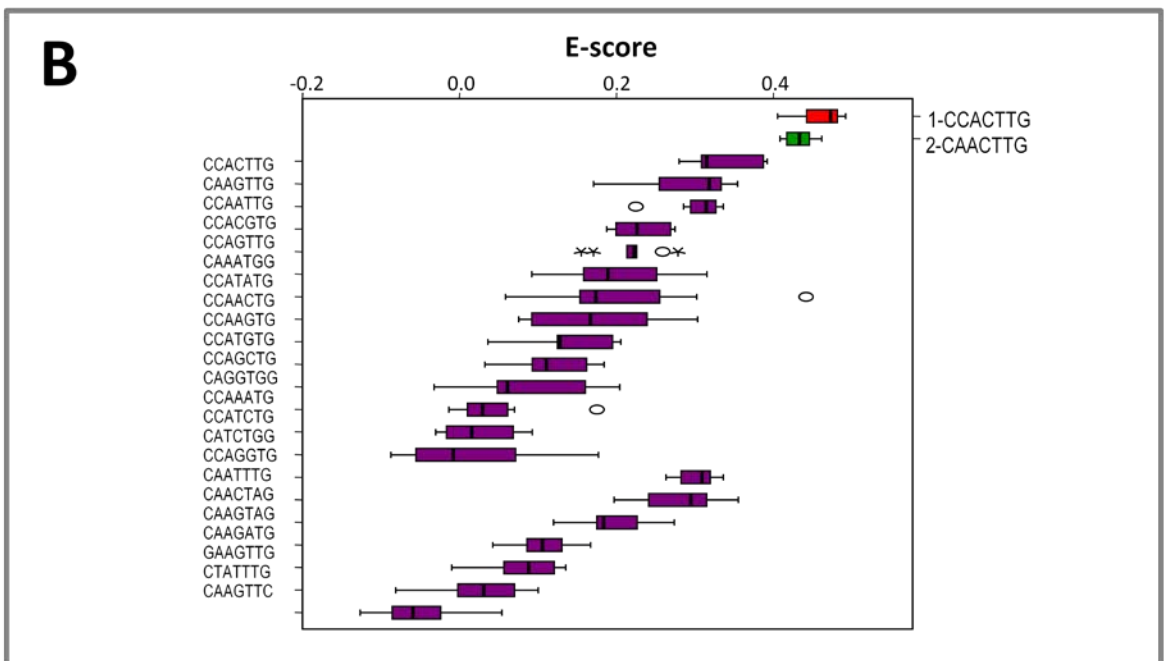
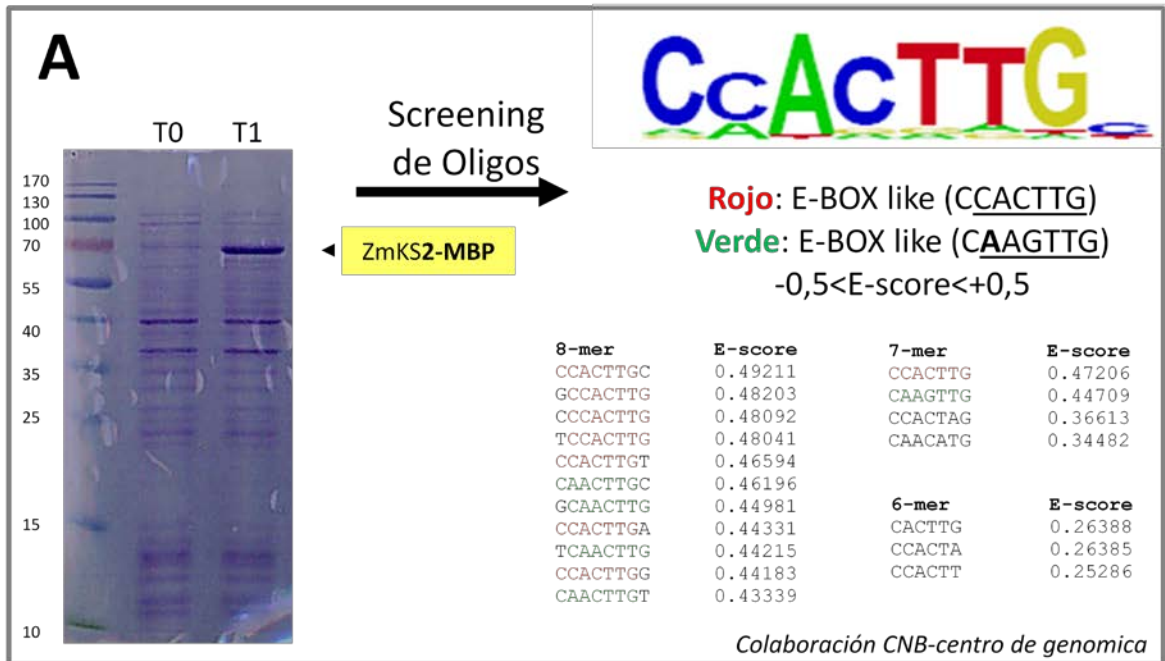


Figura 3.10: SELEX del ZmKS2

Realizado en colaboración con CNB-Centro Nacional de Biotecnología de Madrid.

3.1.7 Fosforilación de ZmKS por ZmOST1

Debido a que ZmKS interaccionó en doble híbrido con ZmOST1, miramos si el factor podía ser sustrato de esta kinasa.

Para averiguar la capacidad de la quinasa ZmOST1 de fosforilar la dos isoformas, se ha hecho previamente un estudio *in silico* de las secuencias aminoacídicas de ZmKS1 y ZmKS2 por medio de un sistema bio-informático on-line (Ellis & Kobe, 2011) (figura 3.11 A).

En figura 3.11 B se han alineado las secuencias de las dos isoformas de ZmKS y se han marcado con estrellas los aminoácidos que tienen altos niveles de probabilidad de fosforilación resultantes del estudio *in silico*. Con estrellas rojas (figura 3.11 B) y en color rosa (figura 3.11 A) están marcados los aa que se encuentran en el motivo de fosforilación preferentemente reconocido por ZmOST1: LXRXX(S/T) (Vlad et al., 2008).

Residuos con alta probabilidad de fosforilación por ZmOST1 se encuentran a lo largo de las dos proteínas. De estos, 8 son comunes a las dos (uno específico de la ZmOST1, en posición 212), mientras otros residuos son específicos de cada isoformas: uno en la zona C-terminal de ZmKS2 y 5 en la zona N-ter del ZmKS1 (la isoforma mas larga), 3 de estos (serina 27, serina 114 y treonina 125) en el motivo reconocido por la quinasa.

En células eucarióticas, la fosforilación reversible de proteínas es el principal mecanismo de control en la mayoría de los eventos intracelulares (Hunter, 1995). En proteínas regulables, la fosforilación y desfosforilación de residuos de serina (Ser), treonina (Tre) y tirosina (Tir) provocan cambios conformacionales y variaciones en sus propiedades biológicas. La presencia de los residuos potencialmente fosforilados específicos de cada isoforma sugiere la posible presencia de un mecanismo de regulación diferencial en plantas de ZmKS1 y ZmKS2 operada por la quinasa.

| Quinasa | Sustrato | Posición | Método | Score |
|---------|-------------|----------|--------|-------|
| ZmOST1 | ZmKS1 | 27 | KSD | 82.33 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 27 | SDR | 76.83 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 55 | KSD | 76.58 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 55 | SDR | 70.59 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 66 | KSD | 81.41 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 114 | KSD | 82.24 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 114 | SDR | 78.36 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 125 | KSD | 73.68 |
| ZmOST1 | ZmKS1 | 125 | SDR | 68.77 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 162 | SDR | 78.58 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 162 | KSD | 76.07 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 165 | KSD | 74.78 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 165 | SDR | 65.22 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 204 | KSD | 74.66 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 204 | SDR | 70.01 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 212 | KSD | 82.79 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 212 | SDR | 79.84 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 226 | KSD | 70.93 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 226 | SDR | 69.09 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 245 | SDR | 82.91 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 245 | KSD | 66.06 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 246 | KSD | 70.68 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 273 | KSD | 74.32 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 273 | SDR | 67.34 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 298 | KSD | 72.69 |
| ZmOST1 | ZmKS1/ZmKS2 | 298 | SDR | 71.85 |
| ZmOST1 | ZmKS2 | 320 | KSD | 66.28 |

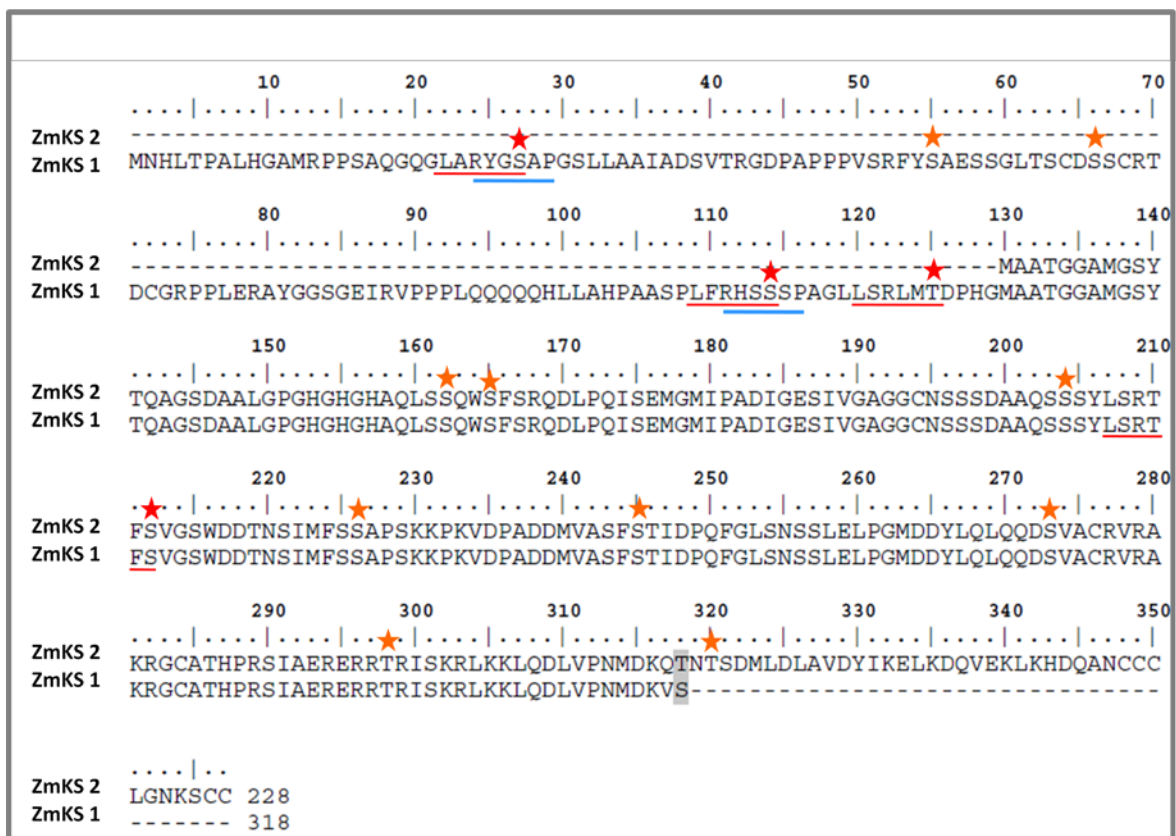


Figura 3.11: Posibles sitios de fosforilación de ZmKS por ZmOST

A: sitios de fosforilación predichos por el sistema bio-informático PREDIKIN (Ellis & Kobe, 2011). En rosa están marcadas las posiciones de los aa que se encuentran en el motivo canónico de la ZmOST1 (LXRXX(S/T)). B: alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ZmKS1 y ZmKS2 en el que se han marcado con estrellas los posibles sitios de fosforilación: en rojo las serinas que confirman el motivo LXRXX(S/T) de reconocimiento de ZmOST1. En azul están marcados los motivos RXXpSXP de unión a las proteína 14:3:3.

3. RESULTADOS

Se ha demostrado que ZmKS1 y ZmKS2 pueden ser efectivamente y directamente fosforilados por ZmOST1 *in vitro* (fig. 3.12). Además de utilizar las proteínas enteras, el experimento se ha realizado también con el fragmento N-ter (aa 1-129) de la isoforma mas larga (figura 3.12 A) y con dos fragmentos de la isoforma mas corta, uno de 150 aa (ZmKS2 A, 1-149) y el otro más pequeño que contiene el dominio bHLH (ZmKS2 B, 150-228) (figura 3.12 B). Todos los fragmentos se fosforilan, dándonos información de que la fosforilación tiene efectivamente lugar a lo largo de toda las proteínas, de acuerdo con las previsiones hechas *in silico*.

En las imágenes, se indica también la banda resultante de la auto-fosforilación de ZmOST1, anteriormente demostrada en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio (Vilela et al., 2013).

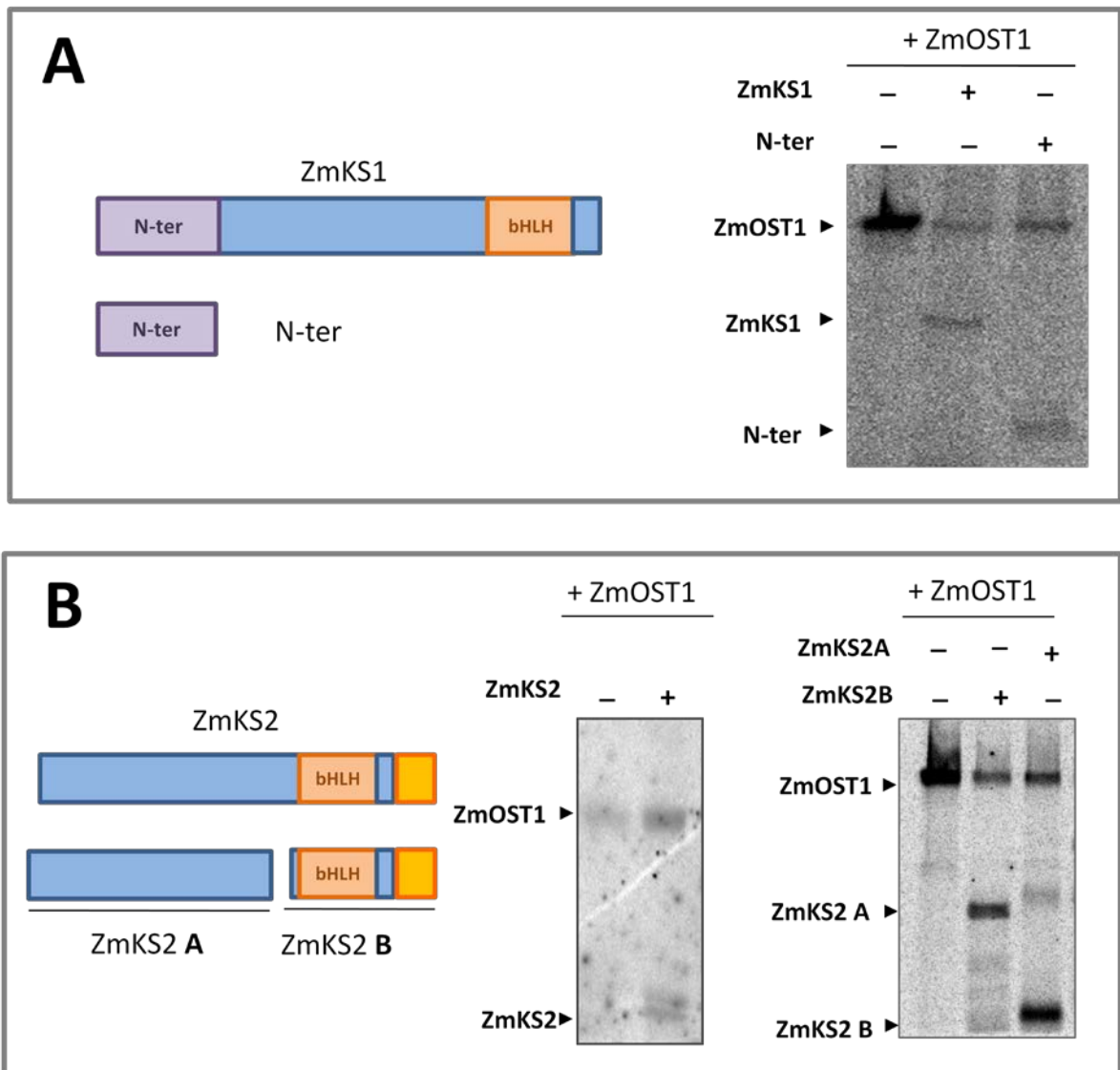


Figura 3.12: Fosforilación *in vitro* de ZmKS

3. RESULTADOS

Para confirmar la especificidad de ZmOST1 en la fosforilación de ZmKS, se ha llevado a cabo un ensayo de quinasa en gel, donde la proteína ZmKS2 se ha copolimerizado en la matriz del gel SDS-PAGE (fig. 3.13). Se han hecho inmunoprecipitados (IPs) a partir de extractos proteicos de diferentes líneas de *Arabidopsis* mutantes de la AtOST1 y de componentes de la ruta de señalización del ABA y utilizando el anticuerpo anti ZmOST1 (que reconoce el dominio ABA).

Las bandas de actividad solo se ven en los carriles donde se han cargado las muestras tratadas con ABA, debido a la necesidad de la ZmOST1 de ser activada por tratamiento con esta hormona (Boudsocq et al., 2004).

Se ha certificado que las bandas de actividad pertenecen a AtOST1 cargando IPs del mutante *ost1-2* (donde la quinasa está mutada y por tanto es inactiva y, debido a esto, la banda no aparece tras el tratamiento con ABA) y de *Qabi2-2* (el cuádruple mutante de las fosfatasa PP2Cs (Rodrigues et al., 2013), reguladores negativos de la quinasa, que resulta en un aumento de la actividad de AtOST1, y por tanto en un aumento de intensidad de la banda (figura 3.13).

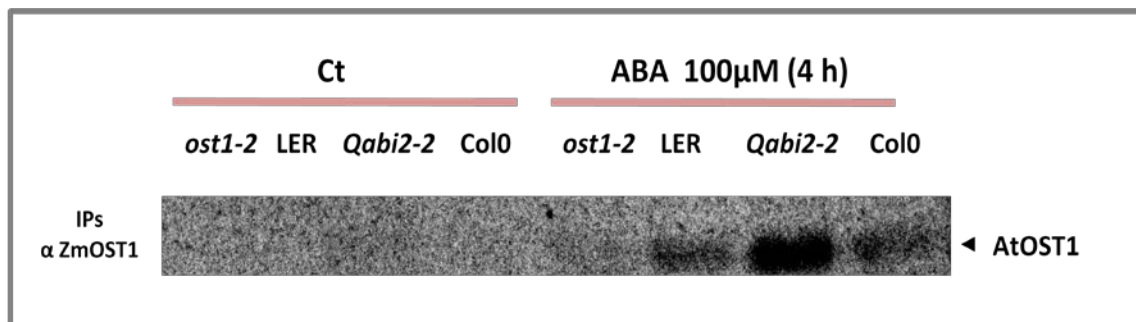


Figura 3.13: Ensayo de quinasa en gel.

El sustrato ZmKS2-HIS está polimerizado en el gel SDS-PAGE. *ost1-2*: LER con una forma inactiva de AtSnRK2.6/AtOST1; *LER* = *Arabidopsis Landsberg erecta*; *Qabi2-2* = cuádruple mutante de ABI2 (*abi2.2/pp2ca.1/hab1.1/abi1.2*); *Col0* = *Arabidopsis Columbia-0*.

3.1.8 Interacción *in planta* entre ZmKS2 y ZmOST1

Por medio de la técnica BiFC (Weinthal & Tzfira, 2009), se ha comprobado la interacción *in planta* de ZmKS1 y ZmKS2 con ZmOST1, y se ha intentado caracterizar los dominios específicos de la proteína quinasa que están involucrados en esta interacción.

La ZmOST1 entera, el mutante inactivo ZmOST1[G40R], los dos dominios osmótico y el dominio ABA (ZmOST1[290-325], ZmOST1[325-366]) (Vilela et al., 2013) y el ZmKS2 se han clonado en pauta con la parte N-ter y con la C-ter de la YFP. Se han co-agroinfiltrado en hoja de *Nicotiana benthamiana* todas las combinaciones del ZmKS1 y ZmKS2 (YFN y YFC) con las otras construcciones.

Los resultados (fig. 3.14) muestran que:

- ZmKS1 y ZmKS2 interaccionan con la quinasa entera ZmOST1 y ZmOST1[G40R], independientemente de la presencia de la mutación en la zona activa de esta última.
- En todos los casos, para la isoforma larga ZmKS1 la señal de YFP se visualiza solo en núcleo, mientras para ZmKS2 en núcleo y citoplasma.
- Para ambas isoformas la interacción ocurre también con el dominio osmótico y el dominio ABA

Pues, a diferencia del ZmKS2, para el ZmKS1 no se observa en ningún caso interacción localizada en citoplasma.

Nuestra hipótesis es que esto podría ser debido a diferencias a nivel funcional entre las dos proteínas, muy probablemente determinado por los residuos aminoacídicos potencialmente fosforilables y específicos de cada una de las isoformas.

3. RESULTADOS

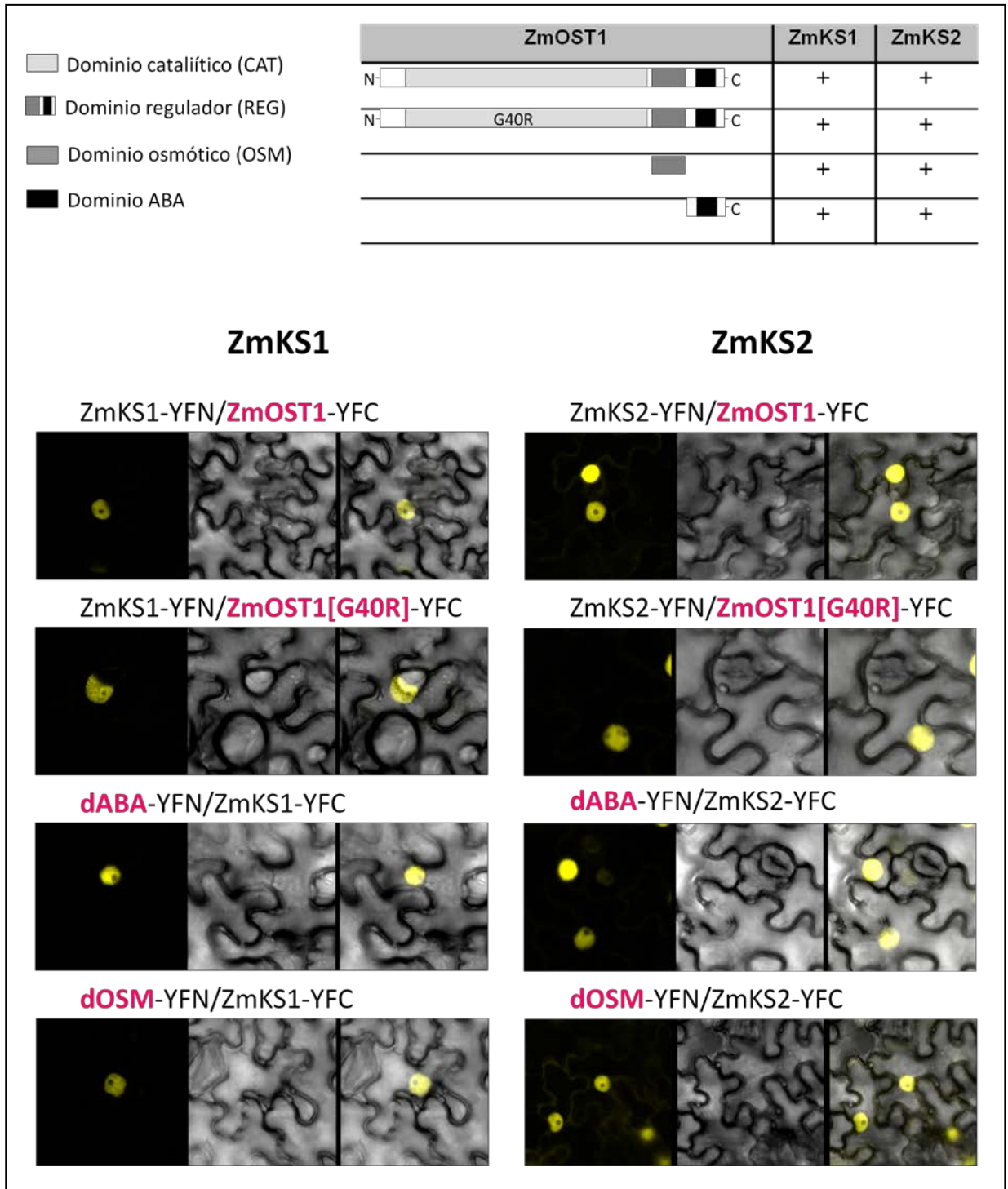


Figura 3.14: Interacción *in planta* entre ZmKS y ZmOST1

3.1.9 Co-trasformación en protoplastos de maíz

Para analizar los posibles efectos a nivel de cambios de localización *in vivo* de ZmKS1 y ZmKS2 por efecto de la fosforilación de los mismos por ZmOST1, especialmente durante la señalización dependiente de ABA, hemos co-transformado protoplastos de mesófilo de maíz con dos construcciones: cada isoforma del factor de transcripción fusionada a GFP y la quinasa (la forma activa y la forma inactiva ZmOST1[G40R], mutada en el sitio de unión a ATP situado en el dominio catalítico) fusionada al epítipo HA.

Como se ve en figura 3.14 A y C, la localización de ZmKS1 y ZmKS2 resulta ser nuclear y no varía después de 30 minutos de tratamiento con ABA 10 μ M.

Ambas proteínas localizan exclusivamente en el núcleo, pero a diferencia de la proteína más corta (ZmKS2), el ZmKS1 tiene tendencia a formar *speckles* en ausencia de ABA (líneas 1 y 2 de las graficas A y C).

También para comprobar la expresión de la quinasa se ha realizado un *western blot* utilizando un anticuerpo anti -HA (fig 3.14 B y D).

En resumen, las dos isoformas de ZmKS presentan residuos fosforilables por la quinasa OST1 que son específicos de cada isoforma y ambas son directamente fosforiladas por ZmOst1 *in vitro*.

Las dos isoformas ZmKS1 y ZmKS2 interactúan en planta con la quinasa OST1 de maíz a través del dominio osmótico y/o ABA de la quinasa, esta interacción es nuclear para ZmKS1 mientras para ZmKS2 se localiza en núcleo y citoplasma.

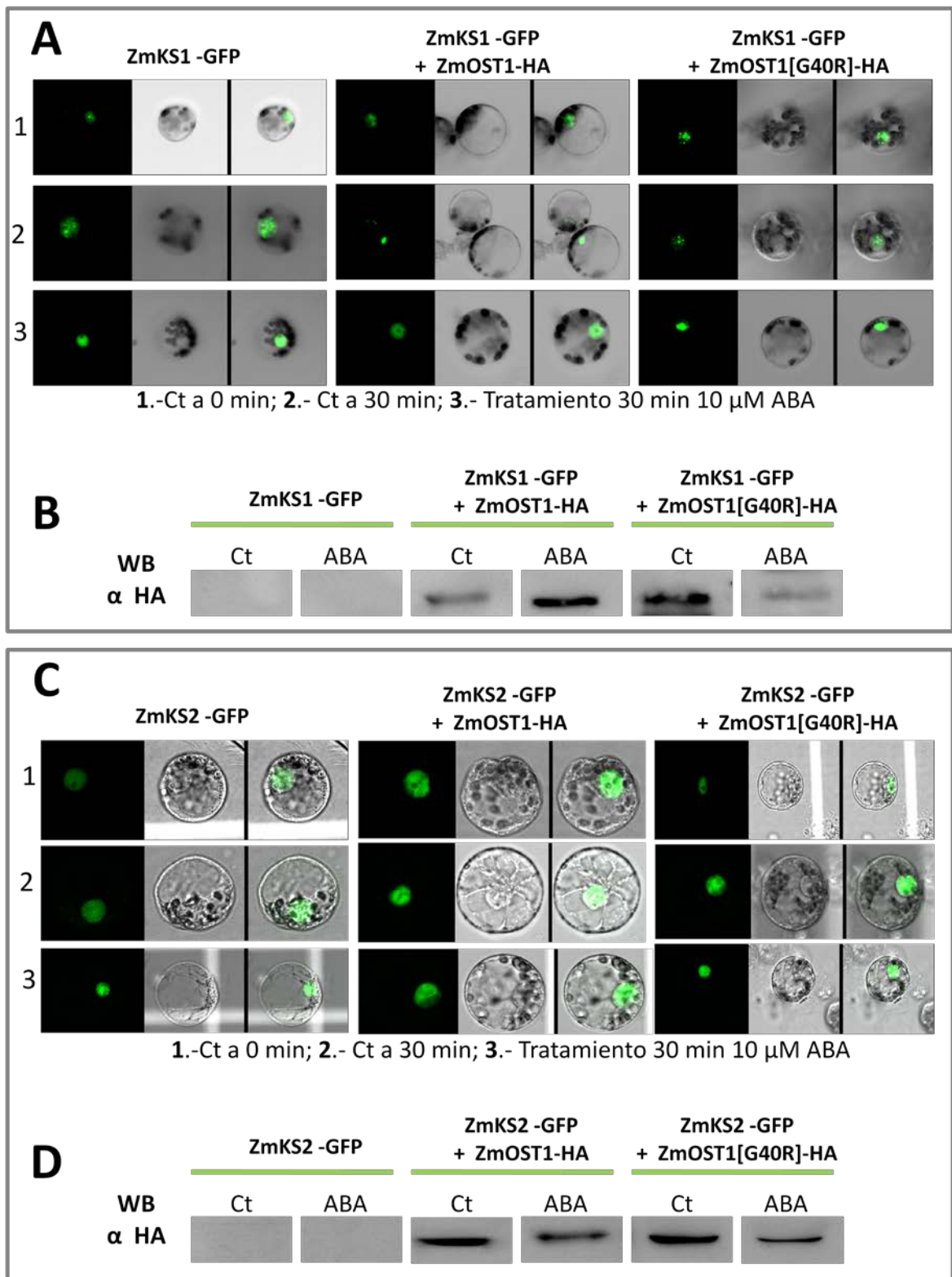


Figura 3.15: Co-transformación de protoplastos de maíz

A: -transformación de protoplastos de maíz. B: *western blot* de comprobación de la expresión de las quinasas ZmOST1 y ZmOST1[G40R] fusionadas a -HA para los controles y tratados a los 30 minutos (puntos 2 y 3 de la grafica A).

3.2 Caracterización funcional del factor de transcripción ZmKS.

Para obtener información de la posible función en planta del factor de transcripción ZmKS de maíz, se han generado plantas transgénicas de Arabidopsis y de maíz que expresan, a niveles diferentes, las dos isoformas del factor ZmKS(ZmKS1 y 2). Sobre las líneas transgénicas generadas, se han estudiado aquellos procesos fisiológicos en los que el factor ZmKS pudiera tener un papel relevante como regulador. Los procesos fisiológicos que se han estudiado son:

- germinación,
- cierre y apertura estomática,
- resistencia a desecación y
- floración

Como se ha descrito anteriormente el factor ZmKS interacciona y es sustrato de la quinasa OST1. Por tanto, era interesante estudiar si la regulación del factor en estos procesos fisiológicos era dependiente o no de su fosforilación. Por este motivo, se llevaron a cabo también estos estudios fisiológicos utilizando plantas sobrepresoras de ZmKS sobre fondos genéticos deficientes en la actividad quinasa AtOST1 (mutante ost1-2) y sobre un fondo genético ost1-2 complementado con la quinasa de maíz SnRK2/ZmOST1.

3.2.1 Obtención y análisis funcionales de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2

Se han generado plantas transgénicas de diferentes ecotipos de *Arabidopsis* con construcciones de los dos isoformas ZmKS (ZmKS1y ZmKS2) fusionados a GFP y bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Los ecotipos transformados fueron los siguientes : líneas LER (Landsberg erecta), **ost1-2** (ecotipo LER que presenta la quinasa SnRK2.6/AtOST1 mutada y inactiva (Mustilli et al., 2002)) y **C2** (mutante *ost1-2* complementado con la quinasa de maíz SnRK2.8/ZmOST1 (Vilela et al., 2013)).

Para analizar la presencia de ZmKS1 y ZmKS2 en las plantas transgénicas generadas utilizamos su fusión a GFP para detectarlas por microscopía confocal.

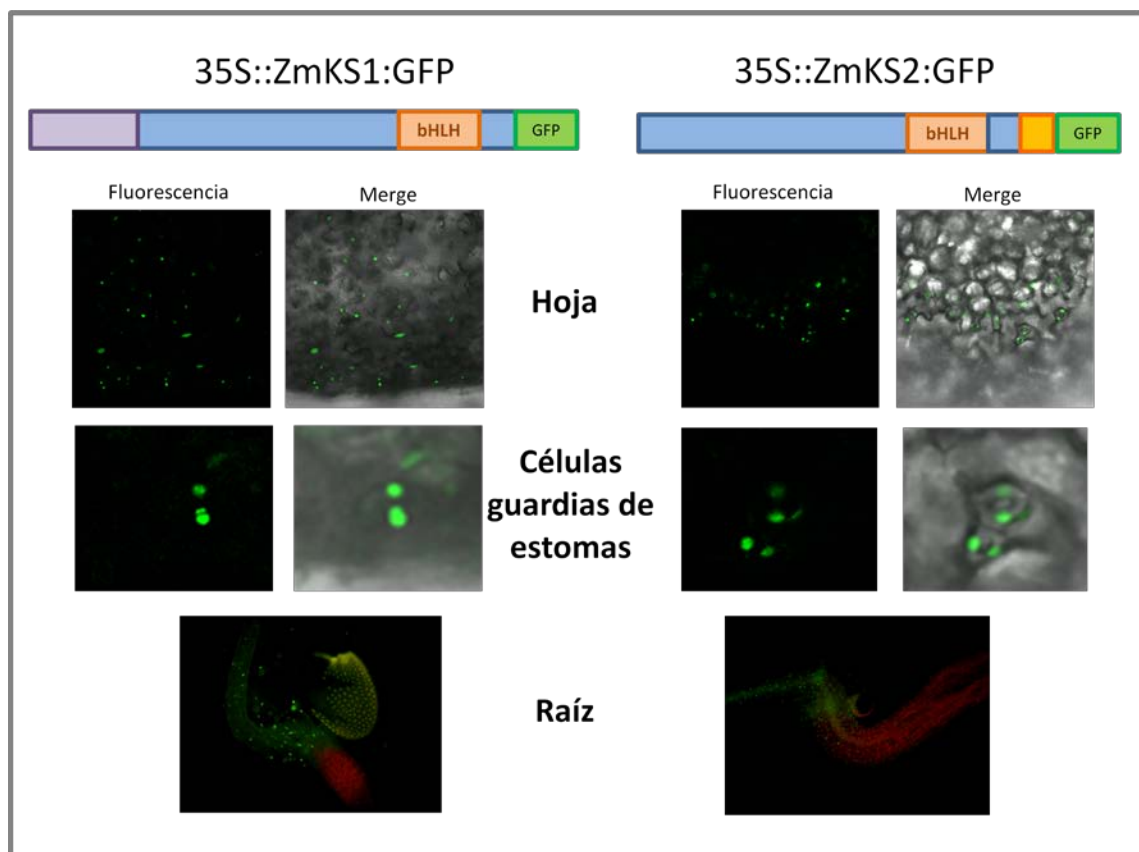


Figura 3.16: Transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Esquema de las construcciones utilizadas para transformar las líneas LER, *ost1-2* y C2 de *Arabidopsis*. La presencia de las proteínas en los núcleos puede visualizarse en las imágenes de microscopía confocal de hojas. Se detallan las células estomáticas y de raíz.

3. RESULTADOS

En la Figura 3.16 se puede observar que la presencia de las dos isoformas de ZmKS se concentra en los núcleos de las células de las hojas y en la raíz. Como puede observarse en las imágenes a alta magnificación, se evidencia su presencia en los núcleos de las células guardia de los estomas. También hemos analizado, por microscopia confocal, la presencia del factor en las plantas transformadas con los tres fondos genéticos (LER, *ost1-2* y C2). Los resultados nos indicaron que el patrón de distribución nuclear era el mismo en todas ellas.

Con el fin de determinar los niveles de expresión de ZmKS1 y ZmKS2 en las líneas transgénicas de cada fondo genético (LER, *ost1-2* y C2) se seleccionaron dos líneas de cada una.

Los niveles de transcrito se determinaron por rtPCR utilizando la pareja de primers RealT_Lar-Cor_3 específicos para el dominio bHLH de ZmKS presente en ambas isoformas. También se analizaron los niveles de proteína recombinante por western blot, utilizando un anticuerpo contra GFP . En figura 3.17 A y B se muestran los resultados obtenidos para las líneas seleccionadas de ZmKS1 y ZmKS2.

3. RESULTADOS

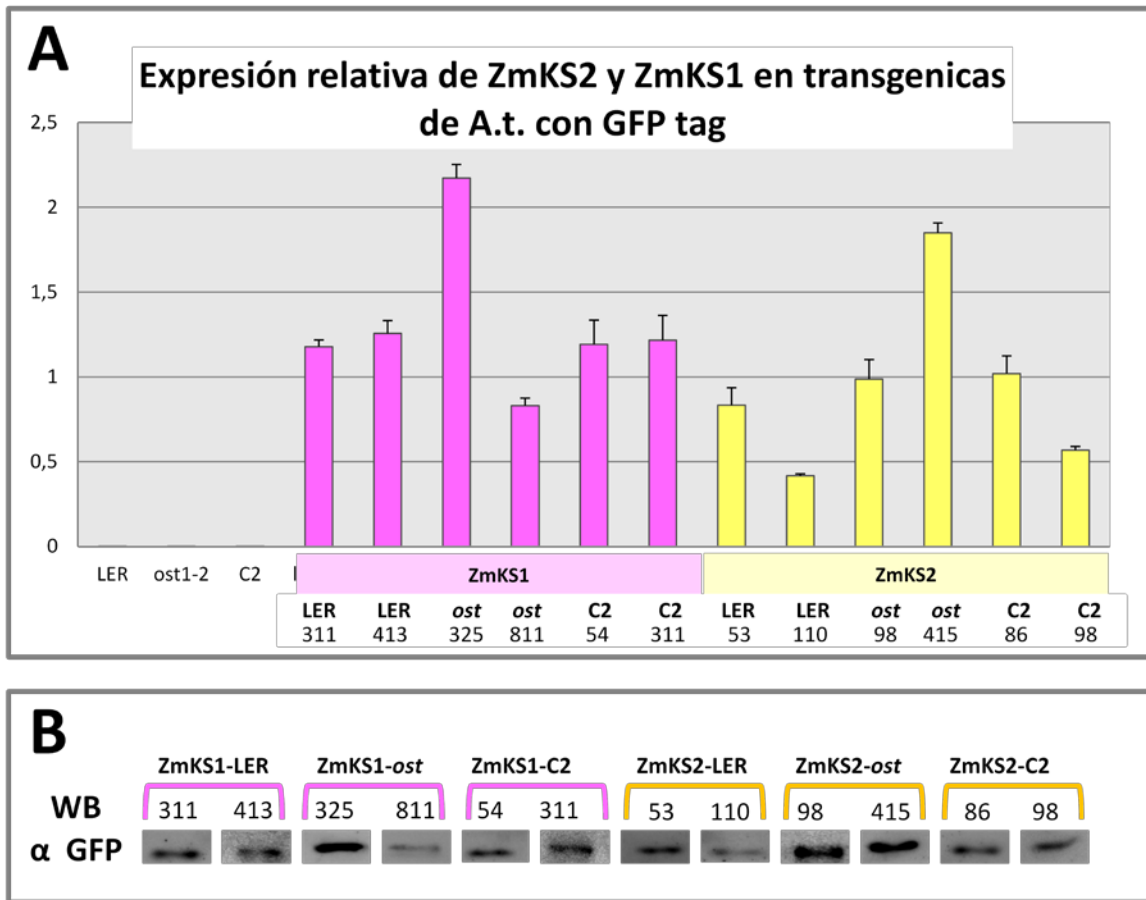


Figura 3.17: Niveles de expresión de los factores ZmKS1 y ZmKS2 en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

A: Expresión relativa de las dos isoformas de ZmKS en los diferentes fondos genéticos. En rosa las líneas del ZmKS1 y en amarillo las del ZmKS2. B: western blot de las transgénicas utilizando un anticuerpo α -GFP para comprobar los niveles de expresión de las proteínas recombinantes.

A raíz de los resultados obtenidos, se escogieron las líneas transgénicas que expresaban mejor el factor en cada fondo genético para realizar posteriormente los experimentos correspondientes a un análisis funcional de las dos isoformas de ZmKS descritos a continuación. Las líneas seleccionadas que han dado mejores resultados de expresión relativa y western blot, son las siguientes

- Transgénicas de ZmKS1, líneas LER 413, ost 325 y C2 311.
- Transgénicas de ZmKS2, líneas LER 53, ost 415 y C2 86.

3.2.1.1. Ensayo de germinación

Con el objetivo de determinar si ZmKS participa en la regulación del proceso de germinación, se han comparado los tiempos y porcentajes de germinación de las líneas transgénicas de *Arabidopsis LER* y *ost1-2* descritas en el apartado anterior, con las líneas control no transformadas a partir de las cuales fueron generadas (*LER*, y *ost1-2*), en diferentes condiciones de estrés: estrés salino (NaCl 150 mM), osmótico (con manitol 350 mM) y tratamiento con ABA 1,5µM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.18.

En condiciones control (en Medio 0,5X MS) no se han observado cambios significativos: todas las semillas habían germinado al tercer día de crecimiento (no incluido en la grafica).

En condiciones de **estrés salino**, en fondo *LER* el 70% ya han germinado al tercer día y el 100% al cuarto día de ensayo. Sin embargo se observa que la sobreexpresión de los dos isoformas provoca un retraso de la germinación al tercer y cuarto día. Al tercer día, han germinado solo un 20% de las semillas de ZmKS1 y un 55% de las de ZmKS2. El porcentaje de germinación al octavo día en ambos casos es del 100%.

En ausencia de la actividad quinasa de *Arabidopsis* (fondo *ost1-2*), la sobreexpresión del ZmKS1 no provoca cambios sustanciales (ni en tiempo ni en porcentaje de germinación) comparada con el control correspondiente. Sin embargo se detecta que la sobreexpresión de ZmKS2 inhibe ligeramente la germinación (disminuye un 12%)

En resumen, estos resultados sugieren que en condiciones salinas, la presencia del el factor ZmKS1 fosforilado (línea *LER*) regula negativamente el proceso de germinación de las semillas. Su expresión en la línea *ost1-2*, en ausencia de la quinasa, consigue revertir el proceso aumentando la tasa de germinación en más de un 35%. La sobreexpresión de ZmKS2 altera en menor grado el proceso de germinación en *LER*, sin embargo la tasa de germinación no alcanza al 100% en ausencia de la quinasa *AtOST1* (línea *ost1-2*).

3. RESULTADOS

En condiciones de estrés osmótico en presencia de 350mM de manitol, el efecto funcional de la sobre-expresión de ZmKS1 y ZmKS2 es similar al tratamiento salino. La presencia de ZmKS1 fosforilada en fondo LER hace que las semillas germinen más tarde respecto al control. En fondo *ost 1-2*, ZmKS1 recupera la tasa de germinación a tiempos cortos, sugiriendo que, como en el caso de estrés salino, ZmKS1 fosforilada también regula negativamente el proceso de germinación en condiciones de estrés osmótico. Esta regulación negativa no es tan evidente en la sobre-expresión de ZmKS2, pero sin embargo, como en el caso de estrés salino, hay una reducción de más del 20% en la capacidad de germinación global de las semillas cuando se expresa en un fondo *ost1-2*.

Finalmente se realizó también un ensayo de tasa de germinación de las líneas transgénicas tratadas con 1,5 μ M de ABA. La sobre-expresión de ZmKS1 y ZmKS2 en fondo LER no se observan diferencias sustanciales respecto a las plantas *wt*, ni en porcentaje global de germinación ni en velocidad del proceso. Todas las líneas siguen un proceso y tasa de germinación similar. Aunque todas las semillas germinan al octavo día de ensayo, el tratamiento con ABA retrasa la germinación a tiempos cortos tanto en el control como en las semillas de ZmKS1 y ZmKS2. Sin embargo, en fondo *ost1-2*, en ausencia de la quinasa AtOST1, observamos que las semillas ZmKS1 y ZmKS2 han germinado un 30% más que el control a tiempos cortos. Finalmente estas semillas ZmKS1 y ZmKS2 germinarán todas mientras que las control (*ost1-2*) sólo un 80%.

Este ensayo nos indica que la fosforilación del factor inducida por la cascada de señalización del tratamiento con ABA retrasa la germinación y que el factor no fosforilado en ausencia de la quinasa (fondo *ost1-2*) acelera el proceso de germinación.

3. RESULTADOS

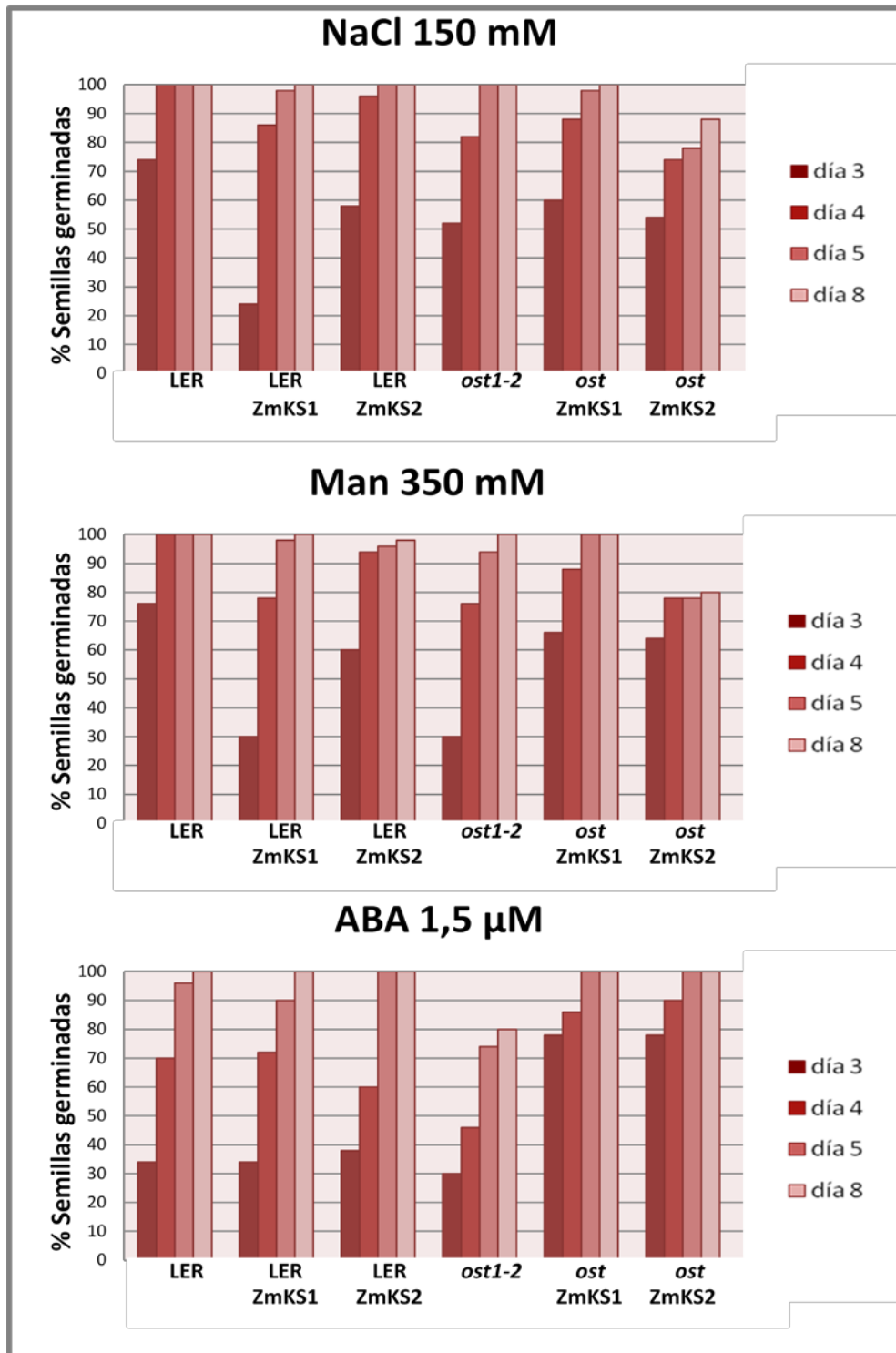


Figura 3.18: Cinéticas de germinación de las transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2 en diferentes condiciones de estrés.

3.2.1.2 Regulación estomática

Resultados previos realizados en nuestro grupo demostraron que tanto la quinasa de maíz ZmOST1 (Vilela et al., 2013) como su homóloga de *Arabidopsis* AtOST1 (Mustilli et al., 2002) están relacionadas con el cierre de estomas en condiciones de estrés hídrico. Además, se ha descrito recientemente que el factor AKS2, ortólogo a ZmKS en *Arabidopsis* facilita la apertura de estomas (Takahashi et al., 2013). Por tanto era interesante realizar un ensayo de apertura estomática para comprobar si la sobre-expresión de ZmKS1 y ZmKS2 también afectaban de alguna forma este proceso.

El ensayo de **cierre estomático** se realizó midiendo sobre imágenes al microscopio, las dimensiones del poro estomático de epidermis foliar de cada línea transgénica y sus correspondientes controles. En estos experimentos se ha incluido la línea C2 (línea ost1-2 complementada con la quinasa de maíz ZmOST1) También se realizaron ensayos para comprobar el efecto del Factor ZmKS en tratamientos con ABA, hormona inductora del cierre estomático.

En la figura 3.19 se muestran los resultados obtenidos. En la grafica A se comparan los promedios de los “ratios” ancho/largo obtenidos para cada línea y en la grafica B los valores normalizados respecto al valor obtenido para cada control correspondiente. En la figura 3.19 C se presentan imágenes representativas de los estomas de cada línea transgénica, en condiciones control y tratadas con ABA.

Los resultados indican que, el comportamiento de cierre estomática en fondo LER es diferente en las líneas sobre-expresantes de las dos isoformas. El ratio de los estomas de las plantas que expresan ZmKS2 es similar al control. El tratamiento con ABA induce, en ambos casos un ligero cierre estomático. Sin embargo, la presencia del factor ZmKS1 determina estomas más abiertos, y también una mayor respuesta al ABA en el cierre de los mismos. Este resultado nos sugiere que ZmKS1 facilita la apertura estomática y que su fosforilación, inducida por ABA, provoca el cierre. Como se observa en estos resultados, y en estudios previos en nuestro laboratorio (Vilela et al. 2013), el fenotipo de los mutantes ost1-2, está relacionado con la apertura estomática. De nuevo se observan diferencias de apertura/cierre estomático, entre las dos isoformas del factor ZmKS por efecto de fosforilación. El control ost1-2 y ZmKS2 presentan valores similares. Sin embargo, las plantas que expresan ZmKS1 en este

3. RESULTADOS

fondo genético, con o sin tratamiento de ABA, estimula el cierre de los estomas. La complementación de la quinasa en la línea C2 revierte el fenotipo a LER wt. Se observa que la sobre-expresión de ZmKS1 en esta línea es similar al control y como era de esperar, el tratamiento con ABA estimula el cierre estomático.

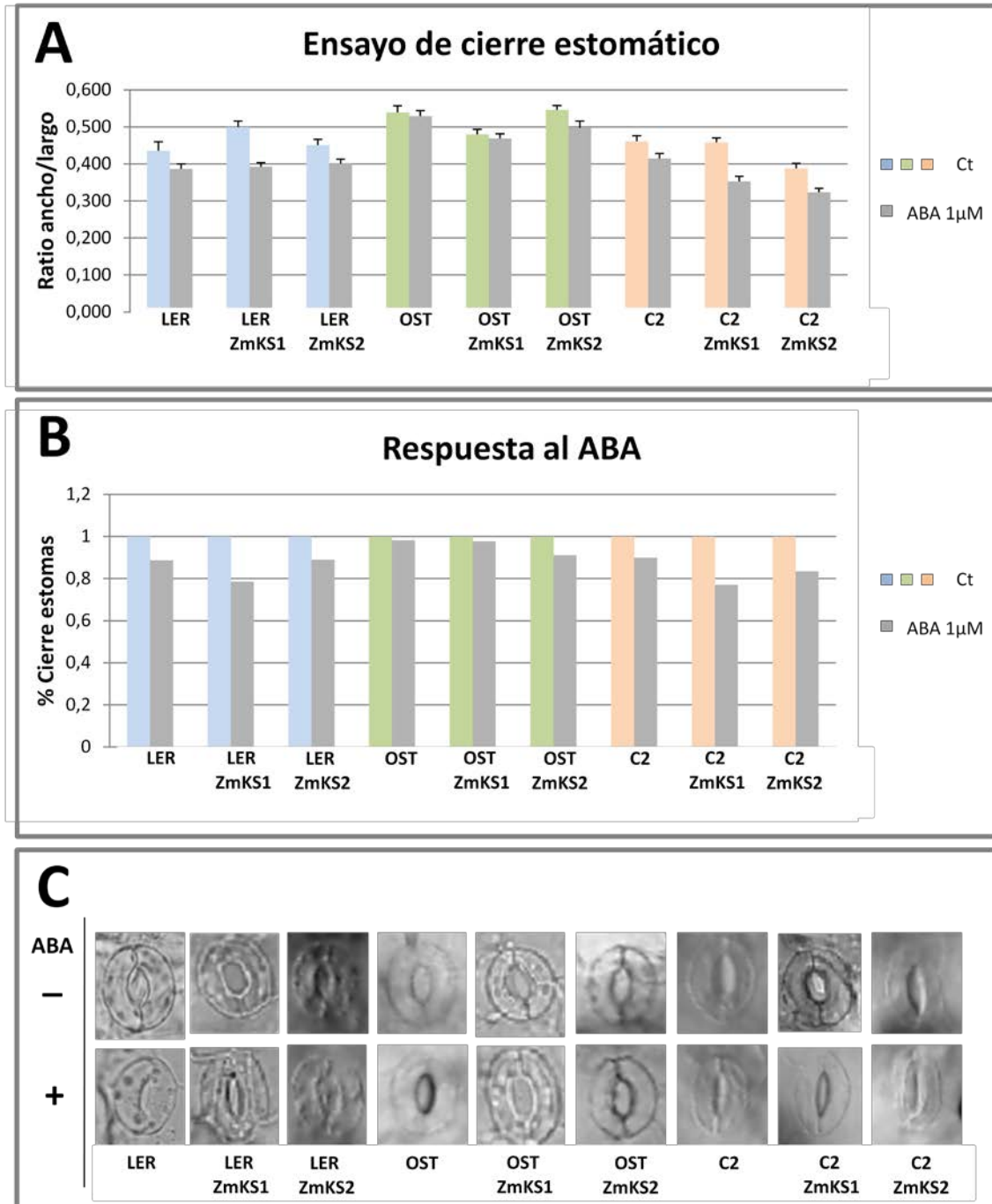


Figura 3.19: Ensayo de cierre estomático de las transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2

A: Gráfica que representa los valores promedio de los "ratios" ancho/largo de estomas obtenidos para cada línea (en color) y los valores después del tratamiento con 1μM de ABA (gris). B: Gráfico de los valores normalizados respecto a los controles correspondientes. C: imágenes representativas de los estomas de cada línea, en condición control y después de tratamiento con ABA

3. RESULTADOS

El tratamiento para el estudio de la **abertura estomática** ha sido realizado utilizando fusicoccina, un compuesto orgánico sintetizado por el hongo *Fusicoccum amygdali* (Ballio et al., 1964) que estimula una rápida acidificación de la pared celular de las plantas y la abertura irreversible de los estomas.

En la figura 3.20 se muestran los resultados obtenidos. En la grafica A se comparan los promedios de los “ratios” ancho/largo obtenidos para cada línea mientras que en la grafica B se representan los valores normalizados respecto a los valores obtenidos para cada control. En figura 3.20 C se muestran imágenes representativas de los estomas de cada línea, en condiciones control y después de tratamiento con fusicoccina.

Los resultados indican que en fondo LER los niveles de abertura en ausencia de fusicoccina son parecidos, pero las plantas transgénicas de ambas isoformas presentan una mayor abertura estomática y tienen una respuesta mayor al tratamiento con la fusicoccina. En fondo ost1-2, las plantas transgénicas de ZmKS1 y 2 tienen una respuesta similar aunque parece que el ZmKS1 en presencia de fusicoccina, tenga menor abertura de estomas. El hecho de que en el fondo C2, el factor ZmKS1 no recupere la abertura estomática en presencia de fusicoccina sugiere que la fosforilacion no juega un papel importante en este proceso.

3. RESULTADOS

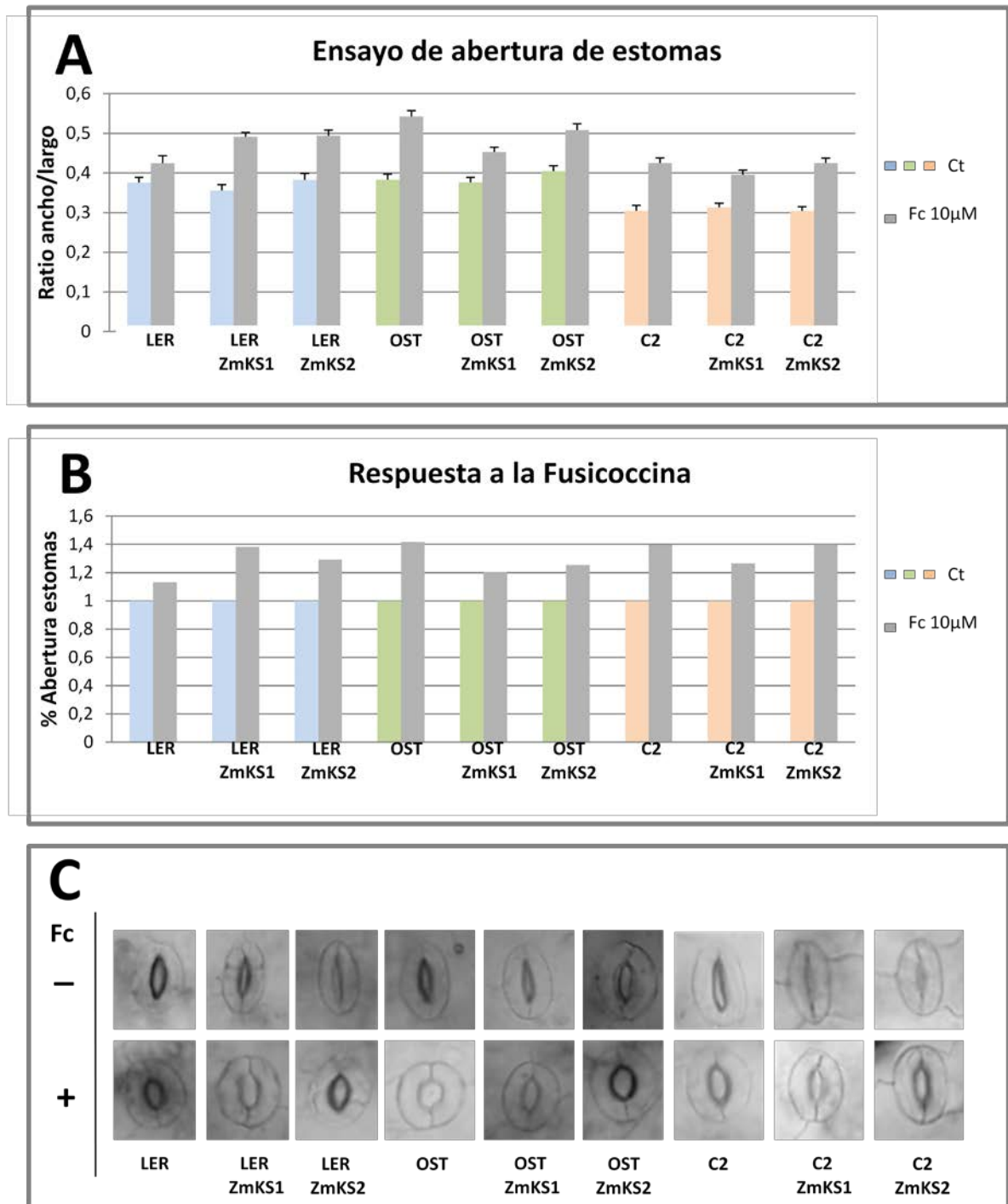


Figura 3.20: Ensayo de abertura estomática de las transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2

A: Gráfica que representa los valores promedio de los "ratios" ancho/largo de estomas obtenidos para cada línea (en color) y los valores después del tratamiento con 01µM Fusicoccina (gris). B: Gráfica con los valores normalizados respecto a los controles correspondientes. C: imágenes representativas de los estomas de cada línea, en condición control y después de tratamiento con Fusicoccina (Fc).

3.2.1.3 Ensayo de tolerancia a la desecación

Para averiguar si la sobre-expresión de las dos isoformas de ZmKS afectaba de alguna forma la respuesta a deshidratación de las plantas, se ha realizado una cinética comparativa de pérdida de agua con la plantas transgénicas sobre-expresantes ZmKS1 y ZmKS2 y los respectivos controles.

Los resultados se muestran en figura la 3.21. En la gráfica A se comparan las cinéticas de deshidratación de las plantas transformadas en cada una de las líneas de mismo fondo genético, mientras que, en la gráfica B, se muestran las cinéticas comparativas por separado de cada isoforma sobre-expresante y las de los controles. Los valores mostrados representan el porcentaje de peso perdido respecto al peso fresco inicial.

En fondo LER y en fondo *ost1-2* observamos que, mientras los controles y las líneas que expresan ZmKS2 tienen cinéticas prácticamente idénticas, las transgénicas sobre-expresantes de ZmZKS1 tienen porcentajes de pérdida de peso inferiores. Esto es evidente sobre todo en fondo *ost1-2* donde el porcentaje de pérdida de agua es casi la mitad (19%) del porcentaje de pérdida de las otras dos líneas, que llegan a perder un 35% del peso a los 90 minutos.

En la grafica en la figura 3.21 B, detectamos que, en la comparación entre los controles (LER, C2 y *ost1-2*) se confirman los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Vilela et al., 2013). En el mutante *ost1-2*, la quinasa AtOST1 está mutada y inactiva. En consecuencia, la ausencia de actividad quinasa provoca un cierre menor de los estomas lo que conlleva una mayor pérdida de agua en la planta *ost1-2* respecto a LER. ZmKS1 en un fondo *ost1-2*, como hemos dicho antes, se deshidrata menos rápidamente, y, sin embargo, expresada en la línea C2 (*ost1-2* complementada con la quinasa ZmOST1 de maíz) recupera en parte el fenotipo de la LER.

En resumen, la tasa de pérdida de agua mayor de ZmKS1 (en rojo) se observa en fondo C2 (donde posiblemente está regulada por la quinasa de maíz), mientras en fondo LER y *ost1-2* la cinética no tiene diferencias significativas. Estos resultados sugieren que la forma no fosforilada de ZmKS1 estimula de alguna manera la capacidad de retención de agua de estas plantas.

3. RESULTADOS

En las transgénicas que expresan ZmKS2 en verde) en fondo C2 es dónde se observa la mayor pérdida de agua. Este efecto es más claro cuando ZmKS2 se expresa en un fondo genético *ost1-2*, donde puede detectarse que la de pérdida de agua es mayor que cuando se expresa en fondo LER.

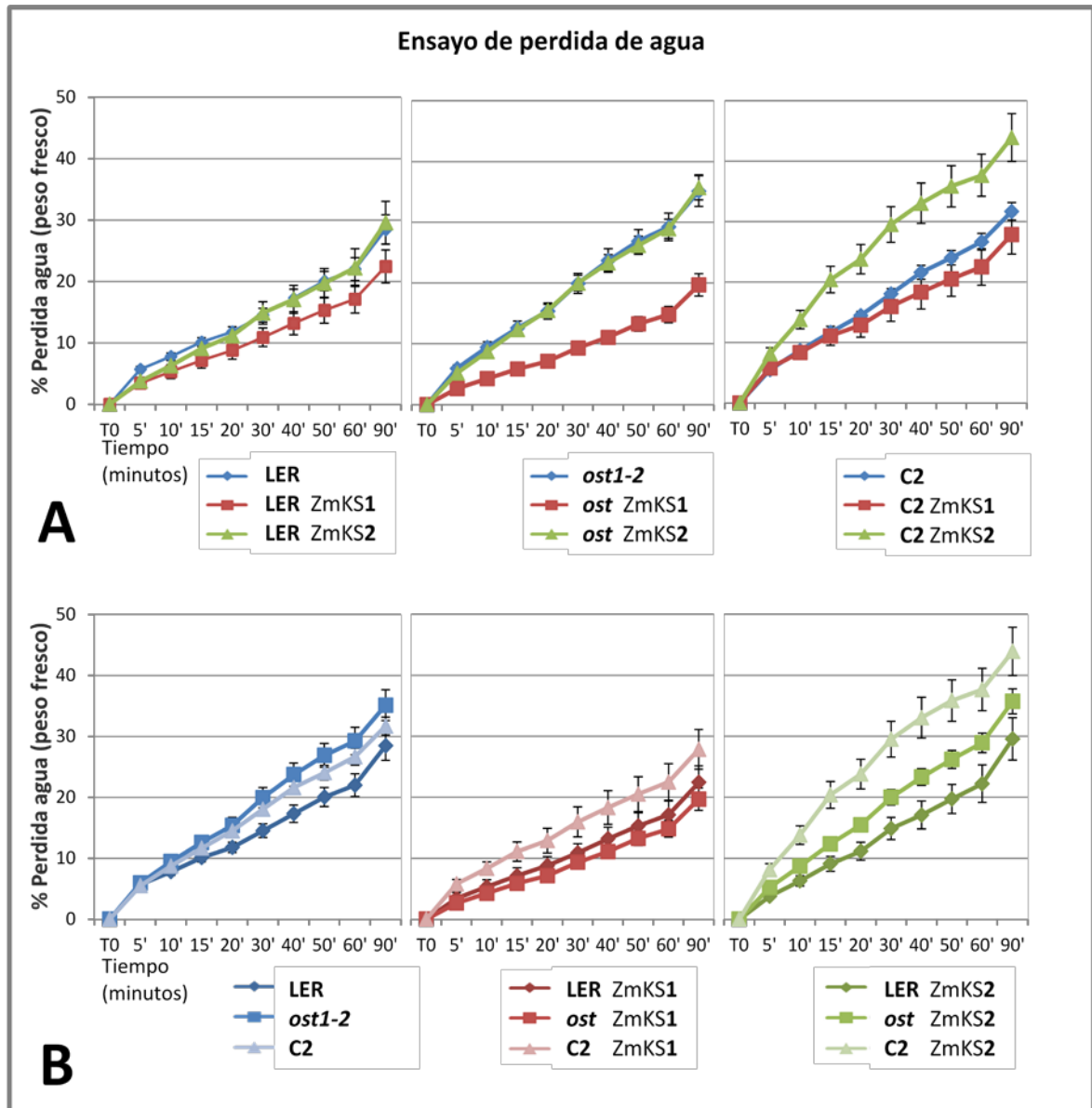


Figura 3.21: Ensayo de pérdida de agua de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2

A: comparación de las tasas de pérdida de agua entre líneas con mismo fondo genético. B: comparación de las cinéticas de deshidratación de los controles y de cada una de las transgénicas que sobre-expresan ZmKS1 y ZmKS2 por separado.

3.2.1.4 Ensayo de floración

Durante el cultivo en invernadero de las líneas transgénicas homocigotas, se observó que líneas de ZmKS2 mostraban fenotipo de floración temprana.

Se decidió, por tanto, realizar un ensayo preliminar para averiguar cuál era el efecto de la sobre-expresión de las dos isoformas en este proceso, comparando las transgénicas en fondo LER con el control correspondiente. Los resultados obtenidos se muestran en la grafica de la figura 3.22 A.

Observamos que no había cambios significativos en el número de hojas en el momento de la aparición del botón floral; las plantas transgénicas ZmKS1 y ZmKS2 tienen una media de 5,5 hojas de roseta y 2 caulinares en el momento de la aparición del botón floral y en el control 7 hojas de roseta y una caulinar.

Se detectaron diferencias (grafica B) a nivel de días de aparición del botón floral. Las plantas que sobre-expresaban el factor ZmKS2 adelantaban entre 2,5-3 días la aparición de su botón floral.

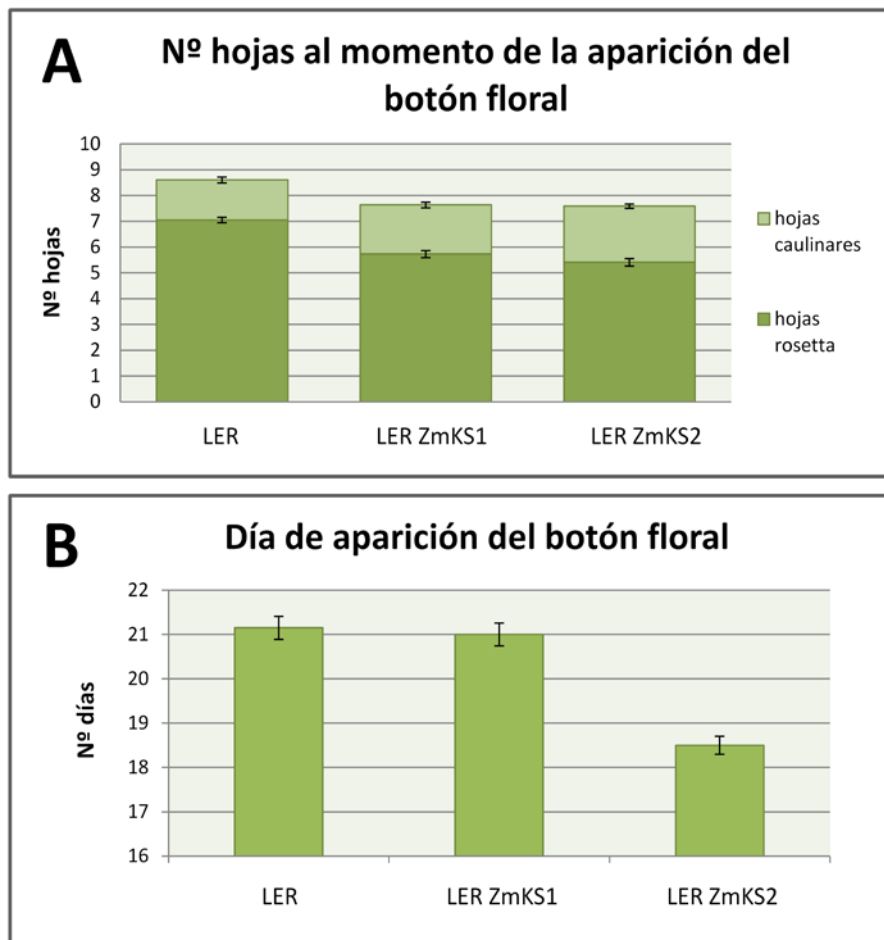


Figura 3.22: Ensayo de floración de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan los factores ZmKS1 y ZmKS2 en fondo LER.

3.2.2 Análisis de líneas transgénicas de *Zea mays*.

Para tener información sobre la función en plantas de los dos factores de transcripción de maíz, se han generado líneas transgénicas de maíz por bombardeo de callos (Amara et al., 2013) obtenidos a partir del genotipo híbrido Hi-II (A188xB73) (Armstrong et al., 1992). Se ha utilizado una construcción para generar líneas de sobre-expresión bajo control del promotor constitutivo de ubiquitina de maíz. En la figura 3.23 se muestra la construcción utilizada para la transformación.



Figura 3.23: Construcción para la transformación de callos de maíz.

En la figura 3.24 A, se muestran imágenes representativas de los callos, donde se notan algunas diferencias. En relación con los callos del control, los callos de la sobre-expresante (ZmKS2-OX) era de tonalidad mas amarilla y producían muchísimas raíces en medio con sacarosa. Los embriones que se generan de estos callos también producen una cantidad alta de raíces mientras que casi no desarrollan hojas. En medio con sacarosa no se observan características anormales y generan muchos embriones de muy buena calidad.

3. RESULTADOS

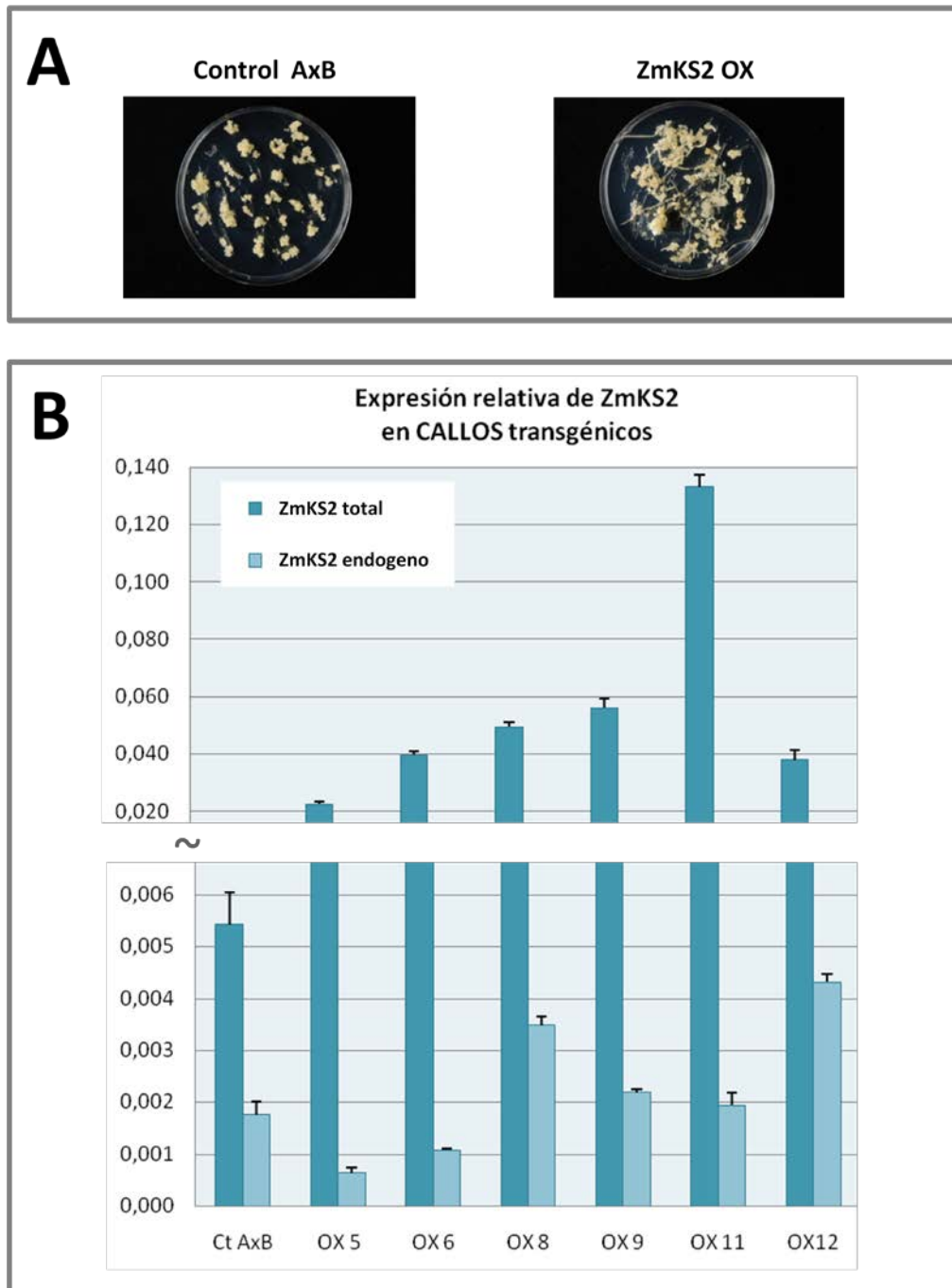


Figura 3.24: Análisis de los niveles de expresión del factor ZmKS2 en los callos Transgénicos de *Zea mays* que sobre-expresan ZmKS2.

A: imágenes representativas de callos transgénicos en fase de selección B: niveles de expresión del factor ZmKS2 en los callos positivos.

Antes de empezar con la fase de generación de embriones, se ha hecho una selección por PCR de los callos generados con cebadores específicos para amplificar la secuencia insertada: un cebador directo del promotor de la ubiquitina UBI_promoter y el cebador reverso C-ter_R1 para las líneas OX (de sobre-expresión)

3. RESULTADOS

Los que dieron resultado positivo, se han analizado por rtPCR para comprobar la abundancia de transcritos del ZmKS2 (figura 3.24 B). Debido a que el factor ZmKS2 no se fusionó en pauta con un tag, el cDNA que deriva del transgén no podía diferenciarse del cDNA endógeno. El cDNA de ZmKS2 endógeno se analizó por rtPCR con cebadores específicos de su zona 3'-UTR. Los cebadores utilizados fueron: C-ter_F2 como cebador directo y 3'UTR-R1 como reverso. Para analizar los niveles de transcritos totales de ZmKS2, es decir, la suma del endógeno más el transgén se utilizaron los cebadores C-ter_F1 como directo y C-ter_R1 como reverso. Estos últimos cebadores amplifican una porción interna a la secuencia codificante del ZmKS2.

Solo algunos de los callos seleccionados han llegado a dar plantas, los otros, se descartaron debido a problemas de crecimiento surgidos durante la fase de aclimatación (traslado de las plantas de cultivo in vitro a tierra). En paralelo se han generado también plantas controles.

En la figura 3.25 A se muestran imágenes representativas de las plantas generadas después de 15-20 días de aclimatación en invernadero.

En la grafica B se muestran los resultados de expresión relativa de ZmKS2 en hojas de plantas control y en hojas de las líneas transgénicas obtenidas. Los cebadores utilizados en las rtPCRs para detectar la abundancia de transcrito del ZmKS2 endógeno y el ZmKS2 total (suma del endógeno + el sobre-expresado) son los mismos que los utilizados en el análisis de callos.

3. RESULTADOS

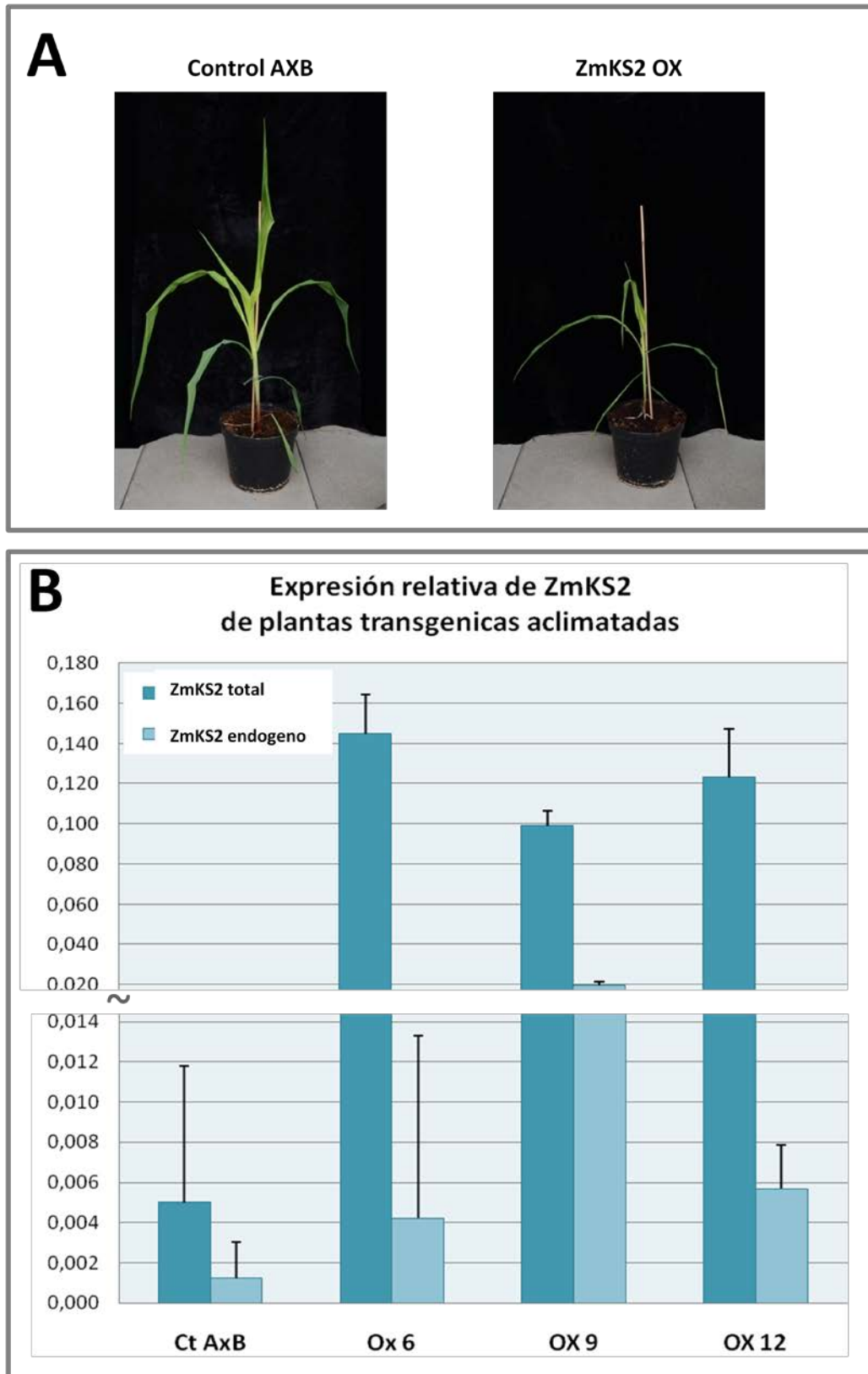


Figura 3.25: Análisis de los niveles de expresión del factor ZmKS2 en las Plantas Transgénicas de *Zea mays*.

A: imágenes representativas de las plantas transgénicas aclimatadas. B: niveles de expresión del ZmKS2 en hojas de plantas transgénicas. Los niveles de transcrito endógeno se representan en azul claro y los totales en azul oscuro.

3. RESULTADOS

Para averiguar si el ZmKS2 determina cambios a nivel de conformación y número de estomas por unidad de superficie, se ha llevado a cabo un análisis fenotípica utilizando moldes de hojas de las líneas transgénicas sobre-expresantes.

En la figura 3.26 A se muestra una imagen representativa de los moldes realizados. En general no se han encontrado diferencias fenotípicas entre las transgénicas y el control, ni a nivel de número de estomas por mm^2 (grafica B), ni a nivel de porcentaje de la superficie ocupada por estomas (grafica C), con lo que se puede deducir que en las líneas transgénicas los distintos niveles de pérdida de agua obtenidos en el apartado anterior no están determinados por fenotipos divergentes, pero por una regulación distinta de la apertura estomática determinada por el TF ZmKS2.

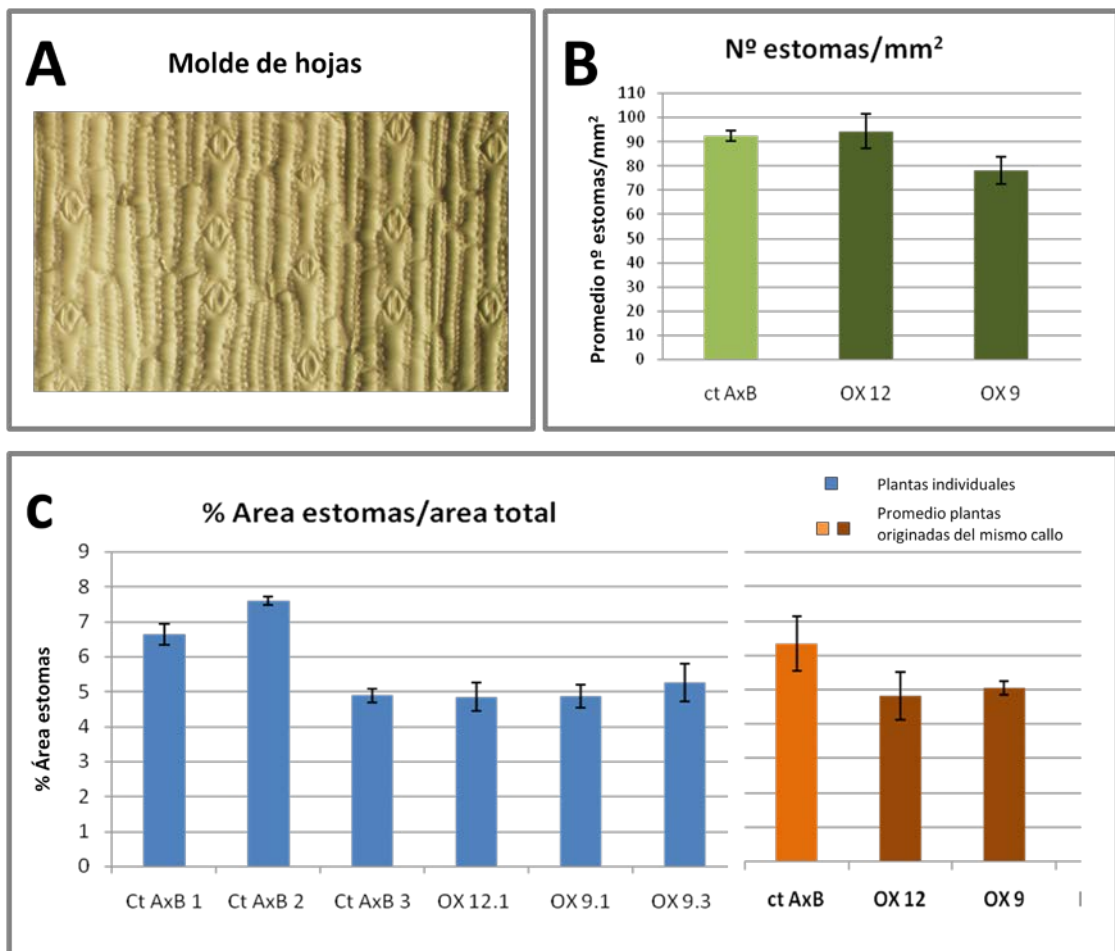


Figura 3.26: Estudio del patrón estomático de las plantas transgénicas de *Zea mays*.

A: imagen representativa de los molde de hojas de maíz realizados. B: análisis del número de estomas por unidad de superficie C: grafica indicativa del % de superficie ocupado por estomas en las diferentes líneas. En azul se muestran los resultados obtenidos por plantas individuales, mientras con distintos tonos de naranja los promedios de los valores obtenidos por plantas generadas a partir del mismo callo.

3.2.2.1 Ensayos de tolerancia a la desecación

Con algunas de las plantas transgénicas generadas que sobre-expresan ZmKS2 se decidió iniciar ensayos fisiológicos en estas plantas para explorar el posible efecto regulador del factor ZmKS2 en maíz.

A pesar de que las plantas transgénicas generadas podrán ser una herramienta valiosa para posteriores estudios, en este trabajo solo hemos podido realizar una cinética de pérdida de agua para averiguar si los diferentes niveles de expresión del factor ZmKS2 afectaban de alguna forma la regulación del movimiento estomático en respuesta a la deshidratación.

En la figura 3.27, se muestra el resultado del experimento. En la grafica A se comparan los valores obtenidos de pérdida de agua respecto al peso fresco en los callos control y en callos de dos líneas ZmKS2 (OX6 y OX12). En la grafica B, se ha calculado el promedio de los valores de las dos líneas que sobre-expresan ZmKS2 (OX6 y OX12) para tener una imagen más clara de cuál es el efecto general del factor de transcripción. Observando los valores de pérdida de agua por líneas individuales se detectó que la línea OX 12 llega a perder hasta el 25 % del peso, el triple respecto al control Ct AxB. En la grafica B se observó que esta diferencia se mantiene significativa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de pérdida de agua con las líneas transgénicas ZmKS2 de *Arabidopsis* descrita anteriormente en este trabajo.

3. RESULTADOS

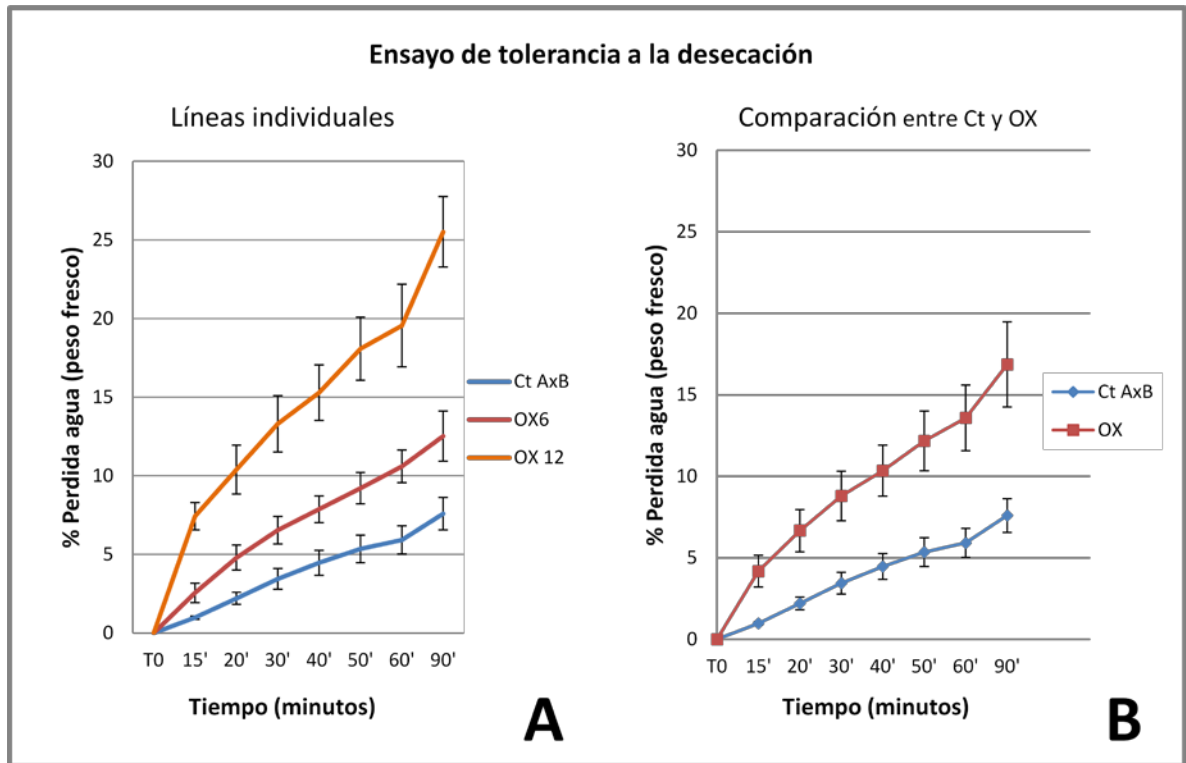


Figura 3.27 : Ensayo de pérdida de agua en plantas transgénicas de *Zea mays* que sobre-expresan el factor de transcripción ZmKS2.

A: comparación de los valores obtenidos por pérdida de agua entre plantas de líneas individuales. B: comparación de los valores obtenidos entre plantas control y los valores promedio obtenidos en las líneas de sobre-expresión de ZmKS2 OX6 y OX12

4. DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo es la caracterización de un factor de transcripción de maíz, interactor de la quinasa ZmOST1, que contiene un dominio bHLH y que puede estar involucrado en la regulación de la respuesta al ABA y al estrés abiótico en el maíz.

El gen que codifica esta proteína es el GRMZM2G114873. Del cribado de doble híbrido obtuvimos una primera isoforma, nombrada ZmKS2, y posteriormente, debido a actualizaciones en la secuenciación del genoma de maíz, se encontró otra proteína codificada por el mismo gen, más larga, que nombramos ZmKS1. Las dos isoformas fueron aisladas por medio de la técnica de PCR a partir de cDNA de maíz.

Se ha hecho un análisis *in silico* de la zona *up-stream* del ZmKS2 y se ha encontrado la secuencia TGCAGG, correspondiente a un motivo consenso de *splicing* (3' *intron-exon splice junctions*). Este dato nos confirma que la presencia de las dos isoformas ZmKS1 y 2 es el resultado de un *splicing* diferencial.

Por alineación de las secuencias, se ha comprobado la homología entre las dos isoformas, que difieren solo en la zona N-terminal. La isoforma ZmKS1 presenta una extensión de 129 aa en el extremo N-terminal respecto a la isoforma ZmKS2. Sin embargo ZmKS2 tiene una extensión de 41aa más, en la zona C-terminal que ZmKS1.

En maíz hemos observado que los niveles de transcritos son muy diferentes para cada isoforma: ZmKS1 presenta una expresión relativa mucho más baja que ZmKS2. De todas formas, ambas responden a ABA aumentando en hoja y a NaCl aumentando en hoja y raíz. Sin embargo el patrón de inducción es moderado y no comparable a los niveles de inducción detectados en otros genes inducibles por ABA involucrados en la respuesta de tolerancia a estreses abióticos como sequía y estrés hiper-osmótico. Por ejemplo, el gen de maíz *rab17*, que codifica una proteína de tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant protein*) se induce considerablemente tras un tratamiento con esta ABA (Goday et al., 1994).

En la base de datos se detectan 7 genes parálogos y 48 ortólogos de ZmKS, aunque, para la mayoría el grado de identidad con las dos isoformas ZmKS1 y ZmKS2 es muy bajo. En general las homologías se concentran en la región del dominio bHLH. De estos genes (los potenciales parálogos y 48 ortólogos) se detallan características generales, como la capacidad de dimerización, de unión a DNA y/o la presencia del dominio bHLH, pero solo algunos han sido estudiados en detalle.

Entre los genes ortólogos, dos genes, *aks1* y *aks2* han sido descritos en *Arabidopsis thaliana* como TFs de tipo bHLH. Estos dos genes, han estado relacionados con abertura de estomas, estimulando la transcripción del gen *KAT1*, codificante un canal de K⁺ en las células de guardia. Además, se ha comprobado que la quinasa *AtOST1* inhibe *ask1* y *ask2* por fosforilación dependiente de ABA y que esto contribuye al cierre estomático (Takahashi et al., 2013).

Comparando el grado de homología entre el factor ZmKS de maíz y los ortólogos ASKs de *Arabidopsis* se deduce que aparte del elevado grado de identidad entre los dominios bHLHs de los factores (especialmente en la zona responsable de la unión a DNA), también se ha visto que en los factores AKS 1y 2 se conservan casi todos los residuos potencialmente fosforilables predichos por análisis *in silico* de las secuencias de ZmKSs. Además, en la zona N-terminal de la isoforma ZmKS1 se encuentran conservados dos motivos de unión a proteínas 14:3:3 presentes también en los factores AKSs. Posteriormente, se ha visto que estos dos motivos coinciden con dos motivos de fosforilación canónicos de la *ZmOST1* (LXRXX(S/T)). En las AKS1 y 2 la unión a proteínas 14:3:3 es dependiente de ABA. Este mecanismo de regulación podría estar conservado en el gen ZmKS1 y ser causa de una regulación diferencial entre las dos isoformas de ZmKS, Esta regulación diferencial podría ser debida a la falta en *ZmKS2*, de la zona N-terminal donde se encuentran dichos motivos de interacción con proteínas 14:3:3.

En este trabajo se ha confirmado que ZmKS1 y ZmKS2 son factores de transcripción. A nivel de secuencia, en el dominio bHLH de ambas isoformas, se encuentran conservados los aa responsables de la unión a DNA y de dimerización. ZmKS1 y ZmKS2 localizan y pueden homo- y hetero-dimerizar en núcleo.

Mediante un análisis de tipo SELEX, hemos averiguado que el ZmKS es capaz de unirse a elementos cis de 7 bp que tengan cajas E-box o E-box like. Esta última en particular (CAAGTTG) ha sido descrita como motivo específico de represión (Wang et al., 2011). De hecho, en *Arabidopsis* esta caja está muy representada en promotores de genes reprimidos por ABA en hojas y en células guardia de estomas (Wang et al., 2011). A diferencia de los factores bHLH descritos que reconocen cajas E-box exactas (de 6 bp) (Robinson & Lopes, 2000, Grove et al., 2009, Gordân et al., 2013, Atchley et al., 1999, Massari & Murre, 2000a), el factor de maíz necesita una base más para que la unión sea efectiva. Todas estas características indican que ZmKS es un factor de transcripción de tipo bHLH.

En células eucarióticas, la fosforilación reversible de proteínas es el mecanismo de control principal en la mayoría de los eventos intracelulares (Hunter, 1995). En proteínas reguladoras, la fosforilación y desfosforilación de residuos de serina (Ser), treonina (Tre) y tirosina (Tir) provocan cambios conformacionales y variaciones en sus propiedades biológicas.

Como hemos descrito, en la zona N-terminal de ZmKS1 se encuentran conservados dos motivos de unión a proteínas 14:3:3 que coinciden con dos motivos de fosforilación canónicos de la quinasa ZmOST1 (LXRXX(S/T) (Vlad et al., 2008). Además de estos dos motivos, la presencia de otros residuos potencialmente fosforilables y específicos de cada isoforma sugiere la existencia de un mecanismo de regulación diferencial en planta de ZmKS1 y ZmKS2, operada por la quinasa.

La fosforilación por ZmOST1 de las dos isoformas de ZmKS se ha confirmado por medio del ensayo quinasa *in vitro* e *in gel*. En protoplastos de hoja de maíz se ha podido observar que la fosforilación por ZmOST1 no cambia la localización nuclear de los dos TFs. En ausencia de ABA, la sobre-expresión de ZmKS1 tiene tendencia a organizarse en *speackles*. Sin embargo, al tratar las células con ABA o bien, cuando el factor ZmKS se co-transforma con la quinasa de maíz (ZmOST1) activa. Estos agregados fluorescentes o *speackles*, son menos evidentes. Inicialmente hemos imputado la causa del distinto patrón de distribución en núcleo de la ZmKS1 respecto al de ZmKS2 a la simple sobre-expresión. Esto no explicaba la diferencia de distribución de ZmKS1 en núcleo entre protoplastos tratados y no con ABA. La hipótesis que hemos generado es que la fosforilación

juega un papel fundamental en este mecanismo. ABA induce la fosforilación proteica tanto de ZmKS1 como de ZmKS2, lo que conlleva una distribución homogénea en núcleo de las dos isoformas fosforiladas. Sin embargo, en ausencia de ABA, la fosforilación de ZmKS1 es mucho menor y en consecuencia, podría formar parte de grandes complejos transcripcionales (patrón speckle). Hay que tener en cuenta que ZmKS1 presenta en la región N-terminal por lo menos 3 residuos fosforilables por la quinasa ZmOST1 y que no están presentes en ZmKS2. Probablemente esto explicaría las diferencias de distribución de las proteínas en núcleo, la extensión N-terminal "fosforilable" podría afectar a la estructura del factor y a su capacidad de formar agregados proteicos en ausencia de esta modificación post-traducciona.

Las dos isoformas interactúan con la ZmOST1 *in planta* independientemente de la actividad quinasa de esta última, como se ha averiguado en protoplastos de maíz. La interacción ocurre en el dominio "osmótico" y en el dominio "ABA". Este último dominio se ha descrito como dominio fundamental para la regulación negativa de la quinasa actuada por las fosfatasa PP2Cs (Yoshida et al., 2006) y como posible zona de unión de otros sustratos (Vilela et al., 2013). La interacción con el dominio osmótico sugiere su posible papel no tan solo como activador de la quinasa bajo condiciones de estrés osmótico sino también como posible zona de unión de sustratos de la quinasa. Se observan diferencias a la localización celular de estas interacciones: con ZmKS2 son nucleares y citoplasmáticas mientras que con ZmKS1 resultan tener lugar solo a nivel nuclear. Esto puede ser debido a modificaciones post-traduccionales (fosforilación) de ZmKS1 en su extremo N-terminal, donde se encuentran ulteriores sitios de fosforilación específicos para la OST1. Un sistema de este tipo ha sido descrito para el factor de transcripción NTL6 de *Arabidopsis* (de la familia de los TFs de tipo NAC) que se localiza en citoplasma y núcleo, pero su localización nuclear aumenta cuando es fosforilado por la quinasa SnRK2.8 (involucrada también en la respuesta a sequía (Mustilli et al., 2002), durante la señalización por ABA (Kim et al., 2012).

La creación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el promotor del gen fusionado a GUS ha permitido mostrar que estos factores se expresan en embriones, especialmente en ápice radical y en una porción intermedia de la raíz de plántulas de 8 días. Este resultado está en acuerdo con el obtenido del análisis *in silico* del promotor, donde se han encontrado 2 cajas CE1 reconocidas por el TF ABI4 de maíz (Wind et al., 2012). Este factor fue inicialmente descubierto como uno de los 5 mutantes *ABA-insensitive* (Finkelstein, 1994, Cutler et al., 2010, Finkelstein et al., 1998) y sucesivamente como mutante tolerante a NaCl y manitol (Quesada et al., 2000); el ABI4 de maíz complementa el mutante de *Arabidopsis* (Niu et al., 2002). Juega un rol esencial en la transcripción dependiente de ABA. En *Arabidopsis* activa genes involucrados en la germinación (Reeves et al., 2011) y sus niveles de expresiones disminuyen mientras se establece la plántula (Söderman et al., 2000), aunque sucesivamente un nivel básico de expresión queda presente durante la formación de raíces laterales en estadios más avanzados de desarrollo de planta. Su sobre-expresión no acelera la germinación, pero reprime la germinación cuando se añade ABA (el ABA lo inhibe) (Finkelstein et al., 2011).

En el promotor se han identificado también una TATA box y dos cajas que resultan muy enriquecidas entre los genes inducidos por ABA: una específica de hoja (TGCAA) y otra específica de las células guardia de los estomas (GTCCG) (Wang et al., 2011). Esto podría explicar porqué en maíz, tras tratamiento de ABA, se observa una mayor expresión del ZmKS en hoja que en raíz.

A nivel funcional, la sobre-expresión del ZmKS2 determina fenotipo de floración, anticipando la aparición del botón floral de 2,5-3 días respecto al control y a la línea sobre-expresante de ZmKS1. Se ha realizado un análisis *in silico* de las secuencias promotoras del gen CONSTANS, involucrado en la promoción de la floración en *Arabidopsis* (Suárez-López et al., 2000), y se ha visto que en su promotor está presente el heptámero E-box like (CCACTTG) preferentemente reconocido por el factor ZmKS.

Con altas concentraciones de NaCl o manitol, la sobre-expresión del factor ZmKS1 fosforilado regula negativamente el proceso de germinación: en la transgénica en fondo wild type se determina un retraso en la germinación que se

recupera en fondo *ost1-2* cuando el factor no está fosforilado. Esta regulación negativa no es tan evidente en las transgénicas de ZmKS2, aunque en fondo *ost1-2* (en ausencia de la quinasa AtOST1) la tasa de germinación no alcanza el 100%.

Con altos niveles de ABA, la sobre-expresión de ambas isoformas dan fenotipos similares, incrementando la tasa y rapidez de germinación en fondo *ost1-2*. Este ensayo nos indica que la fosforilación del factor inducida por la cascada de señalización del ABA retrasa la germinación y que el factor no fosforilado en ausencia de la quinasa (fondo *ost1-2*) acelera el proceso de germinación.

La fosforilación de los factores afecta de forma positiva el cierre estomático en particular en el caso del ZmKS1, que tiene una respuesta ABA sensiblemente mayor. En abertura, el ZmKS2 responde más al estímulo de la fusicoccina facilitando la abertura cuando está fosforilado por la ZmOST1 y determina una respuesta sensiblemente mayor.

Los ensayos de pérdida de agua en las plantas transgénicas sobre-expresando las dos isoformas, muestran que el ZmKS1 determina en general una pérdida de agua menor respecto a los controles, y que la falta de fosforilación aumenta la capacidad de estas plantas de retener agua. El corto, a cambio parece influir en una mayor pérdida de agua especialmente cuando esté fosforilado por la quinasa de maíz. Este último resultado se confirma en la cinética de pérdida de agua de las transgénicas de maíz, donde las líneas sobre-expresantes llegan a perder hasta el 50 % más de agua respecto al control. Estos datos sugieren una acción diferencial de las dos isoformas del ZmKS, debido posiblemente a las cantidades relativas de cada isoforma así como a diferencias estructurales de las dos proteínas debido a su fosforilación por la quinasa OST1.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1- Utilizando las técnicas de PCR se han aislado las dos isoformas del factor de transcripción bHLH que se han denominado ZmKS1 y ZmKS2 (*kinase substrate*).

2- El estudio del patrón de transcripción del factor ZmKS muestra su expresión en hoja y raíz de maíz así como en embrión y radícula en plantas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras del promotor ZmKS fusionado a GUS.

3- La comparación de los niveles de transcripción de las dos isoformas ZmKS1 y ZmKS2 indican que los niveles de transcritos de ZmKS2 son más elevados que los detectados para ZmKS1 sin embargo su respuesta a los distintos tratamientos es similar para ambas isoformas detectándose un aumento de su RNA en hoja tras el tratamiento con ABA y en hoja y raíz tras tratamiento con NaCl.

4- Tanto la localización subcelular exclusivamente nuclear de ZmKS como su posibilidad de formar homo y heterodímeros y su interacción preferente con la secuencia de DNA E-box like de 7 bp CCACTTG indica un comportamiento como corresponde a un factor de transcripción del tipo bHLH.

5- Las dos isoformas de ZmKS presentan residuos fosforilables por la quinasa OST1 que son específicos de cada isoforma y ambas son directamente fosforiladas por ZmOST1 in vitro.

6- Las dos isoformas ZmKS1 y ZmKS2 interactúan en planta con la quinasa OST1 de maíz a través del dominio osmótico y/o ABA de la quinasa, esta interacción es nuclear para ZmKS1 mientras para ZmKS2 se localiza en núcleo y citoplasma.

7- La sobre-expresión en *Arabidopsis* de ZmKS determina un retraso en la germinación que es dependiente de fosforilación y del tratamiento con ABA.

8- Las plantas transgénicas de ambas isoformas ZmKS1 y ZmKS2 presentan una mayor apertura estomática y una respuesta mayor a la fusicoccina. Sin embargo la regulación estomática en estas plantas no depende de fosforilación.

5. CONCLUSIONES

9- Los ensayos de tolerancia a la desecación tanto en plantas transgénicas de maíz como de *Arabidopsis* sobre-expresando ZmKS2 presentan una tasa mayor de pérdida de agua, que en el caso del maíz alcanza un 25% de pérdida de peso, más del doble respecto al control.

10- El efecto diferencial de las dos isoformas en la pérdida de agua en las plantas transgénicas sugiere un importante papel regulador del gen ZmKS en la tolerancia a la desecación. ZmKs se autoregularía tanto por splicing diferencial alterando las cantidades relativas de cada isoforma ZmKS1y ZmKS2 como mediante la fosforilación/defosforilación de las mismas.

6. MATERIALES Y METODOS

A continuación se detallan tanto los materiales como los protocolos utilizados para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Los métodos generales de manipulación de ácidos nucleídos y proteínas como también los relacionados con el cultivo y manipulación de bacterias se han extraído o basado en los descritos en los manuales *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1989).

El agua utilizada es generalmente des-ionizada (dH₂O), mientras para experimentos de biología molecular es bi-destilada (ddH₂O, por medio del destilador y desionizador de agua Millipore Milli-Q).

La esterilización de las soluciones utilizada se efectúa por calor húmedo (por medio de autoclaves de vapores de agua a 120°C y presión de una atmosfera durante 20 minutos) o por filtración (con filtros de 0,45 o 0,22µm). El pH de los medios se arregla antes de someterlos al ciclo de autoclave.

Para la esterilización del material (como puntas, vasos de precipitado, etc) se utiliza tratamiento en autoclave seco.

Materiales

6.1.1 Material vegetal

6.1.1.1 Arabidopsis

Los experimentos con *Arabidopsis thaliana* se realizaron con:

- el ecotipo Landsberg erecta (**LER**).
- el ecotipo LER portadora de la mutación recesiva **ost1-2** en el gen SnRK2.6/AtOST1 (At4g33950) (Mustilli et al., 2002).
- la línea transgénica **C2**, producida en nuestro grupo (Vilela et al., 2013), donde el mutante *ost1-2* está complementado con la quinasa de maíz SnRK2.8/ZmOST1.

6. MATERIALES Y METODOS

Para el cultivo in-vitro, las semillas se ponen en eppendorfs y se esterilizan durante 4 h en un desecador en el cual se coloca un vaso de precipitados con 100 ml de lejía y 3 ml de HCl al 37% (la esterilización se efectúa por la liberación de vapores de Cl₂), luego se siembran en placas de Petri con medio sólido 0,5X MS o MS1.

Para plantas transgénicas, en el caso de selección de la primera generación de semillas transformantes (T1) se añaden 200 mg/l de antibiótico Timentina o Cefotaxima para evitar el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*.

Una vez sembradas, las placas se mantienen 3-4 días a 4°C en oscuridad para romper la dormancia y homogenizar la germinación.

Los cultivos se realizan en cámara de crecimiento a 21°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Para el cultivo directo en invernadero las semillas no se esterilizan, aunque se someten igualmente al tratamiento de 4°C durante 3-4 días en oscuridad (normalmente se ponen en nevera en un eppendorf o en una placa de Petri y sobre un papel de filtro humedecido con agua). Transcurrido este tiempo, las semillas se transfirieron a tiestos con una mezcla de turba, perlita y vermiculita (2:1:1).

Medio 0,5X MS: 2,2 g/l Murashige & Skoog con vitaminas, 0,25 g/l MES, 5 g/l Sacarosa, pH 5,7-5,9 (ajustar con KOH 1N). Para preparar medio sólido, añadir 8 g/l Plant agar. Autoclavar.

Medio MS1.: 4,4 g/l Murashige & Skoog con vitaminas, 0,5 g/l MES, 10 g/l Sacarosa, pH 5,7-5,9 (ajustar con KOH 1N). Para preparar medio sólido, añadir 8 g/l Bacto Agar. Autoclavar.

6.1.1.2. Maíz

Las variedades de maíz (*Zea mays*) utilizadas durante los experimentos son la línea pura W64A y la línea híbrida B73 x MO17.

Para los tratamientos: la semillas W64A se esterilizan poniendolas en etanol durante 5 min, seguidos de 10 min en hipoclorito de sodio al 5% y de varios lavados con agua destilada estéril, y se dejan O/N en agua para que se imbiban y se rompa la

dormancia. Luego se ponen a crecer en condiciones hidropónicas en soportes de lana de roca, con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 28°C y 8 horas de oscuridad a 26°C.

La línea B73 x MO17 se ha utilizado para crecer plántulas para aislamiento de protoplastos: las semillas se dejan O/N en agua y al día siguiente se siembran en macetas con tierra y se ponen a crecer durante 13 días en condiciones de oscuridad a 28°C y con un 70% de humedad.

La obtención de plantas transgénicas de maíz se ha realizado por bombardeo (biobalística) de callos generados a partir del genotipo híbrido Hi-II (A188xB73) (Armstrong et al., 1992) con micro-partículas de oro recubiertas de material genético.

6.1.2 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- *E. coli* DH5α para la amplificación de plásmidos y construcciones (heat shock).
- *E. coli* TOP10 para la amplificación de plásmidos y construcciones (heat shock).
- *E. coli* BL21 Rosetta para la sobre-expresión de proteínas recombinantes (heat shock, Clf^R).
- *A. tumefaciens* EHA105 para la transformación transitoria en *Nicotiana bentamiana* (heat shock).
- *A. tumefaciens* GV2260 para obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* por medio del método *floral dip* (electrocompetentes).

Los cultivos de *E. coli* se han realizado en medio LB a 37°C suplementado con el antibiótico necesario en cada caso (25µg/ml Kanamicina, 100µg/ml Carbenicilina (o Ampicilina) según el plásmido utilizado para la construcción; en caso de BL21 Rosetta se añade también Chloranfenicol 34µg/ml): para cultivos líquidos en tubos de cultivos en agitación a 250 rpm mientras para cultivos sólidos en placa.

6. MATERIALES Y METODOS

A. tumefaciens se creció en medio YEB a 28°C, suplementado con los antibióticos correspondientes (50µg/ml Rifampicina y 25µg/ml Kanamicina): para cultivos líquidos en tubos de cultivos en agitación a 250 rpm, mientras para cultivos sólidos en placa.

Los cultivos o cepas bacterianas se guardan permanentemente a -80°C en tubos para glicerizados con 25% de glicerol.

Medio LB: 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH 7,5 (ajustar con NaOH 1N). Para preparar medio LB sólido, añadir 15 g/l agar. Autoclavar.

Medio YEB: 5 g/l extracto de carne, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 0,5% sacarosa, 2 mM MgSO₄, pH 7,5 (ajustar con NaOH 1N). Para preparar medio YEB sólido, añadir 15 g/l agar. Autoclavar.

6.1.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6.1.: Lista de plásmidos utilizados

| PLASMIDOS | SELECCIÓN | USO | REFERENCIA /CASA COMERCIAL |
|----------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|
| pCR [®] 2.1 | Cb ^R o Amp ^R | Clonación de productos de PCR con sistema <i>TA-cloning</i> | Invitrogen |
| pENTRY3C | Km ^R | Clonación de productos de PCR | Invitrogen |
| pET-28a | Km ^R | Vector de expresión (HIS-tag) | Novagen |
| pCAMBIA1300 | Km ^R , Hyg ^R | Vector binario para transformación estable/transitoria | Cambia TM |
| pCAMBIA 1302 | Km ^R , Hyg ^R | Vector binario para transformación estable/transitoria (GFP-tag) | Cambia TM |
| YFP ^N | Km ^R , Hyg ^R | Vector binario usado en transformación transitoria para BiFC (YFP ^N -tag) | Ferrando <i>et al.</i> 2000 |
| YFP ^C | Km ^R , Hyg ^R | Vector binario usado en transformación transitoria para BiFC (YFP ^C -tag) | Ferrando <i>et al.</i> 2000 |
| pMENCHU | Cb ^R o Amp ^R | Vector de expresión (HA-tag) | Clontech |
| pETM-40 | Km ^R | Vector de expresión (MBP-tag) | Novagen |
| pPK100 | Cb ^R o Amp ^R | Transformación transitoria (GFP-tag) | Clontech |
| pBI101 | Km ^R | Vector de expresión (GUS reporter) | Clontech |
| pANIC 5D | Km ^R | Vector de expresión | Mann |

Las concentraciones de antibióticos y suplementos utilizadas para la selección de las bacterias fueron las siguientes:

- Ampicilina o Carbenicilina: 100 µg/ml
- Kanamicina: 25 µg/ml
- Cloranfenicol 34µg/ml
- Rifampicina: 100 µg/ml
- IPTG: 23,8 µg/ml
- X-Gal: 40 µg/ml

6.1.3 Construcciones

Las construcciones utilizadas se describen en la tabla siguiente:

Tabla6.2: Lista de las construcciones utilizadas en este trabajo

| CONSTRUCCIÓN | VECTOR | DIANAS DE CLONAJE | ORIGEN DNA |
|--------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| ZmKS2 | pCR [®] 2.1 | Fragmento PCR | PCR de cDNA |
| ZmKS2 | pET-28a | EcoRI-XhoI | ZmKS2-pCR [®] 2.1 |
| ZmKS2 | pPK100 | NcoI-NcoI | ZmKS2-pCR [®] 2.1 |
| ZmKS2 | pETM-40 | NcoI-NcoI | ZmKS2-pCR [®] 2.1 |
| ZmKS2 | pCAMBIA1300 | HindIII (cassette pPK100) | ZmKS2-pPK100 |
| ZmKS2 | pENTRY3C | Fragmento PCR | PCR cDNA |
| ZmKS2 | YFP ^N | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS2-pENTRY3C |
| ZmKS2 | YFP ^C | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS2-pENTRY3C |
| ZmKS2 | pANIC 5D | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS2-pENTRY3C |
| | | | |
| ZmKS1 | pCR [®] 2.1 | Fragmento PCR | PCR de cDNA |
| ZmKS1 | pET-28a | EcoRI-EcoRI | ZmKS1-pCR [®] 2.1 |

6. MATERIALES Y METODOS

| | | | |
|--------------|------------------|----------------------------|------------------------|
| ZmKS1 | pPK100 | NcoI-NcoI | ZmKS1- pCR®2.1 |
| ZmKS1 | pCAMBIA1300 | HindIII (cassette pPK100) | ZmKS1- pPK100 |
| ZmKS1 | pENTRY3C | Fragmento PCR | PCR cDNA |
| ZmKS1 | YFP ^N | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS1- pENTRY3C |
| ZmKS1 | YFP ^C | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS1- pENTRY3C |
| ZmKS1 | pANIC 5D | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS1- pENTRY3C |
| | | | |
| N-ter | pCR®2.1 | Fragmento PCR | PCR de cDNA |
| N-ter | pET-28a | NcoI-NcoI | N-ter-pCR®2.1 |
| | | | |
| pZmKS1 | pCR®2.1 | Fragmento PCR | PCR de DNA genomico |
| pZmKS1 | pET-28a | BamHI-Sall | pZmKS1- pCR®2.1 |
| | | | |
| ZmOST1 | pCR®2.1 | Fragmento PCR | PCR de cDNA |
| ZmOST1 | pET-28a | EcoRI-XhoI | ZmOST1- pCR®2.1 |
| ZmOST1 | pMENCHU | Sall-EcoRI | ZmOST1- pCR®2.1 |
| ZmOST1 | pCAMBIA1300 | HindIII (cassette pPK100) | ZmOST1- pPK100 |
| ZmOST1 | pENTRY3C | Fragmento PCR | PCR cDNA |
| ZmOST1 | YFP ^N | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS1- pENTRY3C |
| ZmOST1 | YFP ^C | Recombinación con pENTRY3C | ZmKS1- pENTRY3C |
| | | | |
| ZmOST1[G40R] | pCR®2.1 | Fragmento PCR | PCR de cDNA |
| ZmOST1[G40R] | pMENCHU | Sall-EcoRI | ZmOST1.ATP- pCR®2.1 |
| ZmOST1[G40R] | pCAMBIA1300 | HindIII (cassette pMENCHU) | ZmOST1.ATP- pPK100 |

6.1.4 Primers / cebadores

Tabla 6.3: lista de primers utilizados en este trabajo.

| NOMBRE | Secuencia Forward (5'-3') | Secuencia Reverse (5'-3') |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| UBI_promoter | CCTTCATACGCTATTTATTTGC | |
| RealT_Lar-Cor_F3 | GCGCAGTCTCTCTACCT | GGCAGACGAGAACATGATGGA |
| AtCIPK23 RT | TCCGCACACGAGAGTTGAAT | GGGATTTTCGCAACGCTCATC |
| AtAKT1 RT | AGACCCCAATTGCAGAGACG | CGTGCAAGCAAAATGACCCA |
| AtKAT1 RT | AGAAGTTTCCCCGTGTTGCT | TCGAGTCCAAGAGATCGACA |
| AtKAT 2 RT | AGTGGCTTGTGGTGGTTCA | TCTCTCCATTGAGTTGACCCC |
| AtOST2 RT | CGGTGGAGAGTTTCGTCTGTT | CCCCTCTGTCTGTTTCACC |
| AtRBOHF RT | CCGACGACAACACCGGAATA | AACTGTTTCGCTTTTCGCCAC |
| AtRBOHD RT | ACGTGCGTCCAAGAAAACG | GTCGTCCCTGATGTCTAGCG |
| AtSLAC1 RT | CATTCCACTTTTCGCCGACATC | TTTCCCTCGGTTTGGTCTCTC |
| AtALMT12 RT | CAAGACGAAGTGGATGGTTCTC | GGAAAGACCTACTTTAAGGGCA |
| pANIC7D_F | AGGTATGGAATTTTCGCCGAT | |
| MS_1391Z-GUS | GGGCGAACAGTTCCTGATTA | CGAAATATTCCCGTGCCTT |
| cola5'_largo_Ncol | CCATGGACCACCTGACGCCGGCG | CCATGGCGTGGGGTTCGGTCATGAG GC |
| AtbHLH_2 | CATCCTAGAAGCATCGCTGA | CCAGCATGTCTGAATAGCTTGT |
| p_ZmKS1_F_Sall | GTCGACCTCTGAAGCCGTTGATGC CATGC | |
| p_ZmKS1_R_BamHI | | GGATCCCATGGCTGCTGCCTGCCTGC GCG |
| pZmKS1_ct-interno | AGGCAGGCAGAGAGAGAGAG | GACTGTTGCTGTTGCTGCTC |
| C-ter-F2 | CGAATACGTCGGACATGTTG | |
| 3'UTR-R1 | | CTAGTCCGTGGAACAACCAA |
| C-ter-F1 | AGGGAAAGAAGGACGAGGAT | |
| C-ter-R2 | | CAGTTTGCTTGGCTGCTGTTT |
| C-ter-R3 | | CAGCAGCTCTTGTTCCTAG |
| ZmCiclo | GTGTGGATCTGTGAACCCCAT | CAGGTGAAACACGAATCAAGCA |
| actina2 | AAATCACAGCACTTGACCA | TGTGAACGATTCTGGACCT |
| Zm RAB17 | CGTCAAAGCCGTAATGTTCA | TTCAAGTAAAGCCACTCGCA |
| AtRD29B | GTTTCGGCCATATGTCATCGT | TGAATCAATCAAACCCTCTTTG |
| ZmKS2_EcoRI_F | GGAATTCATGGCGGCGACCGGAG GAG | |
| ZmKS2-R_XhoI_R | | CCTCGAGTCAGCAGCAGCAGCTCTTG TTG |
| ZmKS2_Ncol | CCATGGCGGCGACCGGAGGAGC | CCATGGCAGCTCTTGTTCCT |
| ZmKS1_Ncol | CCATGGACCACCTGACGCCGGC | CAACATGGACAAGGTACCATGG |
| N-ter_Ncol_R | | CCATGGCGGGTTCGGTCATGAGG |
| ZMOST-EcoRI | CCGAATTCATGGCAGGGCCGGCGC CG | |
| ZMOST-XhoI-R | | GGCTCGAGTCACATTGCGTATACAAT CTCAC |

6. MATERIALES Y METODOS

| | | |
|---------------------|-------------------------|------------------------|
| ZMOST-NcoI | CCATGCAGGGCCGGCGCCGG | CCATGGTGCGTACACAATCTC |
| ZmKS1_EcoRI | GAATTCATGAACCACCTGACGCC | GAATTCGCTTACCTTGCCATG |
| ZMOST-SalI-R | | GATTGTGTACGCAATGGTCGAC |

Métodos

6.2 Métodos de manipulación de ácidos nucleicos

6.2.1 Técnicas empleadas para el clonaje de DNA

El proceso de elaboración de una construcción implica la utilización de múltiples técnicas que a continuación se detallan.

6.2.2 Preparación de células competentes

6.2.2.1. Obtención de células competentes por choque térmico de *E. coli*

El protocolo seguido para la preparación de células competentes de *E.coli* para transformación por choque térmico es el descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

6.2.2.2 Obtención de células competentes de *A. tumefaciens* por choque

térmico

Procedimiento:

1. Inocular una colonia en 2 ml de medio YEB suplementado con rifampicina (Rf) y carbenicilina (Cb) y incubar O/N a 28°C en agitación a 250 rpm.
2. Inocular 50 µl del cultivo inicial en 50 ml de medio YEB-Rf-Cb e incubar a 28°C en agitación hasta que alcance una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,5-0,8.
3. Enfriar el cultivo en hielo durante 15-30 min.
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 4°C.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de solución A enfriada a 4°C.
6. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 4°C.

7. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de solución 20mM CaCl₂ enfriada a 4°C.

8. Hacer alícuotas de 50 µl, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C.

Solución A: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8.

6.2.2.3 Obtención de células de *A. tumefaciens* electro-competentes

Procedimiento:

1. Inocular una colonia en 2 ml de medio YEB+Rf+Cb y incubar O/N a 28°C en agitación a 250 rpm.

2. Añadir el pre-inoculo a 200ml de medio YEB-Rf-Cb y incubar a 28°C en agitación hasta que alcance una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,5-0,8.

3. Dejar enfriar el cultivo en hielo durante 15-30 minutos.

4. Centrifugar el cultivo a 4°C durante 20 minutos a 4000 rpm y descartar el sobrenadante.

5. Resuspender el pellet en 200 ml de agua estéril y fría a 4°C

6. Centrifugar durante 20 min a 4000 rpm y descartar otra vez el sobrenadante.

7. Resuspender el pellet en 4 ml de glicerol 10% (estéril y frío)

8. Centrifugar 20 min a 4000 rpm y volver a descartar el sobrenadante.

9. Finalmente, resuspender el pellet en 2 ml de glicerol 10% (estéril y frío), hacer alícuotas de 40- 50 µl, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C.

6.2.3 Transformación de células competentes

6.2.3.1 Transformación de células competentes de *Escherichia Coli* por choque

térmico

El cultivo de las bacterias transformadas en presencia del antibiótico adecuado se empleó para amplificar el DNA plasmídico o para la sobre-expresión de proteínas.

Procedimiento:

1. Dejar descongelar una alícuota de células competentes en hielo.

6. MATERIALES Y METODOS

2. Añadir 50-100 ng de DNA o el producto de ligación y mezclar suavemente.
3. Incubar el tubo en hielo durante 30 min.
4. Incubar 90 segundos a 42°C (choque térmico).
5. Enfriar de nuevo en hielo durante 2 min.
6. Añadir 1ml de medio LB y incubar 1 hora a 37°C a 250 rpm.
7. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 min a TA.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en el medio restante.
9. Sembrar la suspensión en placa con medio LB sólido + antibióticos y/o marcadores necesarios para la selección de células transformantes.
10. Incubar O/N a 37°C, en posición invertida.

6.2.3.2 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

por choque térmico

Esta bacteria se utilizó como vector para la transformación transitoria de hojas de plantas de tabaco en experimentos de agro-infiltración.

Procedimiento:

1. Dejar descongelar una alícuota de células competentes en hielo.
2. Añadir 1 µg de DNA y mezclar suavemente.
3. Incubar el eppendorf en hielo durante 5 min.
4. Congelar la muestra en nitrógeno líquido durante 5 min.
5. Transcurrido este tiempo, incubarla inmediatamente en un baño a 37°C durante 5 min.
6. Añadir 1 ml de medio YEB e incubar a 28°C en agitación a 250rpm durante 3-4 h.
7. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 min a TA.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en el medio restante.
9. Sembrar la suspensión en placa con medio YEB solido + Rif + antibiótico específico necesario para la selección de células transformantes.
10. Incubar las placas invertidas a 28°C y al reparo de la luz durante 2-3 días.

6.2.3.3 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

por electroporación

Procedimiento:

1. Dejar descongelar una alícuota de células electro-competentes en hielo.
2. Añadir 1-2 μ l de DNA plasmídico y mezclar suavemente y incubar en hielo durante 5-10 minutos
3. Transferir la mix de células y DNA en una cubeta para electroporación de 0,1 cm fría y previamente esterilizada (la esterilización se hace con lavados de etanol 70% y 100% y luego secada en campana de flujo laminar).
4. Electroporar a 1,7 kV. Añadir inmediatamente 1 mL de YEB frio sin antibióticos y pasar la mix a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml.
5. Incubar las células durante 2 horas a 28°C en agitación a 250 rpm.
6. Plaquear dos alícuotas de 50 y 100 μ l de cultivo en dos placas de YEB + Rif + antibióticos específicos para la selección y incubar la placas invertidas durante 2-3 días a 28°C.

6.2.4 Obtención de DNA genómico

Para la obtención de DNA genómico, se sigue el protocolo del kit comercial *Nucleospin® Food* (MACHERAY-NAGEL) utilizando el protocolo propuesto por la misma casa productora.

6.2.5 Obtención de DNA plasmídico

Para la obtención de DNA plasmídico, se sigue el protocolo del kit comercial *Plasmid Mini Kit* (QIAGEN®). Asimismo, para obtener mayores cantidades de DNA plasmídico se elaboraron *MaxiPreps con el QIAGEN® Plasmid Purification Kit*, usando el protocolo propuesto por la casa comercial (Ver *Handbook QIAGEN Plasmid Midi, Maxi, Mega, and Giga Kits. For purification of ultrapure plasmid DNA*).

6.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para elaborar construcciones, comprobar la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas.

Las enzimas DNA polimerasa termoestables empleadas fueron varias, entre ellas una sintetizada en el departamento (en este caso se utilizó un buffer 10X también producido en el departamento, receta más abajo). Entre las enzimas comerciales utilizadas se incluyen: *Pfu DNA Polymerase* (Stratagene), *Ex TaqTM Polymerase* (Takara), todas ellas con una baja tasa de error (*HF, high fidelity*).

Las condiciones de reacción generales se detallan a continuación, aunque en cada caso se modificaron la temperatura de emparejamiento (unos 2-5°C por debajo de la T_m del cebador con la T_m más baja), el tiempo de extensión (las DNA polimerasas incorporan aproximadamente 1 kb/min) o el número de ciclos para optimizar la amplificación. En algunos casos, para mejorar la eficiencia de la reacción y reducir o evitar la amplificación de bandas inespecíficas, a la mix de reacción se han añadido Betaina y/o DMSO (Henke et al., 1997). El volumen de reacción utilizado fue en la mayoría de casos de 50 μ l.

PCR: mix de base:

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| DNA molde | 100-500 ng |
| Buffer 10x | 5 μ l |
| dNTPs 10X | 5 μ l |
| DNA polimerasa | 1 μ l (1 unidad) |
| Primer Fw (10 μ M) | 2 μ l |
| Primer Rw (10 μ M) | 2 μ l |
| H ₂ O mQ estéril | Hasta 50 μ l |

PCR: ciclo de base:

| | | |
|----------------------------------|--------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 4-5 min a 94°C | |
| Amplificación : | | |
| Desnaturalización | 15-30 seg a 94°C | 25-35 ciclos |
| Emparejamiento | 30 seg a Tm °C (a) | |
| Extensión | X seg a 72°C (b) | |
| Extensión final | 5 min a 72°C | |

(a): generalmente se utiliza una temperatura 2°C inferior a la Tm del primer con Tm más baja.

(b): el tiempo de elongación depende de la longitud del fragmento; la *Taq* normalmente incorpora 1Kb/min.

Tampón PCR 10X: 0,2M Tris-HCl pH8, 0,5M KCl , 1%Triton X-100

6.2.7 Digestión enzimática del DNA plasmídico

La digestión con enzimas de restricción permite la verificación de la presencia del inserto en una construcción o la liberación del inserto mismo del plásmido.

El plásmido o construcción se digiere con una unidad de enzima para cada µg de DNA y el tampón recomendado por la casa comercial en un volumen total de 20µl. Las reacciones se incuban durante 2-3 horas a 37°C. En general, se utilizan unos 0,5-1 µg de DNA para digestiones de comprobación y hasta 5 µg para la purificación de fragmentos. Las enzimas que han sido empleadas durante este trabajo pertenecen a las casas comerciales Fermentas o Roche.

6.2.8 Electroforesis de fragmentos de DNA y RNA en gel de

agarosa

Los productos de PCR, los fragmentos resultantes de las digestiones se separaron en geles al 1-2% de agarosa (según el tamaño de las bandas que se querían resolver) disuelto en 1X TAE con un 0,05% de bromuro de etidio.

Para testar la calidad de las muestras de RNA se han utilizado geles así preparados con concentración de agarosa 1%.

Las muestras de DNA y RNA se cargaron en gel disueltas en tampón de carga colorante, y siempre junto a un marcador de peso molecular (generalmente λ PstI). La migración de los fragmentos se realiza normalmente a un voltaje de 80-100V en tampón 1X TAE, durante el tiempo necesario a la resolución de las bandas.

Tampón Tris-acetato-EDTA 20X (TAE): 0,8M Tris Base, 0,4M acetato sódico, 20mM EDTA pH 8.

Tampón de carga 6X: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol (v/v), 0,5M EDTA pH8.

6.2.9 Extracción y purificación de fragmentos de DNA,

reacción de ligación y recombinaciones

Tanto los productos de PCR como los fragmentos resultantes de las digestiones (tras la separación por migración de los mismos en gel de agarosa) se purificaron usando el *kit QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez purificados, los productos de PCR fueron ligados en los específicos plásmidos siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En el caso de los fragmentos de DNA digeridos, las ligaciones se realizaron en un volumen de 10 μ l y una unidad (1 μ l) de enzima T4 ligasa (Roche). Por regla general, la proporción de DNA de

inserto y vector empleada fue de 3:1. Las reacciones se incubaron a 4°C durante 14 horas.

Para los clones que fueron hechos utilizando vectores de tecnología Gateway de Invitrogen, las reacciones fueron llevadas a cabo con BP en el caso de un vector de entrada o con LR en caso de un vector de destino, siguiendo el protocolo proporcionado por Invitrogen.

6.2.10 Extracción de RNA total

El RNA de plantas y callos ha sido extraído utilizando dos kits comerciales: el Kit RNAeasy de Qiagen (un sistema manual basado en columnas de afinidad y lavados por centrifugaciones) y el Maxwell Simply RNA de Promega (un sistema semi-automático basado en micro-esferas magnéticas y lavados secuenciales).

Las extracciones se han llevado al cabo siguiendo los protocolos propuestos por las respectivas casas comerciales. Ambos permiten obtener RNA de alta calidad, ideal para experimentos como la PCRs cuantitativas.

En cada caso, la extracción se ejecuta a partir de material biológico (las cantidades máximas son definidas por las casas comerciales de los kits), precedentemente congelado en nitrógeno líquido y finamente triturado manualmente en mortero o por medio del aparato *Tissue-Lyser* de Qiagen (en este último caso añadiendo dos perlas de vidrio (\varnothing 4mm, casa Merck) a un tubo eppendorf de 2 ml con la muestra, y agitando dos veces 1 min con una frecuencia de 30 seg^{-1}).

6.2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se ha realizado por espectrofotometría utilizando un *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* y el programa informático ND-1000 V3.1.0 (*NanoDrop Technologies Inc.*).

6.2.12 Elaboración de cDNA

Para la elaboración del cDNA se usaron las muestras de RNA obtenidas como se indica en el apartado anterior y el *Kit QuantiTect® Reverse Transcription*, siguiendo el protocolo de QIAGEN (*Handbook For cDNA synthesis with integrated removal of genomic DNA contamination. For use in real-time two-step RT-PCR*).

6.2.13 PCR cuantitativa/ Real time PCR

Las PCR cuantitativas en tiempo real (qPCR) se han realizado a partir de diluciones 1:10 de cDNA por medio del dispositivo Roche Light Cycler® 480 y utilizando el protocolo estándar para la enzima de Roche.

De cada muestra se han hecho tres réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas, y se muestra el error estándar calculado a partir de la media de estos datos. Los resultados son normalizados respecto a muestras controles y utilizando los valores cuantificados de genes constitutivos *house-keeping* (Actina2 para *Arabidopsis* y Ciclofilina para maíz) para normalizar las muestras. El volumen de reacción es 10µl.

Mix de reacción para qPCR:

| | |
|-------------------------|--------|
| cDNA | 2 µl |
| Roche Light Cycler® 480 | 5 µl |
| SYBR Green I master MIX | |
| Primer Fw (10µM) | 0,3 µl |
| Primer Rw (10µM) | 0,3 µl |
| H2O | 2,4 µl |

La cuantificación y el análisis de los datos han sido realizados utilizando el programa propio del aparato (Roche Light Cycler® 480 (versión 1.5.OSP3)) y Microsoft Excel.

6.3 Métodos de manipulación de proteínas

6.3.1 Obtención de extractos proteicos vegetales

Se obtuvieron extractos proteicos de *Arabidopsis* (generalmente de plántulas de 8-9 días en caso contrario se especifica en cada experimento), según como descrito en el procedimiento:

Procedimiento:

1. Triturar el tejido vegetal (congelado con nitrógeno líquido) manualmente en mortero o por medio del aparato *Tissue-Lyser* de Qiagen (en este último caso añadiendo dos perlas de vidrio (\emptyset 4mm, casa Merck) a un tubo eppendorf de 2 ml con la muestra, y agitando dos veces 1 min con una frecuencia de 30 seg^{-1}).

2. Transferir el material pulverizado a un eppendorf; en caso se haya utilizado el *Tissue-Lyser* el material ya se encuentra en eppendorf.

3. Añadir tampón de extracción, aproximadamente un tercio del volumen de material pulverizado, y vortexar durante 1 min.

4. Centrifugar a 13000 rpm durante 15-20 min a 4°C.

5. Recuperar el sobrenadante y, en caso siga habiendo material sólido disperso en el extracto, repetir la centrifugación.

6. Cuantificar el extracto si se va a usar en el momento o alicuotar en tubos y guardar a -80°C. En este caso, en el momento en que se utilice, descongelar en hielo y cuantificar después de centrifugarlo a 13000 rpm durante 5 min a 4°C.

Tampón de extracción de proteínas: 50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM DTT, 10 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 50 mM β -glicerolfosfato, 1 mM PMSF, 1 μM pepsatina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina.

6.3.2 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método estándar descrito por Bradford (Bradford, 1976). Su rango de detección varía entre 1-20 µg/ml y se basa en el cálculo de una recta de regresión a partir de una serie de diluciones de concentración conocida y la posterior extrapolación de la muestra en análisis.

6.3.3 Inmunoprecipitación de proteínas

La quinasa ZmOST1 se inmunoprecipitó a partir de extractos crudos de plántulas de *Arabidopsis* de 8-9 días como se describe en el apartado 6.3.1, pero utilizando como buffer de extracción el mismo tampón de inmunoprecipitación, IPB.

Protocolo:

1. Incubar en rotación a 4°C durante 4 h o O/N el extracto proteico (de partida, todas la muestras deben contener la misma cantidad de proteínas totales, entre 300-1500 µg) con 1-2 µl del anticuerpo específico para la ZmOST1.
2. Preparar la resina *Protein-A-sepharose CL-4B* (GE Healthcare) siguiendo el protocolo definido por la casa productora.
3. Añadir 40 µl de resina compactada a la muestra i incubar en rotación a 4°C durante 3-4 h.
4. Lavar la muestra + resina con 300-500 µl de IPB y centrifugar durante 1 min a máximo 500 rpm, luego descartar el sobrenadante.
5. Repetir el paso 4 3veces.
6. Añadir 30 µl de tampón de carga para proteínas y hervir durante 3 minutos.
7. La muestra se mantiene en hielo hasta el momento de ser cargada en gel SDS-PAGE para separar los inmunoprecipitados. Para este fin, la muestra se debe centrifugar durante unos 10 min a máxima velocidad y entonces se cargan en el gel unos µl del sobrenadante.

Todos los pasos, además de las incubaciones, se deben hacer manteniendo las muestras y reactivos en hielo.

Tampón de inmunoprecipitación (IPB): 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 10 mM β-glicerolfosfato, 1 mM PMSF, 1 μM pepstatina, 2 μg/ml aprotinina, 2 μg/ml leupeptina, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5 % Nonidet NP40.

Anticuerpo anti-ZmOST1: producido anteriormente en nuestro laboratorio (tesis Alicia Moreno Cortés).

Tampón de carga para proteínas 2X: 125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,04% azul de bromofenól; 0,1M DTT

6.3.4 Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE

Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE), que tienen de un gel concentrador (gel superior) y un gel separador (gel inferior). El protocolo seguido fue el descrito en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook & Russell, 2001) utilizando los sistemas *Miniprotean Gel-2* y *3* (Biorad). Generalmente se ha utilizado un porcentaje de poliacrilamida del gel separador del 13% y un espaciador de 1,5 mm, en caso contrario se especifica en cada experimento. El voltaje utilizado fue de 80-100 V.

Lower Buffer: 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 0,4% SDS

Upper Buffer: 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,4% SDS

Tampón de electroforesis 10X: 1,92 M glicina; 0,25M Tris HCl, pH8,3; 1% SDS

6.3.5 Tinción de Coomassie

La tinción de los geles se ha efectuado con una solución de azul de *Coomassie* durante 20 minutos a temperatura ambiente y para des-teñir se ha utilizado una solución de etanol/ácido acético/agua (30:10:60), hasta poder ver las bandas de proteínas.

Solución de Coomassie: 50% (p/v) ácido tricloroacético; 0,45% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma)

6.3.6 Western Blot

6.3.6.1 Transferencia de proteínas y tinción con Ponceau

La transferencia de las proteínas separadas en gel SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa se ha realizado con el aparato *Transfer Blot Semidry* (Bio-Rad), durante 45 min y con un amperaje constante de 20V/gel. La transferencia se realiza con los elementos en el siguiente orden (de arriba hacia abajo):

- papel *Whatman* 3MM
- gel de poliacrilamida
- membrana de nitrocelulosa
- papel *Whatman* 3MM

todos se embebe en tampón de transferencia.

Una vez terminada la transferencia, las membranas se tiñen con solución *Ponceau* (paso facultativo; sirve para comprobar la correcta transferencia de las proteínas), sumergiendo las membranas en esta solución durante 1 minuto en agitación suave. Una vez chequeado que la transferencia haya tenido lugar correctamente, se limpia el exceso de *Ponceau* con 2-3 lavados en agitación ligera con solución PBS-T. Luego, las membranas se bloquean con leche diluida en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en este punto se pueden dejar secar sobre papel de filtro y guardar a TA o proseguir con la hibridación con el anticuerpo de interés.

Solución de Ponceau: 0,1% Ponceau disuelto en 1% (v/v) ácido acético.

Tampón fosfato salino 20X (PBS): 64 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 26 mM KCl, 0,27 M NaCl, pH a 7,5 (ajustar con NaOH 1N)

PBS-T: 0,1% Tween 20 disuelto en 1X PBS

Solución de bloqueo: 5% leche desnatada en polvo disuelta en PBS-T

6.3.6.2 Hibridación y inmunodetección mediante ECL

Protocolo:

1. Incubar la membrana en solución de bloqueo durante 1 h a TA y en agitación suave.
2. Añadir la dilución de anticuerpo primario adecuada a la solución de bloqueo y incubar O/N a 4°C en agitación ligera.
3. Realizar 3 lavados de 10 min en 1X PBS-T.
4. Añadir la dilución de anticuerpo secundario adecuado a la solución de bloqueo e incubar 1 h a TA.
5. Realizar 3 lavados de 10 min en 1X PBS-T y dejar la membrana en PBS-T hasta ser revelada utilizando el equipo LAS 4000.
6. Eliminar el exceso de PBS-T de la membrana y apoyarla en un soporte de plástico de forma que la superficie donde están las proteínas quede hacia arriba.
7. Mezclar los dos reactivos del kit de detección ECL (Amersham) en relación 1:1 (1 ml de mezcla por membrana), y repartirla sobre la membrana con la ayuda de la pipeta, luego poner una hoja de plástico transparente por encima.
8. Colocar la membrana dentro del LAS 4000, seleccionar las condiciones de preferencia (para la detección del anticuerpo fueron: Chemiluminescent, incremento cada 10 segundos; para obtener la imagen del marcador de color: White, precisión 1:100 de segundo)
9. Capturar las imágenes, sobreponerlas para identificar el tamaño de las bandas detectadas con el anticuerpo.

6.3.7 Obtención de proteínas recombinantes

En la presente tesis fueron producidas dos tipos de proteínas recombinantes: unas fusionadas a una etiqueta de 6×His (His-tag) y otra fusionada a MBP (MBP-tag). Las primeras sirvieron para el estudio de actividad quinasa *in vitro* e *in vivo*, y la segunda para realizar el SELEX. En ambos casos la sobre-expresión se llevó a cabo en la cepa bacteriana *E. coli* BL21 Rosetta.

6.3.7.1 Sobreexpresión de proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis o MBP

en E. coli BL21 Rosetta

Inicialmente se transforma una alícuota de células competentes de *E. coli* BL21 Rosetta por choque térmico con la construcción de interés (en el vector pET28a para HIS-tag o vector pETM40 para MBP-tag) y se seleccionan las colonias positivas creciendo en placas de LB + Chloranfenicol 34µg/ml + el antibiótico necesario para la selección del vector. Sucesivamente se procedió a su expresión.

Protocolo:

1. Inocular una colonia de *E. coli* BL21 Rosetta en 5 ml de medio LB con los antibióticos para la selección y incubar a 37°C en agitación a 250 rpm O/N.

2. Inocular el pre-cultivo inicial en 500 ml de medio LB + antibióticos y incubar a 37°C en agitación hasta que alcance una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,6-0,8 (aproximadamente 2-3 h).

3. Tomar una muestra del cultivo de 1 ml para su posterior análisis (T0, será el control antes de la inducción).

3. Inducir la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0,5-1 mM.

4. Continuar el cultivo durante 5-7 h más. Tomar una muestra del cultivo de 1 ml (T1).

5. Al cabo de este tiempo centrifugar el cultivo a 8000 rpm durante 15 min a 4°C.

7. Descartar el sobrenadante y guardar el pellet bacteriano a -20 °C para su posterior purificación.

En el caso de la expresión de proteína ZmKS2 fusionada a MBP, no fue necesario llegar al paso de la purificación, debido a que esta expresión se llevó a cabo con el fin de obtener pellet para enviarlo al CNB-Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, donde nos realizaron un análisis SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) para identificar las secuencias nucleotídicas reconocidas por el TF ZmKS2. En este caso nos limitamos a chequear que la expresión había tenido lugar.

Protocolo:

1. Centrifugar los tubos T0 y T1 por 2-3 min a máxima velocidad

2. Descartar el sobrenadante y añadir 20 µl de tampón de carga 2X

3. Hervir 10 min a para lisar las células.

4. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 min.

5. En un gel SDS-PAGE (ver más adelante “Electroforesis de proteínas”) cargar en un pocillo el marcador de proteínas y, en los siguientes, 5-10 µl del sobrenadante de T0 y de T1

6. Teñir con coomassie, desteñir y chequear que la banda correspondiente a la proteína recombinante resulte aumentada en la muestra T1.

Tampón de lisis: 20 mM Tris-HCl pH 7,9; 0,5 M NaCl.

Tampón de carga para proteínas 2X: 125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,04% azul de bromofenól; 0,1M DTT

6.3.7.2 Extracción y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a

6xHis

Las proteínas clonadas en el vector pET28a se expresan como proteínas de fusión con el marcador His-Tag en su extremo N-terminal.

El sistema utilizado para su purificación es la cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados, que se basa en la interacción entre iones metálicos transitoriamente quelatos y las cadenas laterales de algunos aminoácidos (principalmente Histidina).

El Ni^{2+} es el ión metálico principalmente utilizado para la purificación de proteínas HIS-tag: el tag de 6xHis interacciona con el Ni^{2+} presente en la resina, que seguidamente se eluye con una solución que contiene imidazol. Este sustituye al HIS-tag en la interacción con el Ni^{2+} y la proteína resulta así liberada de la resina.

Protocolo:

A. Extracción de proteínas del pellet bacteriano.

1. Resuspender el pellet bacteriano en 20 ml de tampón de lisis con 1 mg/ml de lisozima, los inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 µM pepsatina, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina) y también 20 mM imidazol (esto se añade para

aumentar la especificidad de unión de la proteína recombinante a la resina en los siguientes pasos de purificación).

2. Incubar en hielo durante 30 min- 1 hora.
3. Sonicar 3x45 seg manteniendo la muestra en hielo (potencia 4-5, al 50-60%).
4. Centrifugar durante 45 min a 8000 rpm a 4°C.
5. Recuperar el sobrenadante guardarlo a 4°C hasta el momento de la purificación.

B. Preparación de la resina NiSO₄-sefarosa y elución de las proteínas recombinantes fusionadas a 6×His.

1. Depositar 1 ml de resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Biosciences) en una columna (*Poly-Prep® Chromatography* de BioRad).
2. Lavar la resina con 10 ml de agua destilada.
3. Cargarla con 3 ml de tampón de carga.
4. Equilibrar con 10 ml de tampón de lisis + 20 mM imidazol.
5. Filtrar el lisado obtenido en el apartado anterior (unos 20 ml) con Miracloth.
6. Verter el lisado en la columna y recoger el “flow-through”.
7. Lavar con 10-20 ml de tampón de lisis + 20 mM imidazol y 5 ml de tampón lisis + 60 mM imidazol. Recoger las fracciones. (Trabajar a 4°C)
8. Eluir con 2 ml de cada tampón de elución con concentraciones crecientes de imidazol: 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM. Recoger las fracciones (trabajar a 4°C).
9. Analizar 5-10 µl de cada una de las fracciones recogidas por SDS-PAGE y tinción de Comassie.
10. Conservar las fracciones más enriquecidas con la proteína recombinante y someterlas a dos rondas de diálisis a 4°C y en 1 l de solución con 20 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M NaCl, luego concentrarlas por medio de apósitos filtros para concentrar soluciones biológicas por medio de centrifugaciones (*Centrifugal filter units*, Millipore). Para guardar las proteínas a largo plazo, efectuar la segunda ronda de diálisis en solución 20 mM Tris-HCl pH 8, 55% de glicerol durante 3 h, y guardar a -20 o -80°C.

Tampón de carga: 200 mM NiSO₄.

Tampones de lavado: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, entre >20 y <100 mM imidazol.

Tampones de elución: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, entre 100 mM y hasta 0,5 M imidazol .

6.3.8 Ensayos de fosforilación

Se realizaron dos tipos de ensayos de fosforilación: ensayos quinasa en tubo (*in vitro*) y ensayos quinasa en gel.

6.3.8.1 Ensayo quinasa *in vitro*

Con el ensayo quinasa en tubo se comprobó la capacidad de la quinasa (ZmOST-HIS) de fosforilar *in vitro* los TFs bHLH corto y largo (fosforilación *in vitro*).

Los sustratos utilizados fueron las proteínas recombinantes enteras (ZmKS2-HIS y ZmKS1-HIS), dos fragmentos de la isoforma corta (ZmKS2.A-HIS y ZmKS2.B-HIS) y la zona N-terminal del ZmKS1 (N-ter-HIS).

Todas las proteínas recombinantes utilizadas para este ensayo fueron purificadas después de haber sido expresadas en *E. coli*.

Protocolo:

500 ng de proteína quinasa ZmOST1-HIS

1. En un volumen final de 15 μ l se mezclan 500 ng de proteína quinasa, 500 ng de proteína sustrato, 3 μ l de 5X tampón quinasa, 30 μ M de ATP frío y 5 μ Ci de [γ -³³P]-ATP.

2. Incubar 30 min a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 15 μ l de 2X tampón de muestras.

3. Separar las proteínas en un gel SDS-PAGE

4. Secar el gel con una bomba de vacío y ponerlo en contacto con una pantalla de *Phosphorimager*.

5. Tras 1-2 días de contacto del gel con la pantalla, esta se revela utilizando el equipo STORM que permite capturar la imagen.

6. La análisis de la imagen se efectúa utilizando el programa ImageJ.

Tampón quinasa 5X: 100 mM HEPES pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 125 mM glicerolfosfato, 25 mM NaF, 5 mM DTT.

6.3.8.2 Ensayo quinasa en gel

El ensayo quinasa en gel permite analizar la actividad de transfosforilación de las proteínas quinasas nativas, presentes en extractos crudos o bien inmunoprecipitadas a partir de los mismos extractos crudos con un anticuerpo, frente a cualquier proteína. Los IPs también se pueden emplear para realizar ensayo quinasa en tubo, pero la ventaja de hacerlo en gel es que las bandas detectadas (que corresponden al sustrato marcado), indican la posición de las quinasas responsables de su fosforilación. En cambio, con el ensayo quinasa en tubo es difícil asegurar que la proteína quinasa inmunoprecipitada es la responsable de su fosforilación o lo es alguna otra, arrastrada con la inmunoprecipitación.

6.3.8.2.1 Preparación del gel SDS-PAGE copolimerizado con ZmKS2.

Los geles SDS-PAGE se prepararon como se indica en el apartado 2.2.3.3, con la diferencia de que antes de añadir el APS y el TEMED, se deben incorporar hasta 0,25 mg/ml de proteína sustrato de quinasa y mezclar bien para conseguir que el sustrato quede uniformemente repartido. Para este trabajo se polimerizaron en el gel 0,800 mg de la proteína ZmKS2-HIS expresada en *E. coli*, purificada y concentrada como descrito en el apartado 6.3.8)

Para reducir el volumen de los geles, éstos se prepararon con un espesor de 1 mm. Se debe utilizar un marcador de peso molecular visible, que permita controlar la migración de las proteínas y el tamaño de las bandas que resultarán marcadas radioactivamente al final del experimento.

6.3.8.2.2 Renaturalización y reacción de fosforilación

Una vez finalizada la electroforesis del gel SDS-PAGE copolimerizado con la proteína ZmKS2-HIS, se siguen los pasos descritos a continuación.

Protocolo:

6. MATERIALES Y METODOS

1. Realizar tres lavados de 30 min cada uno con 50 ml de tampón A en agitación ligera a TA, para eliminar el SDS.

2. Empieza el proceso de renaturalización de las proteínas por medio de tres lavados cada uno con 50 ml de tampón B, los dos primeros de 30 min y el último O/N, en agitación ligera a 4°C.

3. Antes de iniciar la reacción, el gel se lava con 50 ml de tampón C durante 30 min en agitación ligera a TA.

4. Sumergir el gel en 10 ml de tampón C suplementado con 250 nM de ATP frío y 50 μ Ci de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, en el que se incuba durante 1 h en agitación ligera a TA.

5. El $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ no unido covalentemente a las proteínas se elimina realizando 5-8 lavados de 30 min cada uno con 50 ml de tampón D, en agitación ligera a TA. Con estos lavados se determina también la fijación de las proteínas al gel.

6. Secar el gel con una bomba de vacío y exponerlo durante 3-5 días en una pantalla de *Phosphorimager*.

7. Capturar la imagen utilizando el equipo STORM y analizar la imagen utilizando el programa ImageJ.

Tampón A (Washing Buffer): 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, 0,5 mg/ml BSA, 1% Triton X-100.

Tampón B: 25 (Renaturation Buffer): mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF.

Tampón C (Reaction Buffer): 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 0,1 mM Na_3VO_4 , 12 mM MgCl_2 .

Tampón D: 5% TCA, 1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

6.3.9 Ensayo de interacción proteína-proteína mediante el sistema de complementación Bimolecular (BiFC)

El cDNA de ZmKS2, ZmKS1 de ZmOST1 y de diferentes dominios de ZmOST1 se han clonado en el vector pENTRY3C (<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>), (López-Paz et al., 2009). Luego,

los plásmidos pENTRY3C se han transferido en los vectores GATEWAY modificados pYFC43 y pYFN43 (descritos también en <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>) para expresar cada proteína fusionada al fragmento C- o N-terminal (YFP^C o YFP^N) de la *Yellow Fluorescent Protein*.

Estas construcciones fueron transfectadas mediante la técnica de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. La detección de la YFP se hizo con el microscopio Confocal Leica.

6.3.10 Técnica de Evolución Sistemática de Ligandos por

Enriquecimiento Exponencial (SELEX)

Este análisis permite identificar las secuencias nucleotídicas reconocidas por un TF. En nuestro caso el experimento fue realizado por colaboración con el CNB-Centro Nacional de Biotecnología de Madrid, les enviamos directamente la proteína ZmKS2-MBP expresada en *E. coli*.

6.4 Métodos de plantas

6.4.1 Obtención y transformación transitoria de protoplastos de maíz

6.4.1.1 Obtención de protoplastos de maíz

Los protoplastos de maíz se obtuvieron a partir de plantas etioladas de la variedad MO17xB73 de 11-13 días.

El protocolo utilizado es el descrito por Kengo Moroashi (Morohashi et al., 2012) con algunas modificaciones.

Protocolo:

1. Cortar muy finamente las 2ª y 3ª hojas de plantas etioladas de 11-13 días de la variedad MO17xB73.

2. Empezar la digestión las tiras de hojas incubándolas durante 15 min en bomba de vacío en 10 ml de buffer A suplementado con 3% celulasa onozuka, 0.6% macerozyme R10 (Yakult Honsha Co.), 5 mM CaCl₂ y 0,1% (peso/volumen) BSA.

3. La digestión sigue con 2,5 horas de agitación ligera a 50 rpm a 28°C en oscuridad.

4. Agitar durante 30 min a 90 rpm para que se liberen los protoplastos.

5. Filtrar la solución en un tubo Falcon de 50 ml a través de filtros de nylon mesh 35-µm.

6. Lavar los protoplastos recolectados con 10 ml de Buffer A y centrifugar a 1000 rpm durante 2 min. Descartar el sobrenadante.

7. Repetir una vez el paso 6. Cada vez para resuspender los protoplastos agitar manualmente, no vortexear.

8. Resuspender los protoplastos en 1 ml de Buffer A.

9. Chequear calidad y cantidad de los protoplastos por medio microscopio Aixophot DP70 y una cámara de Malassez.

10. Ajustar el volumen de Buffer A para obtener una concentración de protoplastos de 1×10^5 protoplastos/ml.

11. Guardar los protoplastos en hielo hasta la transformación.

Buffer A: 0,6 M Mannitol; 10 mM KCl; 10 mM MES, pH 5,7.

6.4.1.2 Transformación transitoria de protoplastos por electroporación

La electroporación se ha realizado sobre $1-2 \times 10^5$ protoplastos por transformación con 20 µg totales de DNA plasmídico (100 V/cm, 200 µF) por medio del aparato Biorad Gene Pulser II, alta capacidad.

Después de la electroporación, los protoplastos se incuban 24 h a TA antes de ser analizados al microscopio confocal Leica para ver la expresión de la GFP o de la YFP (según el tipo de experimento).

6.4.2 Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

Este tipo de ensayo ha sido llevado al cabo para dos fines: averiguar en que compartimento celular se localizan las proteínas ZmKS2 y ZmKS1 y para llevar a cabo experimentos de complementación bimolecular y chequear la capacidad de homo- y heterodimerización de estos TFs entre ellos mismos y con la quinasa ZmOST1. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada es la EHA105 (para transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana*), transformada con construcciones que permiten la expresión de las proteínas bajo control del promotor constitutivo 35S CaMV.

Para el experimento de localización sub-celular, el cDNA entero de ZmKS2 y ZmKS1 se ha clonado en el vector pPK100 que permite expresar cada proteína fusionada con la *green fluorescent protein* (GFP) y luego el cassette con la secuencia de interés se ha digerido por restricción y luego clonado en vector binario pCambia1300.

Para el ensayo de BiFC, las construcciones utilizadas son las descritas en el apartado 6.3.10.

Nicotiana benthamiana ha sido transformada de forma transitoria co-agroinfiltrando estas construcciones con otra para 35S::HCPro, que permite inhibir el silenciamiento génico en tabaco (Dunoyer et al., 2004).

Protocolo:

1. Preparar cultivos en tubos Falcon de 50 ml inoculando 30 ml de medio YEB + Rif +antibióticos del vector con la cepa de *Agrobacterium* portadora de las construcciones. Incubar en agitación a 28°C O/N en agitación a 250 rpm.
2. Medir la DO₆₀₀: el óptimo es que los cultivos lleguen a tener un valor cerca a uno.
3. Centrifugar 10 min a 3500 rpm.
4. Descartar el sobrenadante y secar las paredes internas de los tubo, de forma de eliminar la máxima cantidad posible de YEB + antibióticos.
5. Resuspender el pellet en una cantidad de solución de inducción para llegar a tener una DO₆₀₀=2 (no vortexear) y incubar a TA durante 2 horas
6. Preparar la solución para agroinfiltrar pipeteando en tubo eppendorfs de 2 ml cantidades iguales de la solución con la construcción de interés y la solución para el HC-Pro (en caso de ensayo de BiFC, se pondrán siempre en partes iguales la solución para el HC-Pro con las dos con las construcciones en pYFC43 y pYFN43).
7. Agroinfiltrar con una jeringa de 2 ml en la parte inferior de las hojas de tabaco.
8. Después de 2-3 días la detección de GFP o de YFP se hizo con el microscopio Confocal Leica.

Solución de Inducción (cantidades para 200ml): 2 ml MgCL₂ 1M; 2ml MES 1M pH 5,6; 200 µl acetosiringona 0,2 M, 196 ml H₂O mQ.

6.4.3 Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*

thaliana

6.4.3.1 Transformación por “floral dip”

La transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo por medio del método “floral dip” (Clough & Bent, 1998), con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* portador de la construcción de interés.

Protocolo:

1. Sembrar 6 tiestos (\varnothing 11,5 cm) con sustrato mezcla y cubiertos con una rejilla, con 8-10 semillas en cada uno.

2. Vernalizar para romper la dormancia manteniendo a 4°C durante 3 días, luego pasar los tiestos en invernadero y crecer unas 6 semanas, hasta que las plantas empiecen a florecer. Cortar en ese momento los tallos, a la altura de las rosetas. De esta forma se elimina la dominancia apical y se estimula la ramificación y el desarrollo de más inflorescencias. Desde el momento del corte, las plantas necesitan 5-6 días para estar en el estado óptimo para el “floral dip” (es importante que las flores sigan cerradas).

3. Dos días antes de la transformación, inocular 2 ml de medio YEB +Rif + antibióticos adecuados con la cepa de *Agrobacterium* portadora de la construcción, y incubar a 28°C O/N en agitación a 250 rpm.

4. Inocular 500 ml de YEB + antibióticos adecuados (la Rifampicina en este segundo cultivo no se pone) y incubar a 28°C O/N en agitación a 250 rpm.

5. Centrifugar a 3500 rpm durante 15 min a 5-6°C y descartar el sobrenadante.

6. Resuspender las células en 250 ml de una solución 5% de sacarosa y dejar reposar 20 min.

7. Justo antes de sumergir las plantas, añadir a la suspensión de células 75 μ l de Silwet L77 (0,03%).

8. Transferir la suspensión a un vaso de precipitados de 500 ml y sumergir las inflorescencias 2 veces durante 2 min. Se recomienda regar las plantas antes de la transformación, para que en caso de que el sustrato entre en contacto con la suspensión, éste no la absorba.

9. Tumbiar los tiestos sobre un papel de filtro en una bandeja, y cubrirla con plástico transparente. Luego transferir la bandeja en invernadero, manteniendo las plantas durante un par días protegidas de una exposición directa a la luz.

10. Transcurrido este tiempo, retirar el plástico y el papel de filtro, poner las plantas en posición vertical y continuar con el cultivo normal en el invernadero.

6.4.3.2 Selección de las plantas transformadas

Las semillas recogidas de las plantas transformadas mediante “floral dip” constituyen la generación (T0). Aproximadamente un 1-5% son portadoras del transgén en hemigiosis/ heterogiosis.

Protocolo:

1. Sembrar 1000-2000 semillas 0,5X MS + 1% de sacarosa + el antibiótico adecuado (el definido por el vector con que se ha transformado) + Timentina Cefotaxima.

2. Las plántulas resistentes se pasan a tierra y se crecen en el invernadero para obtener una nueva generación de semillas (T1).

3. De las plantas T1 sembrar semillas en medio 0,5X MS + 1% de sacarosa + antibiótico del vector, luego pasar a tierra y crecer en invernadero hasta obtener una nueva generación de semillas (T2).

4. De las líneas T2 sembrar unas 20-30 semillas en medio 0,5X MS + 1% de sacarosa + antibiótico del vector. Se seleccionaron solo aquellas líneas que no segregaban (100% Resistentes), o sea las homocigóticas, y que llegaban a tener hojas verdaderas.

6.4.4 Ensayos realizados con plantas transgénicas de

Arabidopsis

6.4.4.1 Ensayo de germinación

El ensayo de germinación se ha realizado con semillas de las líneas de *Arabidopsis* procedentes del tipo salvaje Ler, del mutante alélico *ost1-2*, de la línea complementada C2 y de las líneas transgénicas de sobreexpresión de ZmKS2 y ZmKS1 de maíz (fusionadas a GFP) en fondos Ler, *ost1-2* y C2. Las semillas empleadas vienen de plantas crecidas todas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Para las líneas transgénicas se utilizaron semillas T3 (homocigotas)

En cada experimento se sembraron 50 semillas (n=2) utilizando una cuadrícula y en placas con la misma cantidad de medio (25 ml) para evitar variaciones espaciales.

Al cabo de 3, 4, 5 y 8 días se contaron las semillas que germinaron con la ayuda de una lupa; como parámetro de germinación se consideró la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla.

La preparación de los medios y las condiciones de cultivo se indican en el apartado 6.1.1.1. Las condiciones de germinación probadas han sido 150 mM NaCl, 350 mM Mannitol y 1,5 μ M ABA, mas el control (0,5X MS).

6.4.4.2 Ensayo de pérdida de agua

El ensayo de pérdida de agua se ha realizado con las líneas de *Arabidopsis* procedentes del tipo salvaje Ler, del mutante alélico *ost1-2*, de la línea complementada C2 y de las líneas transgénicas de sobreexpresión de ZmKS2 y ZmKS1 de maíz (fusionadas a GFP) en fondos Ler, *ost1-2* y C2.

Las rosetas de plantas crecidas en short-day (8 h luz/ 16 h oscuridad) durante 15-20 días fueron cortadas de las raíces y pesadas durante 1,5 h y pesadas a intervalos regulares con balanza de precisión. Para cada línea se realizaron varias replicas (6-9 rosetas) y se calculó la pérdida de agua respecto al peso fresco inicial.

Durante el experimento, la temperatura se mantuvo a unos 25°C y se evitaron las corrientes de aire (aire acondicionado apagado, puertas cerradas).

Los datos recogidos han sido luego analizados utilizando el programa Excel de Windows.

6.4.4.3 Ensayo de cierre estomático

El ensayo de cierre de estomas se ha realizado con las líneas de *Arabidopsis* procedentes del tipo salvaje Ler, del mutante alélico *ost1-2*, de la línea complementada C2 y de las líneas transgénicas de sobreexpresión de ZmKS2 y ZmKS1 de maíz (fusionadas a GFP) en fondos Ler, *ost1-2* y C2.

Protocolo:

1. Hojas de rosetas de plantas crecidas en short-day durante 15-20 días se han sumergido en solución de abertura de estomas durante 2 h bajo luz blanca

fluorescente ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-2}$). (De cada línea se han preparado 2 tubos, uno como control y uno para luego realizar el tratamiento).

2. Terminadas las 2 h, en el tubo del tratamiento se añade ABA a la solución hasta una concentración de $1 \mu\text{M}$, y se dejan durante otras 2 h bajo luz blanca fluorescente.

3. Se hace un “peeling” de la parte abaxial de las hoja utilizando pinzas sutiles, y se monta la epidermis en un porta con la misma solución (la sin ABA para el Ct, la con ABA para el tratamiento), se pone el cubre-objetos y se observa al microscopio Zeiss AxioPhot.

4. Se sacan fotos de la epidermis por medio de la cámara Olympus DP70 unida al microscopio.

5. Utilizando el programa ImageJ, se miden los valores de ancho y largo de 50-100 estomas por cada línea (condición control y tratamiento): la abertura de los estomas se calcula como el ratio ancho/largo del poro.

Solución de abertura de estomas: 50 mM KCl; 10 mM MES; pH 6,15

6.4.4.4 Ensayo de abertura estomática

El ensayo de abertura de estomas se ha realizado con las líneas de *Arabidopsis* procedentes del tipo salvaje Ler, del mutante alélico *ost1-2*, de la línea complementada C2 y de las líneas transgénicas de sobreexpresión de ZmKS2 y ZmKS1 de maíz (fusionadas a GFP) en fondos Ler, *ost1-2* y C2.

Protocolo:

1. Hojas de rosetas de plantas crecidas en short-day durante 15-20 días se han sumergido en agua mQ durante 1 h en oscuridad. (De cada línea se han preparado 2 tubos, uno como control y uno para luego poner el tratamiento).

2. Terminado este tiempo, en el tubo del tratamiento se añade Fusicoccina hasta una concentración de $10 \mu\text{M}$ y se mueven todos los tubos durante 2 h bajo luz blanca fluorescente ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-2}$).

3. Se hace un “peeling” de la parte abaxial de las hojas utilizando pinzas sutiles y se monta la epidermis en un porta con la misma solución (H₂O para el Ct, H₂O + Fc para el tratamiento) se pone el cubre-objetos y se observa al microscopio Zeiss AxioPhot.

4. Se sacan fotos de la epidermis por medio de la cámara Olympus DP70 unida al microscopio.

5. Utilizando el programa ImageJ, se miden los valores de ancho y largo de 50-100 estomas por cada línea (condición control y tratamiento): la abertura de los estomas se calcula como el ratio ancho/largo del poro.

6.4.4.5 Ensayo de Floración

El ensayo de floración se ha realizado con las líneas de *Arabidopsis* procedentes del tipo salvaje Ler y con las líneas transgénicas de sobreexpresión de ZmKS2 y ZmKS1 de maíz (fusionadas a GFP) en el mismo fondo (Ler).

Protocolo:

1. Poner a vernalizar las semillas en tubos eppendorf de 1,5 ml durante 3 días a 4°C.

2. Preparar 20-22 tiestos (∅ 5cm) por cada línea solo con tierra y sembrar 4-5 semillas en cada uno y poner a crecer en cámara de crecimiento a 21°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad

3. Cuando las semillas empiezan a germinar, dejar solo una plántula por maceta.

4. Para cada planta, en el momento en que aparece el botón floral tomar nota del número de días desde que las macetas han sido puestas en la cámara de cultivo y del número de hojas de roseta y caulinares.

5. Los datos han sido tratados por medio del programa Excel.

6.4.4.6 Tinción histoquímica de l'actividad GUS

El ensayo GUS se ha realizado con las líneas de *Arabidopsis* transgénicas transformadas con el vector de expresión pBI101 en que se habían clonado 1200 bp del promotor de ZmKS1 (fondo Ler). Este plásmido contiene el gen que codifica la

enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (GUS), que se expresa bajo el control de las 1100 bp del promotor de ZmKS1 clonado en el vector.

Protocolo:

1. Sumergir el material vegetal en la solución de tinción de GUS
2. Aplicar bomba de vacío durante 5 minutos
3. Incubar las muestras durante 6-24 h a 37°C así que se realice la reacción de GUS.
4. Retirar la solución de tinción.
5. Para aumentar el contraste de la tinción, lavar varias veces las muestras con etanol 70% a TA.
6. Observar las muestras por medio del microscopio Zeiss AxioPhot.

Solución de tinción de GUS: 50 mM tampón fosfato a pH 7,0; 0,1 mM ferricianuro potásico, 10 mM EDTA a pH 8,0; 0,1% triton X-100 (v/v); 1 mg/ml X-Gluc (**solución madre de X-Gluc:** 50 mg X-Glucan 0,5 ml N,N-dimetilformamida. Guardara a 4°C por 2-3 días o a -20°C por 2-3 semanas)

6.4.5 Obtención de plantas transgénicas de Maíz

La obtención de plantas transgénicas de maíz se ha realizado por bombardeo (biobalística) de callos generados a partir del genotipo híbrido Hi-II (A188xB73) (Armstrong et al., 1992) con micro-partículas de oro recubiertas de material genético.

Las construcciones utilizadas para la transformación se han realizado por medio de vectores de tecnología Gateway de Invitrogen: el pANIC5D para generar líneas de sobreexpresión y el pANIC7D para generar líneas RNAi *interference*, cada uno transformado con el cDNA entero de las dos isoformas ZmKS2 y ZmKS1. En estos vectores, la expresión está bajo control del promotor constitutivo de ubiquitina de maíz.

Los protocolos utilizados para la generación, transformación y selección de callos transgénicos, y para el crecimiento de estos hasta obtener plantas siguen los descritos por Amara y Capellades en 2013 (Amara et al., 2013).

Para chequear la presencia del cDNA de los TFs, se han realizado PCR a partir de DNA genómico de callos en fase de selección, utilizando un primer interno al promotor ubiquitina y otros específicos de los cDNAs insertados.

Durante el trabajo hemos llegado a tener solo líneas transgénicas del ZmKS2.

6.4.6 Ensayos realizados con plantas transgénicas de Maíz

6.4.6.1 Ensayo de pérdida de agua

Para este ensayo se han utilizado plántulas de maíz (Ct y transgénicas) producidas por técnicas de *in-vitro*, que acababan de terminar el proceso de vernalización en invernaderos. Se han cortado las 1ª y 2ª hojas nuevas producidas por las plantas después de haber sido pasadas en invernadero.

Siendo muy largas, las hojas de maíz se han puesto enrolladas en placas Petri, de forma que la parte cara inferior de la hoja quedase lo máximo posible expuesta al aire. Antes de empezar a medir los pesos con la balanza de precisión, se ha apuntado el peso de cada placa vacía, para después poderlo restar y obtener el valor efectivo de la hoja. Para cada línea se realizaron varias replicas (por lo menos 2 plantas) y se calculó la pérdida de agua respecto al peso fresco inicial.

Durante el experimento, la temperatura se mantuvo a unos 25°C y se evitaron las corrientes de aire (aire acondicionado apagado, puertas cerradas).

Los datos recogidos han sido luego analizados utilizando el programa Excel de Windows.

6.4.6.2 Molde de hojas de maíz

Para este ensayo se han utilizado hojas de plantas adultas de maíz.

Protocolo:

1. Recortar una hoja adulta de maíz y bloquearla a una superficie lisa con la parte abaxial de la hoja hacia arriba.

2. Pasar una capa finita de esmalte de uñas transparente en la zona de se quiere hacer el molde.

3. Dejar secar, luego pegar un trozo de celo transparente (importante que no sea opaco) por encima de la capa de esmalte presionar ligeramente para que entre bien en contacto con el esmalte.

4. Remover el trozo de celo con cuidado y pegarlo a un vidrio porta objetos. (la muestra se puede guardar indefinidamente).

5. Analizar la muestra al microscopio Zeiss AxioPhot y sacar fotos del molde por medio de la cámara Olympus DP70 unida al microscopio.

6. Utilizar el programa ImageJ, para realizar las imágenes (por ejemplo: contaje del número de células totales, del número promedio de estomas por unidad de superficie, mediciones del área promedio de cada tipo de célula).

6.5 Análisis de datos

- BASE DE DATOS NCBI: herramienta BLAST.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

-BASE DE DATOS GRAMENE: genoma maíz, herramienta BLAST.

<http://gramene.org/>

-BASE DE DATOS TAIR: herramienta BLAST.

<http://www.arabidopsis.org/>

-EXPASY: herramienta PI, para el cálculo del peso molecular teórico y el punto isoeléctrico.

<http://web.expasy.org/protparam/>

-ImageJ: análisis de imagen.

<http://rsbweb.nih.gov/ij>

-PFAM: análisis de dominios y motivos de proteínas.

<http://sanger.ac.uk>

- PREDIKIN: Predicción de sitios de fosforilación de proteínas.

<http://predikin.biosci.uq.edu.au/>

-PLANT PAN: análisis de promotores de plantas

HTTP://PLANTPAN.MBC.NCTU.EDU.TW/SEQ_ANALYSIS.PHP

6. MATERIALES Y METODOS

-BioEdit: análisis de secuencias.

- LightCycler® 480 SW 1.5: análisis real time PCR

7 BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., T. Urao, et al. (2003). "Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling." Plant Cell **15**(1): 63 - 78.
- Ahuja, I., R. C. H. de Vos, et al. (2010). "Plant molecular stress responses face climate change." Trends in Plant Science **15**(12): 664-674.
- Amara, I., M. Capellades, et al. (2013). "Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene." Journal of Plant Physiology **170**(9): 864-873.
- Anderberg, R. J. and M. K. Walker-Simmons (1992). "Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10183-10187.
- Armstrong, C., J. Romero-Severson, et al. (1992). "Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification, of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. ." TAG Theoretical and Applied Genetics **84**: 755-762.
- Atchley, W. and W. Fitch (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 5172 - 5176.
- Atchley, W. R., W. Terhalle, et al. (1999). "Positional Dependence, Cliques, and Predictive Motifs in the bHLH Protein Domain." Journal of Molecular Evolution **48**(5): 501-516.
- Ausubel, M., R. Brent, et al. (1989). "Current protocols in molecular biology, Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988." Molecular Reproduction and Development **1**(2): 146-146.
- Ballio, A., E. B. Chain, et al. (1964). "Fusicoccin: a New Wilting Toxin produced by *Fusicoccum amygdali* Del." Nature **203**(4942): 297-297.
- Bartels, D. and R. Sunkar (2005). "Drought and Salt Tolerance in Plants." Critical Reviews in Plant Sciences **24**(1): 23-58.
- Becker, A., K.-U. Winter, et al. (2000). "MADS-Box Gene Diversity in Seed Plants 300 Million Years Ago." Molecular Biology and Evolution **17**(10): 1425-1434.
- Bernhardt, C., M. M. Lee, et al. (2003). "The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root." Development **130**(26): 6431-6439.
- Bihmidine, S., J. Lin, et al. (2013). "Activity of the Arabidopsis RD29A and RD29B promoter elements in soybean under water stress." Planta **237**(1): 55-64.
- Blum, A. (2011). "Drought resistance – is it really a complex trait?" Functional Plant Biology **38**(10): 753-757.

7. BIBLIOGRAFIA

Boudsocq, M., H. Barbier-Brygoo, et al. (2004). "Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*." J Biol Chem **279**(40): 41758-41766.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**(1-2): 248-254.

Bray, E., J. Bailey-Serres, et al. (2000). "Responses to abiotic stresses." Biochemistry and Molecular Biology of Plants: 1158-1203.

Bresnick, E. H. and G. Felsenfeld (1994). "The leucine zipper is necessary for stabilizing a dimer of the helix-loop-helix transcription factor USF but not for maintenance of an elongated conformation." Journal of Biological Chemistry **269**(33): 21110-21116.

Bressan, R., H. Bohnert, et al. (2009). "Abiotic Stress Tolerance: From Gene Discovery in Model Organisms to Crop Improvement." Mol Plant **2**(1): 1-2.

Brownlie, P., T. A. Ceska, et al. (1997). "The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control." Structure **5**(4): 509-520.

Buck, M. and W. Atchley (2003). "Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins." J Mol Evol **56**: 742 - 750.

Carretero-Paulet, L., A. Galstyan, et al. (2010). "Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in *Arabidopsis*, Poplar, Rice, Moss, and Algae." Plant Physiol **153**(3): 1398-1412.

Castillon, A., H. Shen, et al. (2007). "Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks." Trends Plant Sci. **12**: 514.

Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **16**(6): 735-743.

Cominelli, E., L. Conti, et al. (2013). "Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance." New Biotechnology **30**(4): 355-361.

Cutler, A. and J. Krochko (1999). "Formation and breakdown of ABA." Trends Plant Sci. **4**: 472.

Cutler, S. R., P. L. Rodriguez, et al. (2010). "Abscisic acid: emergence of a core signaling network." Annu Rev Plant Biol **61**(1): 651-679.

CHAVES, M. M. (1991). "Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation." Journal of Experimental Botany **42**(1): 1-16.

Chen, K. and N. Rajewsky (2007). "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs." Nat Rev Genet **8**(2): 93-103.

7. BIBLIOGRAFIA

Chinnusamy, V., M. Ohta, et al. (2003). "ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis." Genes Dev. **17**: 1043.

Chinnusamy, V., K. Schumaker, et al. (2004). "Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants." J Exp Bot **55**(395): 225-236.

Daszkowska-Golec, A. and I. Szarejko (2013). "Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions." Frontiers in Plant Science **4**.

Dias, A. P., E. L. Braun, et al. (2003). "Recently Duplicated Maize R2R3 Myb Genes Provide Evidence for Distinct Mechanisms of Evolutionary Divergence after Duplication." Plant Physiol **131**(2): 610-620.

Dunoyer, P., C. H. Lecellier, et al. (2004). "Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing." Plant Cell **16**(5): 1235-1250.

Eckardt, N. A., E. Cominelli, et al. (2009). "The Future of Science: Food and Water for Life." The Plant Cell Online **21**(2): 368-372.

Ellis, J. J. and B. Kobe (2011). "Predicting Protein Kinase Specificity: Predikin Update and Performance in the DREAM4 Challenge." PLoS One **6**(7): e21169.

Fairman, R., R. Beran-Steed, et al. (1993). "Multiple oligomeric states regulate the DNA-binding of helix-loop-helix peptides." Proc Natl Acad Sci USA **90**: 10429 - 10433.

Feller, A., J. M. Hernandez, et al. (2006). "An ACT-like Domain Participates in the Dimerization of Several Plant Basic-helix-loop-helix Transcription Factors." Journal of Biological Chemistry **281**(39): 28964-28974.

Feller, A., K. Machemer, et al. (2011). "Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors." The Plant Journal **66**(1): 94-116.

Finkelstein, R., S. Gampala, et al. (2002). "Abscisic acid signaling in seeds and seedlings." Plant Cell **14**(Suppl): S15 - 45.

Finkelstein, R., T. Lynch, et al. (2011). "Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally." Journal of Experimental Botany **62**(11): 3971-3979.

Finkelstein, R., W. Reeves, et al. (2008). "Molecular aspects of seed dormancy." Annu Rev Plant Biol **59**: 387-415.

Finkelstein, R. R. (1994). "Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations." The Plant Journal, **5**: 765–771. doi: [10.1046/j.1365-313X.1994.5060765.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.5060765.x).

Finkelstein, R. R., M. Li Wang, et al. (1998). "The Arabidopsis Abscisic Acid Response Locus ABI4 Encodes an APETALA2 Domain Protein." The Plant Cell Online **10**(6): 1043-1054.

7. BIBLIOGRAFIA

Fujii, H., V. Chinnusamy, et al. (2009). "In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway." Nature advance online publication.

Fujii, H. and J. K. Zhu (2009). "Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8380-8385.

Fujita, Y., M. Fujita, et al. (2011). "ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants." J Plant Res **124**(4): 509-525.

Furihata, T., K. Maruyama, et al. (2006). "Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1988-1993.

Goday, A., A. B. Jensen, et al. (1994). "The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals." The Plant Cell Online **6**(3): 351-360.

Golldack, D., I. Luning, et al. (2011). "Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network." Plant Cell Rep **30**(8): 1383-1391.

Gomez, J., D. Sanchez-Martinez, et al. (1988). "A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein." Nature **334**(6179): 262-264.

González-García, M. P., D. Rodríguez, et al. (2003). "Negative Regulation of Abscisic Acid Signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 Plays A Role in Seed Dormancy Regulation and Promotion of Seed Germination." Plant Physiol **133**(1): 135-144.

Gonzalez-Guzman, M., G. A. Pizzio, et al. (2012). "Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid." The Plant Cell Online **24**(6): 2483-2496.

Gordân, R., N. Shen, et al. (2013). "Genomic Regions Flanking E-Box Binding Sites Influence DNA Binding Specificity of bHLH Transcription Factors through DNA Shape." Cell Reports **3**(4): 1093-1104.

Govind, G., H. Vokkaliga Thammegowda, et al. (2009). "Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut." Molecular Genetics and Genomics **281**(6): 591-605.

Grove, C. A., F. De Masi, et al. (2009). "A Multiparameter Network Reveals Extensive Divergence between *C. elegans* bHLH Transcription Factors." Cell **138**(2): 314-327.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.

Hauser, F., R. Waadt, et al. (2011). "Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms." Curr Biol **21**(9): R346-355.

7. BIBLIOGRAFIA

- Heim, M., M. Jakoby, et al. (2003). "The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity." Mol Biol Evol **20**: 735 - 747.
- Henke, W., K. Herdel, et al. (1997). "Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences." Nucleic Acids Research **25**(19): 3957-3958.
- Hernandez, J. M., A. Feller, et al. (2007). "The basic helix-loop-helix domain of maize R links transcriptional regulation and histone modifications by recruitment of an EMSY-related factor." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(43): 17222-17227.
- Herold, S., M. Wanzel, et al. (2002). "Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1." Molecular cell **10**(3): 509-521.
- Hrabak, E. M., C. W. M. Chan, et al. (2003). "The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases." Plant Physiol **132**(2): 666-680.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling." Cell **80**(2): 225-236.
- Ichihashi, Y., G. Horiguchi, et al. (2010). "The bHLH Transcription Factor SPATULA Controls Final Leaf Size in Arabidopsis thaliana." Plant and Cell Physiology **51**(2): 252-261.
- Inzé, D. and L. De Veylder (2006). "Cell Cycle Regulation in Plant Development1." Annual Review of Genetics **40**(1): 77-105.
- Jones, S. (2004). "An overview of the basic helix-loop-helix proteins." Genome Biology **5**(6): 226.
- Kanaoka, Pillitteri, et al. (2008). "SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to Arabidopsis stomatal differentiation." Plant Cell **20**: 1775.
- Khush, G. S. (2001). "Green revolution: the way forward." Nat Rev Genet **2**(10): 815-822.
- Kim, M. J., M. J. Park, et al. (2012). "Controlled nuclear import of the transcription factor NTL6 reveals a cytoplasmic role of SnRK2.8 in the drought-stress response." Biochemical Journal **448**(3): 353-363.
- Klingler, J. P., G. Batelli, et al. (2010). "ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling." J Exp Bot **61**(12): 3199-3210.
- Kulik, A., I. Wawer, et al. (2011). "SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses." OMICS **15**(12): 859-872.
- Kumar, S. V., D. Lucyshyn, et al. (2012). "Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering." Nature **484**(7393): 242-245.

7. BIBLIOGRAFIA

- Kuromori, T. and K. Shinozaki (2010). "ABA transport factors found in Arabidopsis ABC transporters." Plant Signaling & Behavior **5**(9): 1124-1126.
- Ledent, V. and M. Vervoort (2001). "The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis." Genome Res **11**: 754 - 770.
- Lee, K. H., H. L. Piao, et al. (2006). "Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid." Cell **126**(6): 1109-1120.
- Leonhardt, N., J. M. Kwak, et al. (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.
- Leung, J., M. Bouvier-Durand, et al. (1994). "Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase." Science **264**(5164): 1448-1452.
- Li, J., X. Q. Wang, et al. (2000). "Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase." Science **287**(5451): 300-303.
- Li, X., X. Duan, et al. (2006). "Genome-Wide Analysis of Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Rice and Arabidopsis." Plant Physiol **141**(4): 1167-1184.
- Liu, W., H. Tai, et al. (2014). "bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in Arabidopsis and in the repression of ABA catabolism." New Phytologist **201**(4): 1192-1204.
- López-Paz, C., B. Vilela, et al. (2009). "Maize AKIN $\beta\gamma$ dimerizes through the KIS/CBM domain and assembles into SnRK1 complexes." FEBS Lett **583**(12): 1887-1894.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, et al. (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science **324**(5930): 1064 - 1068.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, et al. (2009). "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors." Science **324**(5930): 1064-1068.
- MacAlister, C., K. Ohashi-Ito, et al. (2007). "Transcription-factor control of asymmetric divisions that establish the stomatal lineage." Nature **445**: 537.
- Massari, M. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**: 429 - 440.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-440.
- Masucci, J. D. and J. W. Schiefelbein (1994). "The rhd6 Mutation of Arabidopsis thaliana Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process." Plant Physiol **106**(4): 1335-1346.
- Melcher, K., L.-M. Ng, et al. (2009). "A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors." Nature **462**(7273): 602-608.

7. BIBLIOGRAFIA

- Merlot, S., F. Gosti, et al. (2001). "The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway." The Plant Journal **25**(3): 295-303.
- Meyer, K., M. Leube, et al. (1994). "A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*." Science **264**(5164): 1452-1455.
- Mian, A., R. J. F. J. Oomen, et al. (2011). "Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance." The Plant Journal **68**(3): 468-479.
- Miyazono, K.-i., T. Miyakawa, et al. (2009). "Structural basis of abscisic acid signalling." Nature **462**(7273): 609-614.
- Morohashi, K., M. I. Casas, et al. (2012). "A Genome-Wide Regulatory Framework Identifies Maize Pericarp Color1 Controlled Genes." The Plant Cell Online **24**(7): 2745-2764.
- Mundy, J. and N. H. Chua "Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene." EMBO J. **7**((8)): 2279–2286.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell **56**(5): 777-783.
- Mustilli, A. C., S. Merlot, et al. (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.
- Nair, S. K. and S. K. Burley (2000). "Functional genomics: Recognizing DNA in the library." Nature **404**(6779): 715-718.
- Nakashima, K., Y. Fujita, et al. (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 Cell Physiol. **50**(7): 1345-1363.
- Nambara, E. and A. Marion-Poll (2005). "ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM." Annu Rev Plant Biol **56**(1): 165-185.
- Nesi, N., I. Debeaujon, et al. (2000). "The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in Arabidopsis Siliques." The Plant Cell Online **12**(10): 1863-1878.
- Nishimura, N., K. Hitomi, et al. (2009). "Structural Mechanism of Abscisic Acid Binding and Signaling by Dimeric PYR1." Science **326**(5958): 1373-1379.
- Niu, X., T. Helentjaris, et al. (2002). "Maize ABI4 Binds Coupling Element1 in Abscisic Acid and Sugar Response Genes." The Plant Cell Online **14**(10): 2565-2575.

7. BIBLIOGRAFIA

Ohashi-Ito, K. and D. Bergmann (2006). "Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development." Plant Cell **18**: 2493.

Osakabe, Y., K. Osakabe, et al. (2014). "Response of plants to water stress." Frontiers in Plant Science **5**.

Pandey, N., A. Ranjan, et al. (2013). "CAMTA 1 regulates drought responses in Arabidopsis thaliana." BMC Genomics **14**(1): 216.

Park, S., P. Fung, et al. (2009). "Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." Science **324**(5930): 1068 - 1071.

Park, S. Y., P. Fung, et al. (2009). "Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins." Science **324**(5930): 1068-1071.

Payne, C. T., F. Zhang, et al. (2000). "GL3 Encodes a bHLH Protein That Regulates Trichome Development in Arabidopsis Through Interaction With GL1 and TTG1." Genetics **156**(3): 1349-1362.

Pellegrineschi, A., M. Reynolds, et al. (2004). "Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions." Genome **47**(3): 493-500.

Pillitteri, L., D. Sloan, et al. (2007). "Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata." Nature **445**: 501.

Pillitteri, L. J. and K. U. Torii (2007). "Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development." BioEssays **29**(9): 861-870.

Pillitteri, L. J. and K. U. Torii (2012). "Mechanisms of Stomatal Development." Annu Rev Plant Biol **63**(1): 591-614.

Pires, N. and L. Dolan (2010). "Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop-Helix Proteins in Plants." Molecular Biology and Evolution **27**(4): 862-874.

Pla, M., J. Gómez, et al. (1991). "Regulation of the abscisic acid-responsive gene rab28 in maize viviparous mutants." Molecular and General Genetics MGG **230**(3): 394-400.

Quesada, V., M. Ponce, et al. (2000). "Genetic analysis of salt-tolerant mutants in Arabidopsis thaliana." Genetics **154**: 421.

Raghavendra, A. S., V. K. Gonugunta, et al. (2010). "ABA perception and signalling." Trends Plant Sci **15**(7): 395-401.

Ramsay, N. A. and B. J. Glover (2005). "MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity." Trends Plant Sci **10**(2): 63-70.

7. BIBLIOGRAFIA

Reeves, W., T. Lynch, et al. (2011). "Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors." Plant Molecular Biology **75**(4-5): 347-363.

Riechmann, J. L., J. Heard, et al. (2000). "Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes." Science **290**(5499): 2105-2110.

Robinson, K. and J. Lopes (2000). "Saccharomyces cerevisiae basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes." Nucleic Acids Res **28**: 1499 - 1505.

Rodrigues, A., M. Adamo, et al. (2013). "ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase1 Signaling in Arabidopsis." The Plant Cell Online **25**(10): 3871-3884.

Rodriguez, P. L., G. Benning, et al. (1998). "ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." FEBS Lett **421**(3): 185-190.

Rubio, S., A. Rodrigues, et al. (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.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schroeder, J., J. Kwak, et al. (2001). "Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants." Nature **410**(6826): 327 - 330.

Schweighofer, A., H. Hirt, et al. (2004). "Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling." Trends in Plant Science **9**(5): 236-243.

Seo, M. and T. Koshiba (2011). "Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action." J Plant Res **124**(4): 501-507.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki (2000). "Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways." Curr Opin Plant Biol **3**(3): 217 - 223.

Shiu, S.-H., M.-C. Shih, et al. (2005). "Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals." Plant Physiol **139**(1): 18-26.

Söderman, E. M., I. M. Brocard, et al. (2000). "Regulation and Function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 Gene in Seed and Abscisic Acid Response Signaling Networks." Plant Physiol **124**(4): 1752-1765.

Soon, F. F., L. M. Ng, et al. (2012). "Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases." Science **335**(6064): 85-88.

7. BIBLIOGRAFIA

Takahashi, Y., Y. Ebisu, et al. (2013). "bHLH Transcription Factors That Facilitate K⁺ Uptake During Stomatal Opening Are Repressed by Abscisic Acid Through Phosphorylation." Sci. Signal. **6**(280): ra48-.

Tan, B., S. Schwartz, et al. (1997). "Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 12235.

Tanaka, N., M. Kato, et al. (2014). "Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses." Journal of Experimental Botany **65**(6): 1497-1512.

Tester, M. and P. Langridge (2010). "Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World." Science **327**(5967): 818-822.

Tezara, W., R. Colombo, et al. (2011). "Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem." Annals of Botany **107**(3): 397-405.

Toledo-Ortiz, G., E. Huq, et al. (2003). "The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family." Plant Cell **15**: 1749 - 1770.

Toledo-Ortiz, G., E. Huq, et al. (2003). "The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family." The Plant Cell Online **15**(8): 1749-1770.

Umezawa, T., K. Nakashima, et al. (2010). "Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport." Plant and Cell Physiology **51**(11): 1821-1839.

Umezawa, T., N. Sugiyama, et al. (2009). "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(41): 17588-17593.

Verslues, P. E., M. Agarwal, et al. (2006). "Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status." The Plant Journal **45**(4): 523-539.

Vilela, B., A. Moreno-Cortés, et al. (2013). "The Maize OST1 Kinase Homolog Phosphorylates and Regulates the Maize SNAC1-Type Transcription Factor." PLoS ONE **8**(2): e58105. doi:10.1371/journal.pone.0058105).

Vinocur, B. and A. Altman (2005). "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations." Current Opinion in Biotechnology **16**(2): 123-132.

Vlad, F., B. E. Turk, et al. (2008). "A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates." Plant J **55**(1): 104-117.

Wang, R. S., S. Pandey, et al. (2011). "Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of *Arabidopsis* guard cells." BMC Genomics **12**: 216.

7. BIBLIOGRAFIA

Wang, W., B. Vinocur, et al. (2003). "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance." Planta **218**(1): 1-14.

Weinthal, D. and T. Tzfira (2009). "Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay." Trends Plant Sci **14**(2): 59-63.

Wind, J. J., A. Peviani, et al. (2012). "ABI4: versatile activator and repressor." Trends Plant Sci **18**(3): 125-132.

Xiong, L., R.-G. Wang, et al. (2006). "Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid " Plant Physiol **142**, **November** (First Published on September 8, ; doi:10.1104/pp.106.084632): 1065-1074.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki (2005). "Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters." Trends Plant Sci **10**(2): 88 - 94.

Yin, P., H. Fan, et al. (2009). "Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins." Nat Struct Mol Biol **16**(12): 1230-1236.

Yoo, C. Y., P. M. Hasegawa, et al. (2011). "Regulation of stomatal density by the GTL1 transcription factor for improving water use efficiency." Plant Signaling & Behavior **6**(7): 1069-1071.

Yoshida, R., T. Hobo, et al. (2002). "ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is Required for Dehydration Stress Signaling in Arabidopsis." Plant Cell Physiol **43**(12): 1473-1483.

Yoshida, R., T. Umezawa, et al. (2006). "The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis." J Biol Chem **281**(8): 5310-5318.

Zhang, F., A. Gonzalez, et al. (2003). "A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis." Development **130**(20): 4859-4869.

Zhang, H., X. Mao, et al. (2010). "Overexpression of a Common Wheat Gene TaSnRK2.8 Enhances Tolerance to Drought, Salt and Low Temperature in Arabidopsis." PLoS ONE **5**(12): e16041.

Zhao, M., K. Morohashi, et al. (2008). "The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci." Development **135**(11): 1991-1999.

Zimmermann, Heim, et al. (2004). "Comprehensive identification of Arabidopsis thaliana MYB transcription factors interacting with R/B-like bHLH proteins." Plant J. **40**: 22.

8. ANEXOS

The Maize OST1 Kinase Homolog Phosphorylates and Regulates the Maize SNAC1-Type Transcription Factor

Belmiro Vilela¹✉, Alicia Moreno-Cortés¹✉, Agnese Rabissi¹, Jeffrey Leung², Montserrat Pagès¹, Victoria Lumberras¹*

1 Centre for Research in Agricultural Genomics, Bellaterra, Cerdanyola del Vallés, Spain, **2** Institut de Sciences du Végétal, Centre national de la recherche scientifique, Gif-sur-Yvette, France

Abstract

The *Arabidopsis* kinase OPEN STOMATA 1 (OST1) plays a key role in regulating drought stress signalling, particularly stomatal closure. We have identified and investigated the functions of the OST1 ortholog in *Z. mays* (ZmOST1). Ectopic expression of *ZmOST1* in the *Arabidopsis ost1* mutant restores the stomatal closure phenotype in response to drought. Furthermore, we have identified the transcription factor, ZmSNAC1, which is directly phosphorylated by ZmOST1 with implications on its localization and protein stability. Interestingly, ZmSNAC1 binds to the ABA-box of ZmOST1, which is conserved in SnRK2s activated by ABA and is part of the contact site for the negative-regulating clade A PP2C phosphatases. Taken together, our results indicate that ZmSNAC1 is a substrate of ZmOST1 and delineate a novel osmotic stress transcriptional pathway in maize.

Citation: Vilela B, Moreno-Cortés A, Rabissi A, Leung J, Pagès M, et al. (2013) The Maize OST1 Kinase Homolog Phosphorylates and Regulates the Maize SNAC1-Type Transcription Factor. PLoS ONE 8(2): e58105. doi:10.1371/journal.pone.0058105

Editor: Keqiang Wu, National Taiwan University, Taiwan

Received: June 11, 2012; **Accepted:** February 1, 2013; **Published:** February 28, 2013

Copyright: © 2013 Vilela et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: BV was financed by Fundação para a Ciência e Tecnologia PhD grant SFRH/BD/62070/2009 and European Union Marie-Curie Early Stage Training Fellowships MEST-CT-2005-020232-2 ADONIS. This work was supported by Consolider-Ingenio 2010CSD2007-00036 from MCYT (Spain) and grants BIO2009-13044 from MCYT (Spain) and CIRIT2009SGR626 from Comissionat per Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya to MP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: victoria.lumberras@cragenomica.es

✉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Plant growth and crop productivity are compromised by environmental stresses such as extreme temperatures, drought and high salinity. To cope with these adverse situations, plants have developed complex signalling networks to regulate physiological and biochemical acclimation. Reversible protein phosphorylation is one of the major mechanisms for modulating intracellular adaptations, in particular, those involved in ABA and stress signalling [1–3]. The ABA signal can stimulate – within minutes – regulators such as Sucrose non-fermenting related kinase (SnRK)-2 subfamily [4] that are central to diverse physiological responses.

Members of the SnRK2 subfamily have been characterized in different plant species [4–7]. The first SnRK2 gene, *PKABA* from wheat, is up-regulated by drought and ABA in seeds and vegetative tissues [7]. The homolog AAPK from faba bean is essential in relaying the ABA signal in stomatal closure [5]. Ten SnRK2 genes exist in the *Arabidopsis* and rice genomes. In *Arabidopsis*, except SnRK2.9, the kinase activity of each member of the family is activated by hyperosmotic stress [8] with five, SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6/OST1/SRK2E, SnRK2.7 and SnRK2.8 also activated by ABA [8]. A similar situation occurs in rice, in that the activities of three of the ten SnRK2 homologs (called SAPKs) are also stimulated by ABA [9]. Studies of mutants deficient in SnRK2.2 and SnRK2.3 activities showed that these kinases are required for ABA-mediated seed germination,

dormancy and seedling growth but have minor roles in stomatal control [10]. Conversely, SnRK2.6/OST1, the ortholog of AAPK, is mainly involved in ABA-mediated stomatal closure in response to humidity decrease but only has a minor role during seed germination [4,6,11,12]. In maize, eleven *SnRK2* genes have been reported [13], although only functional data are available for one, the corresponding protein ZmSAPK8/ZmOST1. This kinase, with a primary sequence highly homologous to that of the *Arabidopsis* OST1, is required in diverse stress signal transduction pathways, principally in drought and salt tolerance responses [13,14].

The molecular mechanisms of OST1 in orchestrating both the “fast” (ion transport across membrane) and “slow” (gene expression) ABA responses are increasingly being understood, which has been particularly aided by the identification of direct targets. OST1 (i) activates the slow anion channel SLAC1 to trigger plasma membrane depolarization necessary to initiate stomatal closing [15–17], (ii) possibly inhibits the inward-rectifying K⁺ channel KAT1 [18], (iii) induces the generation of reactive oxygen species (ROS) that leads to Ca²⁺ spikes *via* the respiratory burst oxidase homolog F (RbohF) [19] and (iv) activates the bZIP-class of transcription factors that include ABI5 [20,21] and the ABA-responsive element binding factors, ABF2 and ABF3 [11,22]. ABFs 2, 3 and 4 together are thought to regulate about 80% of the global ABA dependent transcriptome [20,22–24].

In comparison to ion transport across membranes [25–27], much less is known about the mechanisms of transcriptional

control by ABA in guard cell signalling [28,29]. Despite the apparent importance of the three ABFs as global regulators of the ABA transcriptome, the *Arabidopsis abf2/abf3/abf4* triple mutant is normal in transpiration [23]. This suggests that the ABF class of transcription factors is not critical for stomatal functions and that OST1 may have additional transcriptional targets [30–33].

In searching for cognate targets of the maize OST1 ortholog, we focused on the ABA/drought-inducible members of the NAC domain-containing transcription factors (SNAC proteins). Note that SNACs seem to have significant importance in stomatal adaptive regulation and also implications for improving plant stress tolerance [31,34]. Overexpression of *SNAC* genes in different plant species ranging from *Arabidopsis* to maize leads to enhanced drought and salt tolerance [12,35–41]. Of particular interest is the rice SNAC1, which is highly induced in guard cells by drought [35]. Similar overexpression of this protein in rice enhances plant drought tolerance under field conditions at the reproductive stage. It also improves both drought and salt tolerance at the vegetative stage, and more importantly, without yield penalty [35] and ZmSNAC1 has been described as a stress-responsive factor acting in positive modulation of abiotic stress tolerance [42]. Thus, SNAC factors are emerging as important nodes in osmotic stress signalling and as promising tools to engineer enhanced tolerance responses in plants with little compromise in biomass yield.

Maize (*Zea mays*) is an important food and feed crop worldwide, with more than 800 million tons cultivated annually, and about 130 million tons in the USA also being diverted for energy. However, maize requires high water input. For this reason, characterization of osmotic stress signalling pathways and proteins involved in maize water homeostasis are of huge economic importance as bouts of water shortage are becoming more frequent. In the present work, we have characterized the maize ortholog of the *Arabidopsis* OST1. We have also identified its cognate substrate, a SNAC-type transcription factor, ZmSNAC1. ZmSNAC1 represents a founding member of a new class of target that opens the possibility to better understand how ABA mediates transcriptional control of stomatal closure.

Results

ZmOST1 kinase can substitute the *Arabidopsis* OST1 in guard cell drought stress signalling

OST1 in *Arabidopsis* limits water loss in leaves through the regulation of stomatal closure [4,6]. Since ZmOST1 shares a 83% sequence identity and a similar constitutive pattern of expression during development and stress responses with its *Arabidopsis* counterpart (Figures S1 and S2) we tested whether ZmOST1 is a functional OST1 ortholog by examining its ability to complement the severe *ost1-2* allele carrying the point mutation (G33R) in the ATP-binding loop domain [6]. The expression levels of the *ZmOST1* transgene and protein in *ost1-2* transgenic plants were analyzed by RT-PCR and western-blot analyses using ZmOST1 antibody (Figure 1A). The ZmOST1 activity in the complemented *Arabidopsis* plants was determined by MBP in-gel kinase assays (Figure 1B). It has been reported that ABA activates OST1 but that this kinase activity is missing in the *ost1-2* allele [6]. Comparing MBP phosphorylation from wild-type, *ost1-2* and *ZmOST1/ost1-2* seedlings we detected in the *ZmOST1/ost1-2* extracts a new specific ABA-dependent kinase activity that is absent in the mutant [6]. The 42–43 kDa activity is coincidental to the expected size of ZmOST1, suggesting that the maize kinase is active in *Arabidopsis* (Figure 1B).

The ability of ZmOST1 to functionally substitute the *ost1-2* mutation was assessed by comparing the temperature of detached

leaves from *ost1-2* and *ZmOST1/ost1-2* plants by infrared thermography (Figure 1C and 1D). The *ost1-2* mutant transpires excessively due to its inability to close stomates triggered by drought, which leads to cooling of the leaf temperature [6]. We detected a temperature of 22.6°C in detached leaves from the mutant. By contrast, leaf temperatures of *35S::ZmOST1/ost1-2* plants were ~0.5 to 1.0°C warmer (23.6°C), indicating the ability of *ZmOST1* to partially limit transpiration in response to drought. Surprisingly, the *ost1-2* mutant expressing the wild-type *Arabidopsis OST1* transgene under the control of its own promoter (*pOST1::At4g33950*) also only rescued partially the leaf temperature phenotype [6]. To confirm these results, water loss kinetics were performed on detached rosettes. Indeed, as compared to *ost1-2*, the water loss susceptibility in *35S::ZmOST1/ost1-2* rosettes was reduced again to 47–53% confirming the rescue of the *ost1-2* phenotype (Figure 1E). The partial complementation obtained in both experiments suggests that the endogenous mutated OST1-2 protein interferes with OST1 and ZmOST1 in the rescue of the ABA signalling pathway. An analogous phenomenon was observed with the inactive AAPK-kinase expressed in wild-type *Vicia faba* guard cells, which interfered with ABA responsiveness [4,5,11]. Taken together these results confirm that ZmOST1 is functionally conserved across monocots and dicots and support the hypothesis that ZmOST1 is a positive regulator of water deficit signalling in guard cells.

ZmOST1 interacts with a homolog of the rice transcription factor SNAC1 *in vitro*

To identify unknown ZmOST1 targets, we performed a yeast two-hybrid screen using ZmOST1 as the bait, and as prey, a cDNA library from maize leaves dehydrated for 3 hours. Among several positives clones, we focused on a SNAC1-related transcription factor for further characterization. The *ZmSNAC1* clone encodes a protein of 312 amino acids highly homologous to rice SNAC1 (Figure 2A) which functions mainly in stomatal regulation [35]. Both proteins are almost identical in their DNA-binding NAC domains suggesting that they are functionally conserved.

We then validated the interaction in yeast and found that co-expression of pGBT7-ZmOST1 and pGAD424-ZmSNAC1 proteins permitted yeast growth on selective medium and specific activation of the LacZ reporter system (Figure 2B). In addition, Figure 2C shows that the bacterially-produced GST-ZmOST1 fusion protein interacts with ZmSNAC1 transcribed *in vitro* but not with GST alone indicating that ZmSNAC1 is a direct target of ZmOST1.

ZmOST1 interacts with ZmSNAC1 *in vivo*

We monitored the subcellular localization of ZmOST1-GFP and ZmSNAC1-GFP constructs in *Nicotiana benthamiana* and found that both proteins are localized in the nucleus and the cytoplasm of tobacco epidermal cells (Figure 3). Clade A PP2C phosphatases are upstream negative regulators of OST1 that constitutively inhibit its activity in the absence of ABA. In *Arabidopsis*, the mutated PP2C, *abil-1*, has been shown to require nuclear localization to block stomatal closure [43]. We thus tested whether the subcellular localization of an inactive ZmOST1 kinase (Figure S3) with the point mutation G40R might be altered. This mutated form, however, maintains the same subcellular localization of the wild-type kinase. Unexpectedly, while the level of the wild-type ZmOST1-GFP is low, this mutated form accumulates to higher levels in transformed tobacco cells. Since there is no noticeable altered subcellular localization between the wild-type and the mutant ZmOST1, which is stable, this could explain why

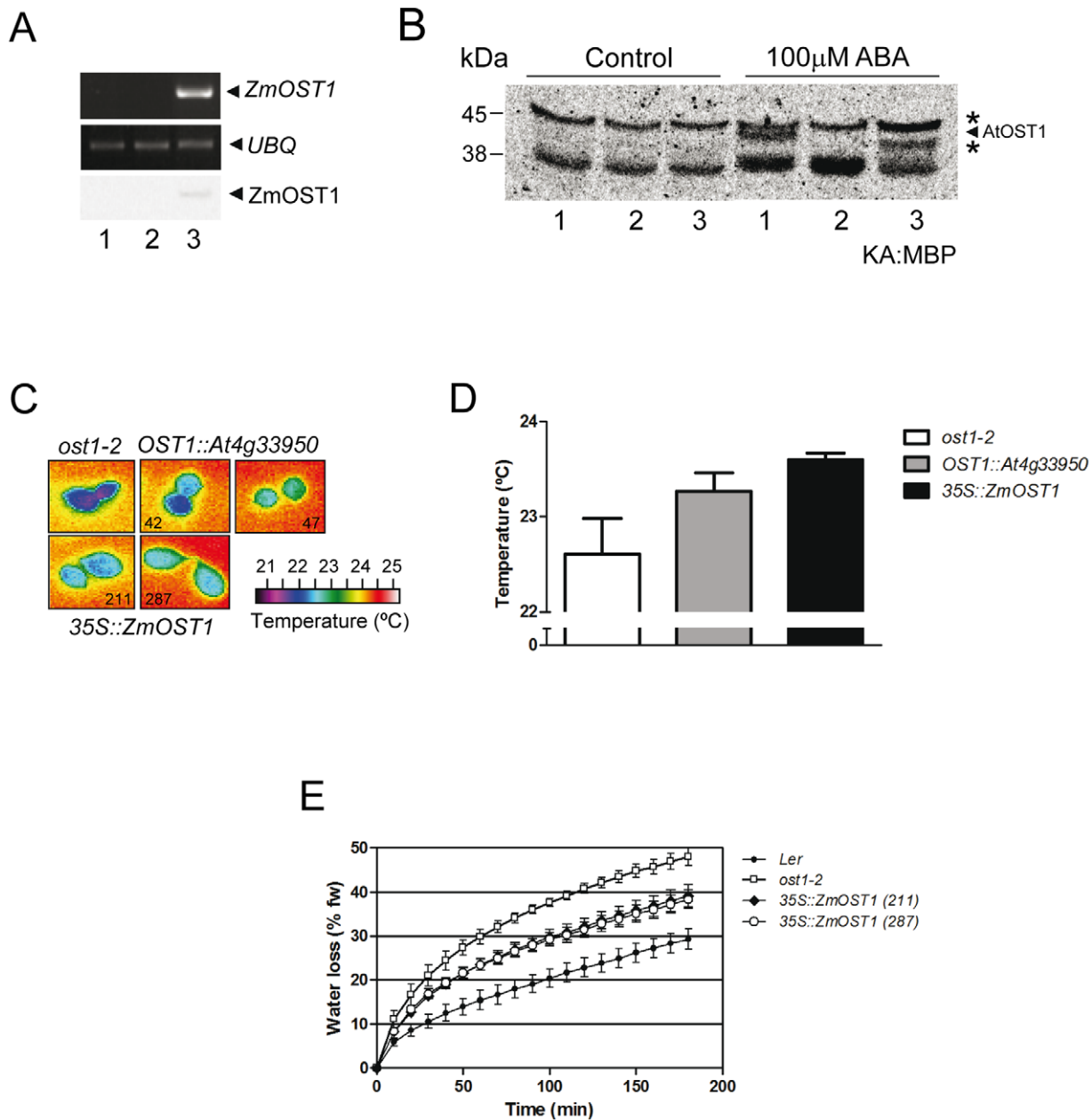


Figure 1. ZmOST1 complements the lack of OST1 function in drought stress signalling. (A) *ZmOST1* expression in different *Arabidopsis* lines analyzed by RT-PCR using *Ubiquitin* expression as control and by western-blot using an anti-*ZmOST1* antibody. Lane 1, *Ler* wild-type seedlings; lane 2, *ost1-2* mutant; lane 3, *35S::ZmOST1/ost1-2* transgenic line (211). (B) OST1 activation by ABA in *Arabidopsis* protein extract analyzed by MBP in-gel kinase assay (KA: MBP). Lane 1, *Ler* wild-type seedlings; lane 2, *ost1-2* mutant; lane 3, *35S::ZmOST1/ost1-2* transgenic line (211). Sizes of molecular markers are shown on the left. Black arrow marks AtOST1 activity. Asterisks mark two new bands of ABA-induced kinase activities resulting from *ZmOST1* transgene expression. (C) Phenotypic *ost1-2* complementation by *ZmOST1* in drought signalling. Detached leaves from *ost1-2* allele, *OST1::At4g33950/ost1-2* and *35S::ZmOST1/ost1-2* transgenic lines were monitored for foliar temperature by false-colour infrared image subjected to mild drought treatment [6]. (D) Quantification of infrared images. The average leaf temperatures were 22.61 ± 0.37 for the *ost1-2* allele; 23.27 ± 0.19 for *OST1::At4g33950/ost1-2* and 23.60 ± 0.07 for *35S::ZmOST1/ost1-2*. (E) Water loss kinetics using detached leaves of wild-type (closed circles), *ost1-2* mutant (open squares) and two independent *35S::ZmOST1/ost1-2* transgenic lines (line 211, closed diamonds and line 287, open circles). Water loss is expressed as the percentage of initial fresh weight. Values are means \pm SD of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0058105.g001

the kinases OST1-2 and AAPK similarly mutated in the P-loop could prevent full phenotypic complementation by their respective wild-type counterparts.

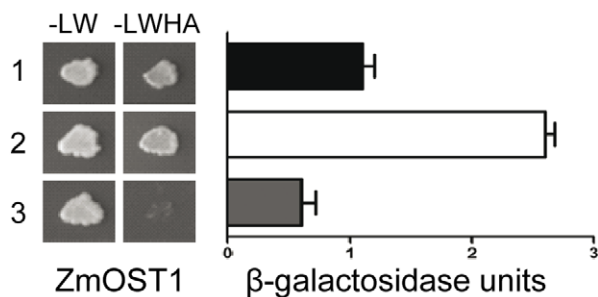
Next, we used bimolecular fluorescence complementation (BiFC) [35,44–46] to determine whether and where *ZmSNAC1* interacts with *ZmOST1* *in planta*, and if so, to characterize the

specific *ZmOST1* domains involved in this interaction. Full-length *ZmOST1* (G40R) and different deleted derivatives were fused to the C-terminal half of the YFP while the *ZmSNAC1* factor was fused to the N-terminal half (Figure 4). The results showed that *ZmOST1* interaction with *ZmSNAC1* is mainly nuclear and the different derivatives showed a nuclear/cytosolic distribution

A



B



C

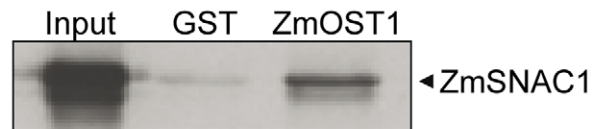


Figure 2. ZmOST1 interacts with ZmSNAC1. (A) Sequence alignment of maize and rice ZmSNAC1 proteins. The NAC-binding DNA domain is underlined below the alignment. (B) ZmOST1/ZmSNAC1 yeast two-hybrid interaction by growth in selective medium (left). β -galactosidase activity quantification of the co-transformed yeasts (right). Values are means \pm SD of three independent experiments. 1, pGBT7-ZmOST1/pGAD424-ZmSNAC1 interaction; 2, α and β CK2 subunits interaction used as positive control; 3, pGBT7-ZmOST1/pGAD424 interaction as a negative control. (C) ZmOST1/ZmSNAC1 interaction is confirmed by *in vitro* pull-down assay. Equal amounts of labelled ZmSNAC1 were incubated with GST and GST-ZmOST1 proteins coupled to glutathione-sepharose resin obtaining ZmSNAC1 specific *in vitro* retention. doi:10.1371/journal.pone.0058105.g002

(Figure 4). ZmOST1 interaction is independent of the kinase activity and is mediated by a site in the C-terminal regulatory domain corresponding to the region between amino acids 290–366. This domain is present in ABA-dependent SnRK2 kinases and is important for the negative regulation by the clade A PP2C phosphatases [47–49]. As shown in Figure 4, co-expression of the regulatory domain or the ABA-box of ZmOST1 alone, amino acids 325–366, with ZmSNAC1 reconstituted the YFP signal. No interaction was detected between *YN-ZmSNAC1* and *YC-ZmOST1 (1–289aa)* constructs. Thus, the ABA box is necessary and sufficient for this interaction [49]. While the ABA-box has been shown to form part of the contact site for the negative regulating PP2Cs [49,50], our results reveal that it is also important for substrate-binding. This raises the possibility that ZmSNAC1 may compete with the clade A PP2C phosphatases sharing the same docking region, highlighting the interesting perspective of substrate occupancy as a mechanism to sustain ABA signalling [48].

ZmSNAC1 is phosphorylated by ZmOST1

If ZmOST1 is activated by ABA and hyperosmotic stress, we reasoned that these treatments may lead to ZmSNAC1 phosphor-

ylation. In fact, even though the optimal motif for OST1 phosphorylation, LXRXX(S/T) [48], is absent in the ZmSNAC1 primary sequence, we were able to predict potential phosphorylation sites using a web-based bioinformatics tool (Table S1) [51]. To test ZmSNAC1 phosphorylation we used maize extracts pre-treated or not with either ABA, mannitol or salt to detect kinase activities toward recombinant ZmSNAC1 protein. Using in-gel kinase assays our results revealed a 43–44 kDa kinase that was rapidly and strongly activated in maize seedlings by mannitol and salt. However, 30 min after ABA stimulation, this activity became barely detectable (Figure 5A) suggesting that ZmSNAC1 is phosphorylated by kinases transiently activated by hyperosmotic stress signals.

We then demonstrated that ZmSNAC1 can be directly phosphorylated by ZmOST1 *in vitro* (Figure 5B). To identify the ZmSNAC1 region required for ZmOST1 phosphorylation, we made three deletion constructs: two dividing the NAC-binding DNA domain that lacked the C-terminal regulatory region (construct A:1–100 aa and construct B: 101–170 aa) and one lacking the N-terminal NAC-binding DNA domain (construct C: 171–312 aa; Figure 5B). As shown in Figure 5B, only domain C

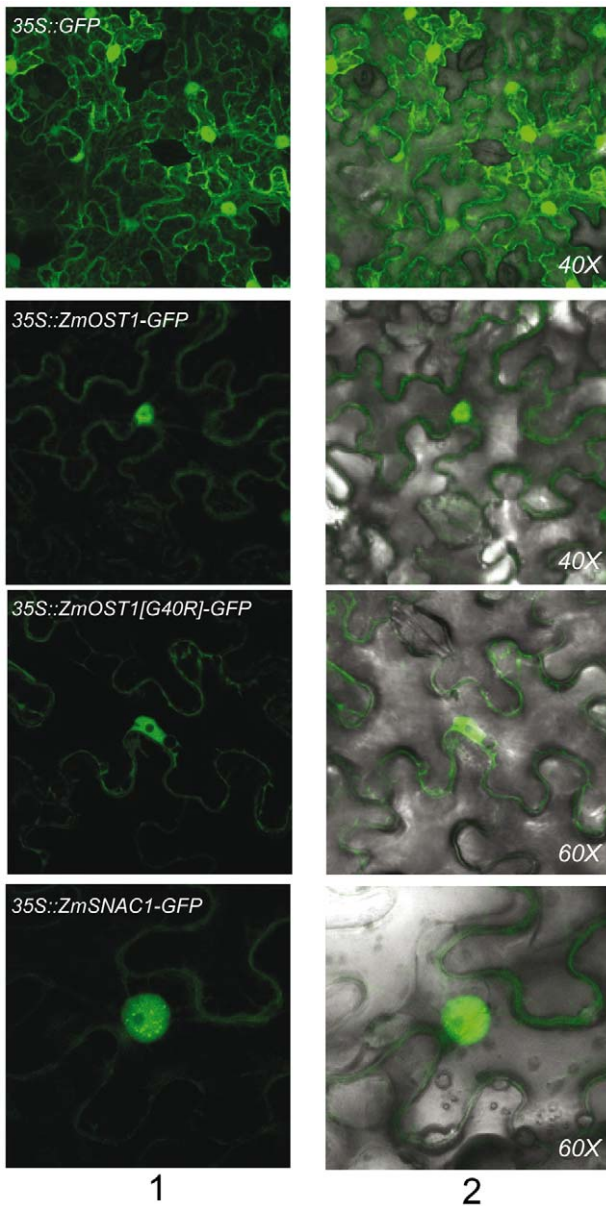


Figure 3. ZmOST1 and ZmSNAC1 co-localize in the nucleus. GFP, ZmOST1-GFP, ZmOST1 [G40R]-GFP and ZmSNAC1-GFP fusion proteins were localized by transient expression in epidermal tobacco leaves. Left, GFP signal; right, light microscope/GFP channel overlay. doi:10.1371/journal.pone.0058105.g003

was highly phosphorylated by ZmOST1 *in vitro* suggesting that it is the regulatory region which is phosphorylated by ZmOST1. These *in vitro* results are in accordance with our *in silico* prediction in which the domain C of ZmSNAC1 contains 12 potential phosphorylated peptides while ZmSNAC1-A and ZmSNAC1-B have two and one peptides, respectively (Table S1).

To ascertain whether ZmSNAC1 phosphorylation by ZmOST1 occurs and if other kinases could also phosphorylate this transcription factor, we used the heterologous *Arabidopsis* system described for the detection of the specific OST1/ZmOST1 activity (Figure 1B) on the recombinant ZmSNAC1 protein by modified *in gel* kinase assays. In these gels the MBP kinase substrate was replaced by SNAC1 overexpressed in *E. coli*. Total protein extracts from wild-type *Arabidopsis*, *ost1-2* mutant and





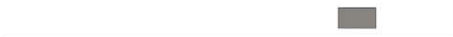

transgenic *ZmOST1/ost1-2* seedlings treated or not with ABA were loaded and a phosphorylation assay was performed *in gel*. As shown in (Figure 5C), the *Arabidopsis* OST1 (42 kDa activity band) from ABA-treated wild-type plant extracts was capable of phosphorylating ZmSNAC1. Note that the same phosphorylation activity was clearly missing in extracts from the *ost1-2* allele [6] and it was recovered in extracts of *ZmOST1/ost1-2* complemented line (Figure 5C). To validate these results we immunoprecipitated the kinases from the same extracts using an antibody directed against the ZmOST1 ABA-box which recognizes OST1 and ZmOST1 proteins. As can be seen by the western blot (bottom gel), we recovered two proteins by immunoprecipitation using this antibody, the most abundant being OST1/ZmOST1. OST1 was recovered in similar amounts on the wild-type and *ost1-2* backgrounds and ZmOST1 in slightly increased quantities in the *ZmOST1/ost1-2* line used as a result of it being overexpressed under a *35S* promoter. Analyzing the *in gel* kinase assay presented in the OST1 immunoprecipitation followed by *in gel* kinase assay toward recombinant ZmSNAC1 (middle gel) we detected a band that was activated by ABA on the wild-type and *ZmOST1/ost1-2* line which was absent in the *ost1-2* mutant. This activity can only be identified as OST1/ZmOST1 [6] and indeed confirms that ZmOST1 can phosphorylate ZmSNAC1 by an ABA-dependent mechanism, possibly by enhancing the transcriptional activity or stability of ZmSNAC1 in response to ABA or osmotic stresses.

The above assays not only confirmed the phosphorylation of ZmSNAC1 but also show that several kinases of 60-, 45-kDa can also phosphorylate this transcription factor (Figure 5C). The 60-kDa kinase band probably represents the endogenous AKIN10, another stress-activated kinase of the SnRK1 family [52]. We have confirmed this by using ZmSNAC1 as substrate, and performing phosphorylation assays with total protein extracts from wild-type, *35S::AKIN10-HA* and *AKIN10 RNAi* seedlings (Figure S4) [53]. In contrast to the ABA-dependent phosphorylation of ZmSNAC1 by OST1/ZmOST1, AKIN10 phosphorylation occurs in the absence of ABA. Thus, the transcriptional activity or protein stability of ZmSNAC1 might be co-modulated by both ABA-dependent and ABA-independent signalling pathways.

ZmOST1 alters the localization and stability of ZmSNAC1 under ABA treatment

Since ZmSNAC1 is phosphorylated by ZmOST1 after being activated by ABA, we were interested in determining the effects of this phosphorylation on ZmSNAC1, in particularly during ABA dependent signalling. We transiently co-expressed ZmSNAC1 fused to GFP in maize protoplasts together with ZmOST1 and ZmOST1 [G40R] fused to a HA-epitope and checked for fluorescence under a confocal microscope. Using this approach we were able to detect a change of localization of ZmSNAC1-GFP under ABA treatment when co-expressed with ZmOST1-HA to nuclear speckles that was absent when SNAC1-GFP was overexpressed alone (Figure 6). This formation of nuclear speckles is concomitant with a decrease of overall fluorescence that could have implications on protein stability. Furthermore, when we co-expressed ZmSNAC1 with the inactive ZmOST1 [G40R]-HA this speckled localization did not occur, giving strong indication that what we observed with the wild-type kinase was caused by ZmOST1 activity.

In order to better determine the *in vivo* phosphorylation and protein stability of SNAC1 we performed Bi-dimensional SDS-PAGE experiments comparing ZmSNAC1 protein fused to GFP using the *Arabidopsis* and maize protoplast systems. Even though in this experiment we were not able to clearly detect any protein shift that is consistent with a phosphorylation, the quantity and

| ZmOST1 | ZmSNAC1 |
|---|---------|
|  | ND |
|  | ++ |
|  | - |
|  | ++ |
|  | + |
|  | +++ |

 Catalytic domain  Regulatory domain  SnRK2 domain  ABA domain

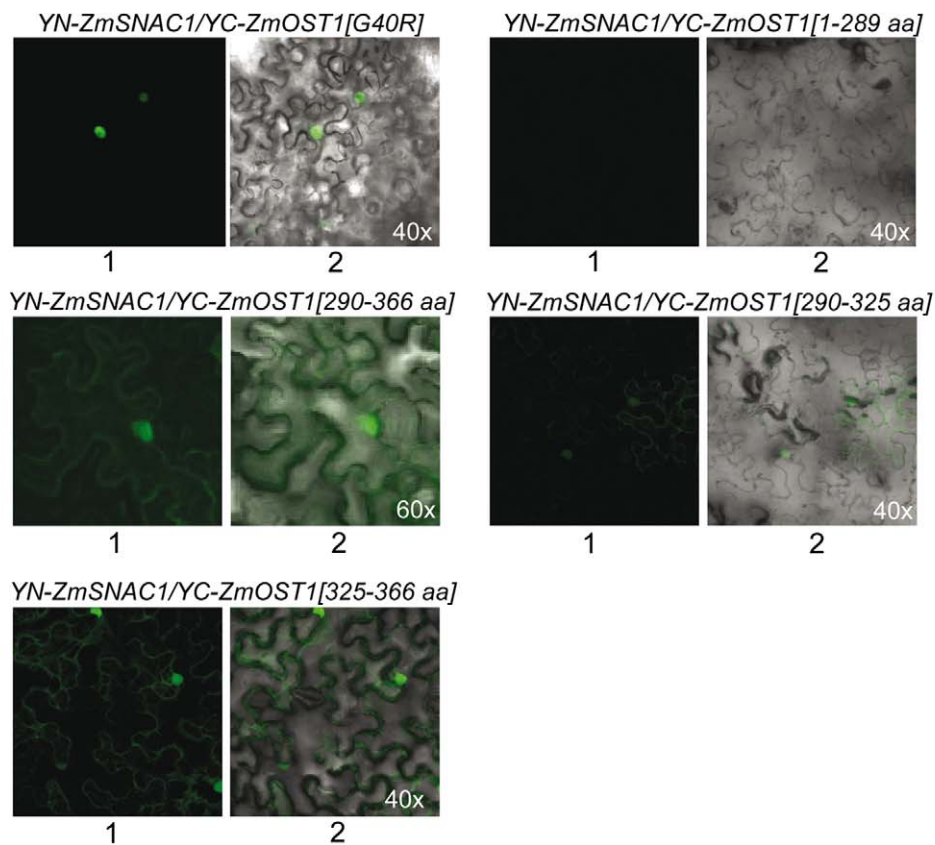


Figure 4. The interaction of ZmOST1 with SNAC1 depends on the ZmOST1 ABA-box. BiFC analysis of the interaction between ZmSNAC1 and different ZmOST1, ZmOST1 [G40R] mutant, and deletion forms as depicted on the left. Relative quantification of the BiFC interaction is shown on the right. BiFC fluorescence images analyzed by confocal microscopy are presented on the bottom. 1, YFP signals; 2, light microscope/BiFC channel. Numbers indicate ZmOST1 amino acid regions included in each construct. doi:10.1371/journal.pone.0058105.g004

abundance of ZmSNAC1 spots is clearly affected by ABA treatment when ZmOST1 is present (Figure 7). While in the *ost1-2* protoplasts ZmSNAC1 quantity is unaffected by ABA, when protoplasts are co-transformed with ZmOST1, a clear reduction of the most acidic ZmSNAC1 spots is clear (Figure 7A). When repeating the experiment in maize protoplasts we were able to observe the same degradation of ZmSNAC1 under ABA treatment (Figure 7B). These results seem to indicate that ZmOST1 activity has an effect on ZmSNAC1 stability.

Discussion

In recent years, significant progress has been made toward understanding the molecular basis for ABA signal transduction in *Arabidopsis* [25]. This has confirmed the SnRK2-related kinases, with OST1 being the founding member in *Arabidopsis*, as key elements in these responses [54–56].

The high homology of ZmOST1 with its *Arabidopsis* and rice counterparts (Figure S1) brought us to analyze the cellular

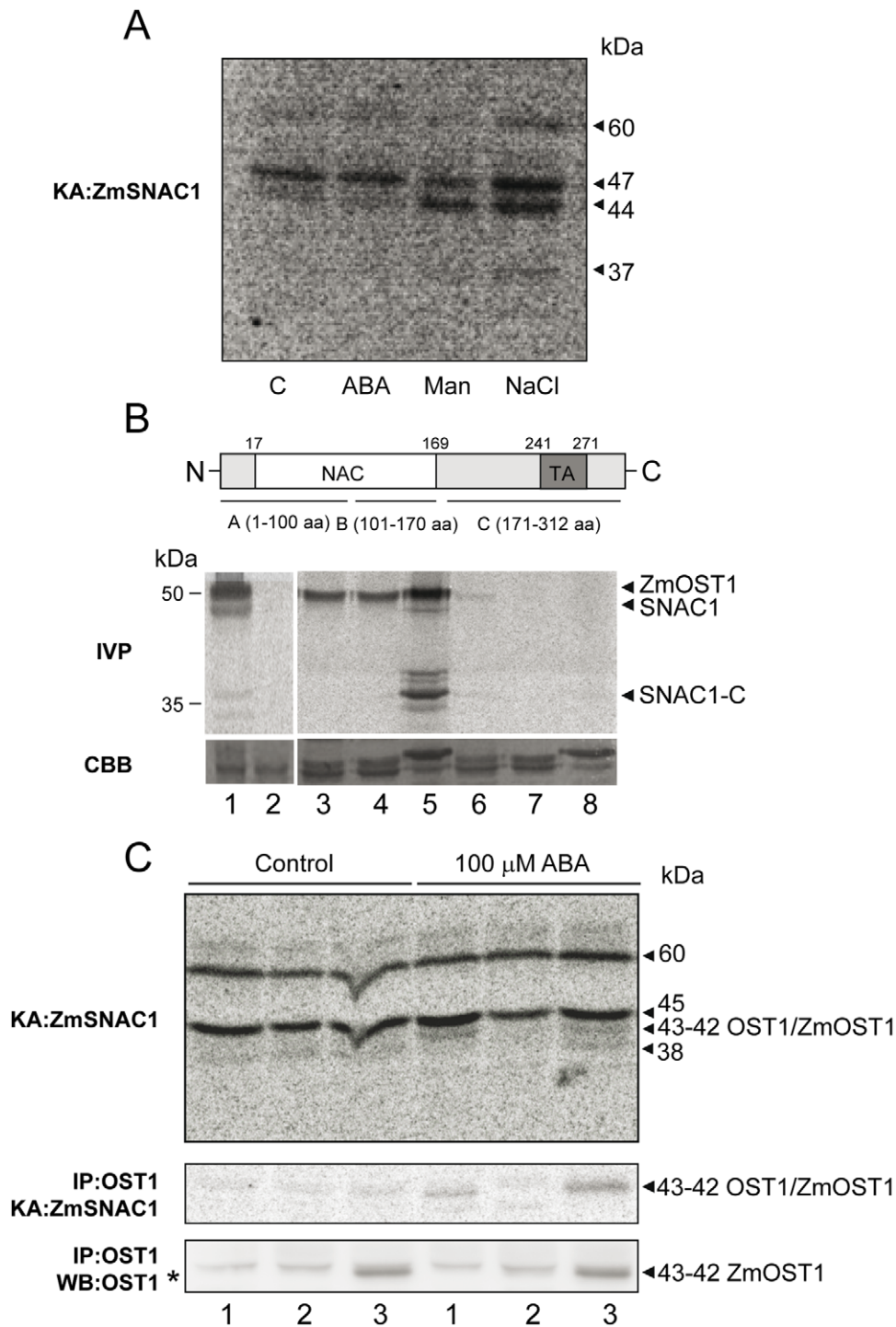


Figure 5. ZmSNAC1 phosphorylation by osmotic stress is dependent on ZmOST1 activity. (A) ZmSNAC1 phosphorylation is analyzed by in gel kinase assay (KA: ZmSNAC1). Protein extracts were prepared from maize young seedlings 30 min after treatments with MS 0.5 \times medium (C), 100 μ M ABA (ABA), 400 mM mannitol (Man) and 250 mM salt (NaCl). Sizes of the activity kinase bands obtained are shown on the right. (B) ZmSNAC1 *in vitro* phosphorylation by ZmOST1 (IVP). Schematic representation of ZmSNAC1 domains used in the experiment. Numbers indicate ZmSNAC1 amino acid regions included in each construct. AD marks the activation domain [35]. Phosphorylation of ZmSNAC1 and deletion forms is tested *in vitro*. 1, ZmSNAC1 phosphorylation by ZmOST1; 2, ZmSNAC1 alone; 3, 4, 5; ZmOST1 phosphorylation of ZmSNAC1 fragments A, B and C, respectively; 6, 7, 8 ZmSNAC1 fragments A, B and C, respectively. The expression of the different ZmSNAC1 constructs is verified by Coomassie-blue protein staining (CBB). (C) In gel kinase assay with proteins extracted from 7 day-old seedlings treated or not with 100 μ M ABA (KA: ZmSNAC1; upper gel). In gel kinase assay after immunoprecipitation of the same samples with an antibody against the ZmOST1 ABA-domain (IP: OST1/KA: ZmSNAC1; centre gel). Western-blot of the immunoprecipitation experiment (IP: OST1/WB: OST1; lower gel). Lane 1, Ler wild-type seedlings; lane 2, *ost1-2* mutant; lane 3, 35S::ZmOST1/*ost1-2* transgenic line. The ZmSNAC1 protein was used as substrate. Sizes of the activity kinase bands obtained are shown on the right.

doi:10.1371/journal.pone.0058105.g005

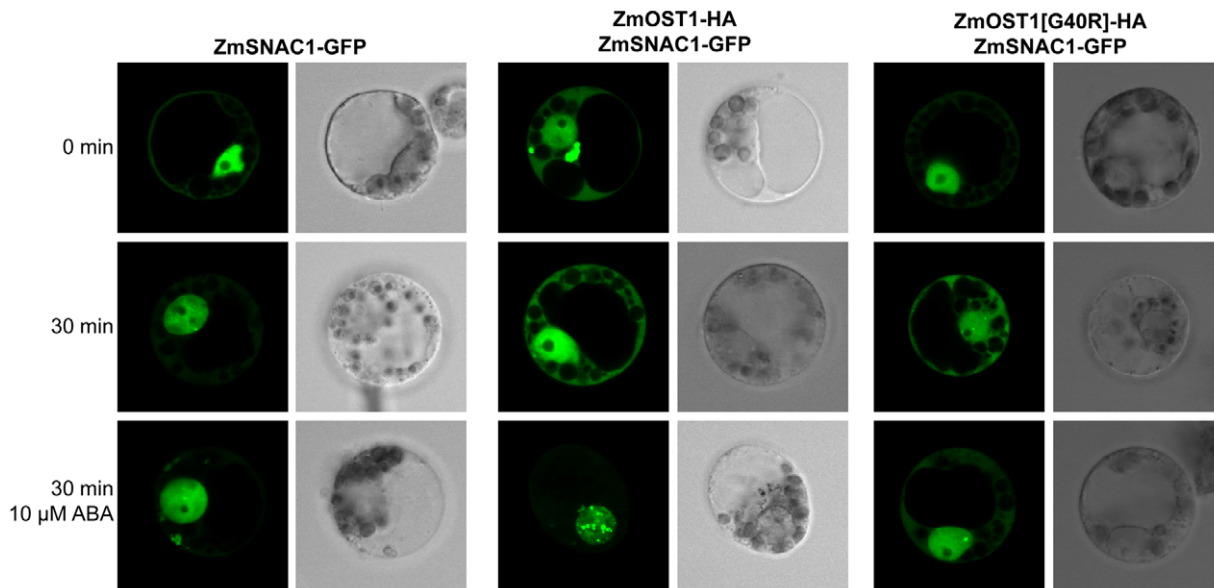


Figure 6. ZmSNAC1 localizes in nuclear speckles after ABA treatment when co-expressed with ZmOST1. ZmSNAC1-GFP localization is presented in the left, co-expressed with ZmOST1-HA in the middle and co-expressed with ZmOST1 [G40R]-HA in the right. Upper panel shows the localization of ZmSNAC1-GFP at the beginning of the experiment, centre panel the same localization after 30 minutes and the bottom panel represents ZmSNAC1-GFP localization after 30 minutes ABA treatment (10 μ M). doi:10.1371/journal.pone.0058105.g006

function of ZmOST1 in stomatal closure. ZmOST1 complements the *Arabidopsis ost1-2* mutant. This allele carries a missense G33R mutation that renders the kinase catalytically dead, which translates into a strong phenotype of stomatal deregulation in response to both ABA and water stress signals [6]. Phenotypic complementation of this allele revealed that ZmOST1 promotes stomatal closure in response to water stress working as a positive regulator in the drought signalling cascade. In the *Arabidopsis* model for ABA signalling, the PYR/PYL/RCAR ligand inactivates the PP2C phosphatases in the presence of ABA, resulting in the rapid activation of SnRK2 kinases to regulate a large part of stress-responsive gene expression by reversible phosphorylation [57–59]. This stomatal closure response we report might be mediated by direct phosphorylation of ion transporters or of different transcription factors such as the nuclear AREBs/ABFs and a subfamily of the NAC type transcription factors such as NTL6 which has been described to be functionally associated with SnRK2.8 in drought stress response [22,23,60].

Although ABFs, the predicted major targets of OST1 regulation [22], are also expressed in the guard cell and regulate an estimated 80% of the global ABA transcriptome, the *abf2 abf3 abf4* triple mutant is normal in transpiration [22,23,25,28,61,62] suggesting that other intermediates in the OST1-mediated transcriptional cascades in guard cell are still unknown. Among them, we identified ZmSNAC1. Unlike ABF which seem more involved in germination and seedling growth, SNAC proteins have a more prominent role in stomatal regulation [30]. Our results reveal that ZmSNAC1 becomes phosphorylated in response to osmotic stress and salt treatments in maize, suggesting that this posttranslational modification is needed to regulate its activation under stress [39]. One upstream kinase could well be ZmOST1.

ZmOST1/ZmSNAC1 interact in the nucleus (Figure 4), similar to what is described for OST1/ABF interaction in *Arabidopsis* [22] but different from SnRK2.8/NTL6 cytosolic interaction [60]. Whereas SnRK2.8 activity on NTL6 targets the transcription factor for nuclear import [60], it is possible that ZmOST1

phosphorylates SNAC1 to enhance its transcriptional activity through the regulation of protein stability, in a mechanism that could be opposite to what is described for the ABFs [22]. In the case of ABF3, phosphorylation by OST1 increases protein stability in what seems to be a two-step process that first accumulates and then activates the transcription factor to induce ABA regulated genes [22]. For ZmSNAC1, OST1 activity seems to be responsible for protein degradation. In this case, OST1 could rapidly and transiently regulate gene expression by first activating SNAC1 and then triggering the activated protein for degradation. Additional studies will be required to elucidate the function of ZmSNAC1 in abiotic stress responses.

Moreover, we showed that, in addition to ZmOST1 and other SnRK2s, an SnRK1-like activity could constitutively phosphorylate ZmSNAC1. SnRK1 protein kinases have also been shown to phosphorylate ABFs and both SnRK1 and SnRK2 kinases share targets of phosphorylation [20,63,64]. For these reasons, we cannot rule out that SnRK1 may also regulate SNAC1 activity together or alternately to ZmOST1.

The current model of ABA signalling mechanism reconstructed *in vitro* suggests that, in the absence of the hormone, the clade A protein phosphatases 2C inhibit OST1 activity by binding to its kinase catalytic site as well as to the ABA box, an acidic motif of \sim 25 amino acids at the C-terminus of the kinase [49]. ABA triggers the pathway by binding to the PYL receptor, and the changes in the PYL conformation then allows it to insert its “proline gate” domain into the catalytic site of the phosphatase [50]. This dislodges the kinase but without dissociating the two proteins completely, as the kinase remains tethered by its ABA box to the phosphatase [50]. The attached protein kinase-phosphatase pair is thought to provide a rapidly reversible phospho-relay in regulating the on/off state of the ABA signalling pathway. *In vivo*, however, the association of the PP2C and SnRK2 (particularly OST1) can also be labile, because the complex can only be recovered after treatment of the total soluble protein extract from *Arabidopsis* by chemical cross-linkers [65] or transient over-

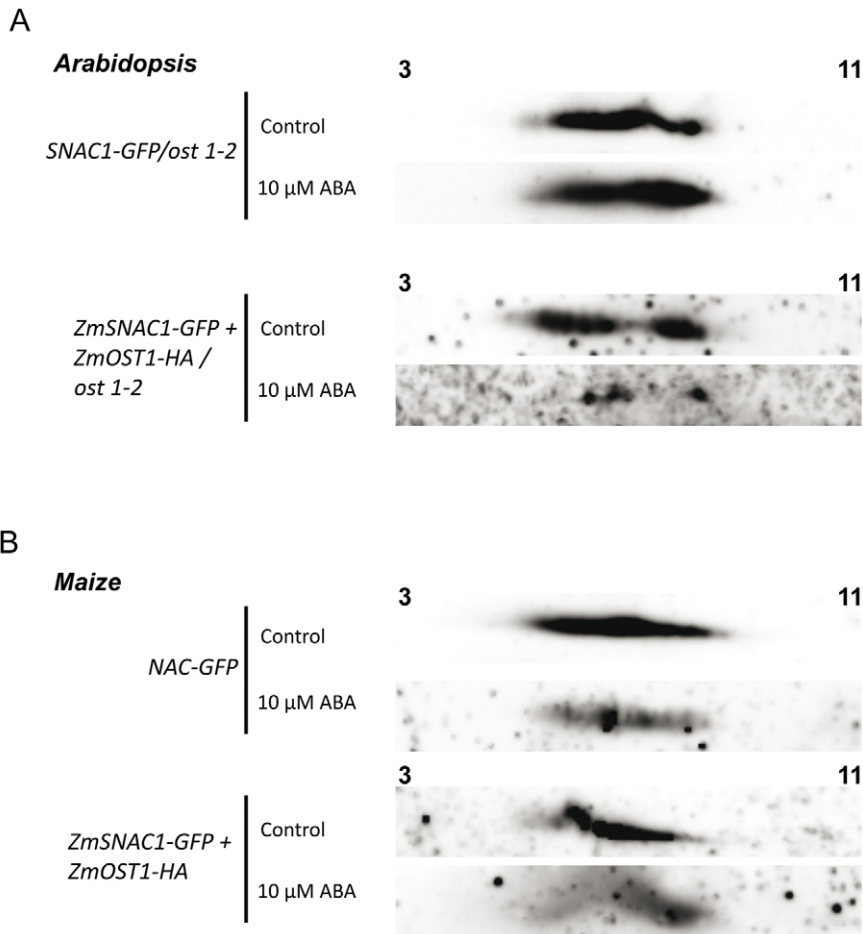


Figure 7. ZmOST1 alters ZmSNAC1 protein stability under ABA treatment. ZmSNAC1 phosphorylation and protein stability was analyzed by bi-dimensional gel electrophoresis followed by western blot. (A) Arabidopsis *ost1-2* mutant and (B) Maize B73 protoplasts transfected with ZmSNAC1-GFP alone or with ZmOST1-HA. Upper western blot corresponds to control situations the lower corresponds to 30 min 10 μ M ABA treatment. doi:10.1371/journal.pone.0058105.g007

expression of the two proteins in tobacco [66,67]. Our current results could explain this labile interaction between the PP2C and OST1 during signalling. If the ABA box [49] is also the contact site for kinase substrates, complete dissociation of PP2C-SnRK would be possible from SNAC1 competition. This may be one mechanism by which the ABA signalling cascade can be sustained for long-term transcriptional reprogramming in guard cells, as opposed to rapid responses from ion transport.

ZmSNAC1 action could then be regulated by controlled degradation under ABA treatment by ZmOST1 mediated phosphorylation. In fact, enhancement of proteasome degradation of multiple factors by signal-induced phosphorylation has been already demonstrated [68,69] and the proteolysis via the 26S proteasome of critical regulators of other plant hormones has been established in the case of gibberellins [70], auxin [71], and jasmonate [72] which made some authors speculate that one or more proteins of the ABA receptor-signal complex and its downstream targets might be regulated by proteolysis [73]. After ZmSNAC1 degradation, ZmOST1 would be free to return to its repressed or on/off association with PP2C phosphatases.

Recent data showed that ZmSNAC1 and the rice homologs, *O_sNAC5* and *O_sNAC6*, highly induced by abiotic stresses are important for stress tolerance acquisition [38,39,74,75]. Furthermore, over-expression of the homolog, *O_sSNAC1*, enhances

drought and salt tolerance in transgenic rice [35]. Importantly, over-expressing of SNAC1 did not engender phenotypic changes or yield penalty [35], which are important considerations for agronomic applications. The identity between rice and maize SNAC1 proteins suggests an evolutionarily conserved functional role in the transcriptional control of stomatal response although further experiments are necessary to demonstrate whether enhanced expression of *ZmSNAC1* would also augment drought tolerance in maize without undesirable phenotypic alterations.

Materials and Methods

Ethics statement

N/A – No animal trials were conducted in this paper. Antibody production was outsourced as a service to CID-CSIC.

Plant material

Arabidopsis plants were maintained in controlled growth chambers ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h:8 h light:dark photoperiod). Seeds were germinated in medium containing 1 \times MS basal salt mixture supplemented with 0.05% MES and 1% sucrose. Seeds were incubated at 4°C for 3 days to break dormancy prior to germination. ABA treatment was carried out at 100 μM . The

akin10 Arabidopsis overexpression and RNAi lines were kindly provided by Dr. Elena Baena [53].

Full-length ZmOST1 cDNAs isolation

A phagemid cDNA library constructed from poly(A)⁺ RNA maize water-stressed leaves was screened by filter hybridization under high-stringency conditions, using a [α -³²P]-labelled partial probe corresponding to the *ZmOST1* gene (ACG36261).

ZmOST1 polyclonal antiserum production

The recombinant ZmOST1 and ABA-box (325–366 aa) proteins fused to a six histidine tag (6×His) in their amino terminal region were expressed and purified according to the pET manual (Novagen). Purified ZmOST1 fusion protein was used to produce polyclonal antisera by an external service (CID-CSIC). Detection of ZmOST1 fused protein was estimated with a dot blot analysis on nitrocellulose membranes.

Immunoprecipitation experiments

Arabidopsis proteins were extracted in 50 mM HEPES pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM DTT, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 50 mM β -glycerolphosphate, 1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, 2 μ g/ml Aprotinin and 10 μ g/ml Pepstatin and cleared twice by centrifugation at 13000 rpm at 4°C for 15 min. *Arabidopsis* (500 μ g) extracts were incubated with a 1:100 dilution of the ABA-box (325–366 aa) antiserum in 300 μ l of IP buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 10 mM β -glycerolphosphate, 150 mM NaCl, 0.5% [v/v] Triton X-100, 0.5% [v/v] Nonidet NP40, 1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, 2 μ g/ml Aprotinin and 10 μ g/ml Pepstatin). After 3 h in a rotary shaker, 40 μ l of protein A-Sepharose CL-4B 50% slurry (GE Healthcare) was added and incubated for another hour. The slurry was washed 3×15 min with IP buffer and the supernatant was removed prior to the in gel kinase assay.

In-gel kinase assay

Protein samples were separated on 10% SDS-PAGE gels embedded with 0.25 mg/ml MBP as substrate. In gel kinase assay was performed according to [10]. Gels were washed with 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0.5 mg/ml BSA and 0.1% Triton X-100 for 3×30 min at room temperature, and proteins were renatured with 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄ and 5 mM NaF for 2×30 min and 16 h at 4°C. Kinase activity was assayed in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 0.1 mM Na₃VO₄, 12 mM MgCl₂, 250 nM cold ATP and 100 μ Ci [γ -³³P]-ATP at room temperature for 1 h. Finally, gels were washed extensively with 5% [w/v] TCA, 1% Na₂PPi solution at least five times and dried. Radioactivity was detected using a Storm 820 imager (GE Healthcare). For ZmSNAC1 kinase assay, 0.5 mg/ml of HIS-tagged protein were embedded in the SDS-PAGE gels and 40 μ g of maize and *Arabidopsis* extracts were loaded for each lane.

Transgenic *Arabidopsis* plants generation and analyses

Full-length *ZmOST1* cDNA was amplified by PCR using oligonucleotides 5'-CCGAATTCATGG-CAGGGCCGCGCCG-3' and 5'-GGCTCGAGTCA-CATTGCGTATAACAATCTCAC-3'. The PCR product was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), digested BamHI/XhoI and subcloned into the pBinAr vector under the CaMV 35S promoter. This construct was used to transform by floral dip infiltration using *Agrobacterium tumefaciens* (C₅₈C₁) wild

type (Ler) and *Arabidopsis ost1-2* mutant plants [6]. Transgenic seedlings selection was performed in 0.5× MS solid medium supplemented with 1% sucrose, 0.5 g/l MES and 50 mg/l kanamycin at 21°C under a long-day photoperiod. Five 35S::*ZmOST1/ost1-2* homozygous transgenic lines per construct and genetic background were analysed for transgene expression by reverse transcription PCR (RT-PCR) with similar *ZmOST1* expression results opting for lines 211 and 287 for further analyses. The inserted *ZmOST1* transgene was amplified with oligonucleotides 5'-GTAAGAACGTGCGATTTCAGTG-3' and 5'-TAT-CATGCGATCATAGGCGTC-3'. Water-loss experiments were only performed with *ZmOST1* overexpression in the *ost1-2* allele due to the lack of expression obtained in transgenic lines overexpressing *ZmOST1* in the wild-type background (data not shown).

Water-loss measurements were performed with 2 weeks-old *Arabidopsis* plants grown routinely on soil. For each genotype, three rosettes were detached and weighted during 3 h in intervals of 10 min. Water loss was calculated as percentage of weight at the indicated times in relation to the initial fresh weight. Thermal images of *Arabidopsis* leaves were taken using a Thermacam PM250 infrared camera (Inframetrics) 5 min after they were detached from 1 week old plantlets grown in a phytotron at 21°C under a long-day photoperiod and 70% relative humidity [76].

Yeast two-hybrid screening and *in vitro* pull-down experiments

Full-length *ZmOST1* cDNA was amplified by PCR and subcloned into the vector pGBT7 (Clontech). A maize cDNA library from 5-day-old leaves water-stressed for 3 h was constructed using the activation domain expression vector pAD-GAL4 [77] (Stratagene). pGBT7-ZmOST1 construct was transformed directly into *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain. Yeast expressing ZmOST1 protein was retransformed with the pAD-GAL4-cDNA maize library, as previously described [77,78]. For yeast interaction experiments ZmSNAC1 was cloned in the vector pGAD424. β -galactosidase liquid assays were performed as described by [79]. For pull-down experiments, *ZmOST1* cDNA was cloned into pGEX4T (GE Healthcare) and *ZmSNAC1* cDNA into the pET28a (Promega) expression vectors. Binding assays were performed with equal amounts of GST proteins and 20–30 μ l of ³⁵S-labeled ZmSNAC1 protein synthesized using the TNT-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega), in 180 μ l of binding buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.2% NP-40). Binding reactions were rolled overnight at 4°C, and washed four times with 1 ml of RIPA buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.2% NP-40]. The beads were boiled for 1 min in sample buffer and aliquots examined by electrophoresis as described by [80].

GFP localization and BiFC by confocal microscopy

Full-length *ZmOST1* and *ZmSNAC1* cDNAs were cloned in the PC1302 vector (Clontech) and in the GATEWAY-compatible vector pENTRY3C (Invitrogen). A point mutated G40R ZmOST1 protein and different ZmOST1 protein domains corresponding to the catalytic-osmotic region (1–289 aa), the regulatory domain (290–366 aa), the osmotic SnRK2 box (290–325 aa) and the ABA box (325–366 aa) were also cloned in pENTRY3C vector. The six pENTRY3C plasmids were transferred to pYFN43 and pYFC43 BiFC GATEWAY-modified vectors described in <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php> to produce 35S::YC-ZmOST1; 35S::YC-ZmOST1 [G40R]; 35S::YC-ZmOST1 [1–289];

35S::YC-ZmOST1 [290–366]; 35S::YC-ZmOST1 [290–325]; 35S::YN-ZmOST1 [325–366] and 35S::YC-ZmSNAC1. *Nicotiana benthamiana* plants were transiently transfected with these constructs. For the co-infiltration, equal volumes of the three *Agrobacterium* cultures (the two truncated YFP constructs; and the strain expressing the HcPro protein) were mixed [81]. Confocal observations were performed 3 days after infiltration.

In vitro phosphorylation

cDNA fragments encoding for ZmOST1, ZmSNAC1, and three ZmSNAC1 derivatives corresponding to A, B and C domains (1–100; 101–170; 171–312 aa, respectively) were cloned into the pET28a expression vector (Promega), expressed in *Escherichia coli* BL21 cells and purified as His-tag fusion proteins according to the manufacturers' instructions. Purified *E. coli*-expressed ZmOST1 (500 ng) were incubated at 30°C for 30 min with either 500 ng of purified ZmSNAC1 or of the truncated A, B and C domains in a final 15 µl volume of 1X kinase buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaF, 125 mM β-glycerolphosphate), 25 µM cold ATP and 5 µCi [γ -³³P]-ATP). Relative ³³P incorporation was analyzed using the image analysis program ImageJ.

Transient expression assays using maize and *Arabidopsis* leaf protoplasts

Transient expression of maize protoplasts was performed as previously described [82] with some modifications. Protoplasts from 11 to 13 days old etiolated maize seedlings were obtained from kernels of B73 plants. After chopping second or third leaves into small pieces, leaf stripes were digested in 3% cellulase onozuka R10, 0.6% macerozyme R10 (Yakult Honsha Co.), 0.6 M mannitol, 10 mM MES, pH 5.7, 5 mM CaCl₂, and 0.1% (w/v) BSA for 15 min under vacuum followed by 150 min gentle shaking at 50 rpm in the dark at 28°C. After releasing the protoplasts at 90 rpm for 30 min, the protoplasts were filtered through a 35-mm nylon mesh and collected by centrifugation. The protoplasts were washed twice in 0.6 M mannitol, 5 mM MES, pH 5.7, and 10 mM KCl and counted with a hemocytometer. Electroporation was performed on 1–2×10⁵ protoplasts per transformation with 20 µg of plasmid DNA (100 V/cm, 200 µF) with a Biorad Gene Pulser II, high capacitance. After electroporation, protoplasts were incubated for 24 h in the dark at room temperature prior to analysis.

Transient gene expression on *Arabidopsis* mesophyll protoplast was performed according to the Sheen lab protocol [83] on well-expanded leaves from 3-week-old *Arabidopsis* plants grown on short day conditions (8 h light:16 h dark).

Treatment of maize and *Arabidopsis* protoplast was performed for 30 minutes by adding 10 µM ABA.

Bi-dimensional gel electrophoresis

For two dimensional gel electrophoresis, transfected protoplasts were solubilised in 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 4% Triton X-100, 18 mM Tris-HCl pH 8 in the presence of 53 u/ml DNase I, 4.9 u/ml RNaseA, 1 mM PMSF, 50 µM leupeptin, 1 µM pepstatin, 10 µM E-64 and 10 µg/ml aprotinin and cleared by centrifugation at 13000 rpm at 4°C for 5 min.

Total protein (60 µg) was diluted in rehydration solution (8 M Urea, 18 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4% w/v CHAPS, 0.5% v/v IPG buffer (pH 3–11), 1.6% v/v DeStreak Reagent (GE Healthcare) and 0.002% w/v Bromophenol Blue) and loaded onto 7 cm IPG strips (NL pH 3–11) (GE Healthcare). Strips were rehydrated for 6 h at room temperature, followed by 6.5 h at 30 V. IEF was

performed at 500 V (1 h), 1000 V (1 h) and 8000 V (7 h) using the Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). Prior to second dimension, strips were equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% v/v SDS, a trace of Bromophenol Blue and 10 mg/mL DTT (15 min), followed by a second equilibration step (25 mg/mL iodoacetamide, 15 min). For the second dimension, proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels. Western blot was performed as indicated previously using the Living Colors A. v. Monoclonal JL-8 GFP antibody (Clontech).

Supporting Information

Figure S1 ZmOST1 is the maize homolog of the *Arabidopsis* OST1 and the rice SAPK8. ZmOST1 shares 83% identity with OST1 and 95% identity with SAPK8 indicating a potential conserved function on drought and osmotic stress response, namely at the level of stomata. (TIF)

Figure S2 ZmOST1 is constitutively expressed in maize. (A) ZmOST1 expression of maize seeds collected at 14, 16, 20, 30, 40 and 60 days after pollination (dap) and seedlings at 1, 2 days after imbibition (dai). ZmOST1 expression is analyzed by Northern-blot experiments using RAB17 and ethidium bromide-stained ribosomal (18S) RNA genes as controls for ABA level and loading, respectively (B) ZmOST1 expression of maize seedlings in response to ABA, drought, NaCl and mannitol treatments. (TIF)

Figure S3 The G40R mutation of ZmOST1 renders the kinase inactive. In vitro phosphorylation of MBP by ZmOST1 and ZmOST1 (G40R) reveals that the mutated kinase is unable to auto-phosphorylate or trans-phosphorylate MBP. (TIF)

Figure S4 Phosphorylation of ZmSNAC1 by AKIN10. In gel kinase assay with proteins extracted from seedlings of wild-type (Ler), 35S::AKIN10-HA (OX2) and AKIN10-RNAi (RNAi7) transgenic lines (Baena-González et al., 2007) using ZmSNAC1 as substrate. Sizes of activity bands are shown on the left. The 60 Kd band probably represents the kinase activities of the endogenous AKIN10 and the closely related AKIN11, kinases with a similar MW of approximately 60 Kd (Zhang et al., 2009). A strong band of activity of about 66 Kd is obtained in extracts from 35S::AKIN10-HA seedlings suggesting that AKIN10 is likely to phosphorylate ZmSNAC1 protein *in vivo* together with other kinases (45 Kd activity band; asterisk). (TIF)

Table S1 Predicted ZmOST1 phosphorylation loci on the ZmSNAC1 sequence using the web based bioinformatics tool Predikin. Two putative peptides are found on SNAC1-A, one on SNAC1-B and 12 on SNAC1-C. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Alejandro Ferrando for kindly providing the BiFC GATEWAY-modified vectors. *p35S::HcPro* was kindly provided by Dr. Juanjo Lopez-Moya.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BV AM-C MP VL. Performed the experiments: BV AM-C AR. Analyzed the data: BV AM-C JL VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: JL. Wrote the paper: BV JL MP VL.

References

- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225–236.
- Droillard M, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett* 527: 43–50.
- Franz S, Ehlert B, Liese A, Kurth J, Cazale AC, et al. (2011) Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 4: 83–96.
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, et al. (2002) ABA-Activated SnRK2 Protein Kinase is Required for Dehydration Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 43: 1473–1483.
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300–303.
- Mustilli AC, 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: 3089–3099.
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10183–10187.
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 41758–41766.
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T (2004) Differential Activation of the Rice Sucrose Nonfermenting1-Related Protein Kinase2 Family by Hyperosmotic Stress and Abscisic Acid. *Plant Cell* 16: 1163–1177.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 485–494.
- Fujii H, Zhu JK (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8380–8385.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 985–989.
- Huai J, Wang M, He J, Zheng J, Dong Z, et al. (2008) Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Rep* 27: 1861–1868.
- Ying S, Zhang DF, Li HY, Liu YH, Shi YS, et al. (2011) Cloning and characterization of a maize SnRK2 protein kinase gene confers enhanced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 30: 1683–1699.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, et al. (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21425–21430.
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21419–21424.
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, et al. (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62: 442–453.
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, et al. (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal* 424: 439–448.
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, et al. (2009) Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* 583: 2982–2986.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, et al. (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1988–1993.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, et al. (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 Cell Physiol* 50: 1345–1363.
- Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, et al. (2010) The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS ONE* 5: e13935.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, et al. (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 J* 61: 672–685.
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* 130: 837–846.
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J (2011) Abscisic acid signal off the STARting block. *Mol Plant* 4: 562–580.
- Roelfsema MR, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* 167: 665–691.
- Blatt MR (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 221–241.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, et al. (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16: 596–615.
- Wang RS, Pandey S, Li S, Gookin TE, Zhao Z, et al. (2011) Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of *Arabidopsis* guard cells. *BMC Genomics* 12: 216.
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* 124: 509–525.
- Golldack D, Lukić I, Yang O (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep* 30: 1383–1391.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221–227.
- Xue GP, Loveridge CW (2004) HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant J* 37: 326–339.
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* 1819: 97–103.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, et al. (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12987–12992.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, et al. (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 67: 169–181.
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, et al. (2010) Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol* 153: 185–197.
- Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, et al. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J* 51: 617–630.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, et al. (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics* 284: 173–183.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R (2010) Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2.8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 5: e16041.
- Xue GP, Way HM, Richardson T, Drenth J, Joyce PA, et al. (2011) Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Mol Plant* 4: 697–712.
- Lu M, Ying S, Zhang DF, Shi YS, Song YC, et al. A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*.
- Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E (2008) Nuclear localization of the mutant protein phosphatase abil is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 54: 806–819.
- Weinthal D, Tzfira T (2009) Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends Plant Sci* 14: 59–63.
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, et al. (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 419–427.
- Walter R, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, et al. (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428–438.
- Belin C, de Franco PO, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter JM, et al. (2006) Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol* 141: 1316–1327.
- Vlad F, Turk BE, Peynot P, Leung J, Merlot S (2008) A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant J* 55: 104–117.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, et al. (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 281: 5310–5318.
- Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, et al. (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* 335: 85–88.
- Ellis JJ, Kobe B (2011) Predicting Protein Kinase Specificity: Predikin Update and Performance in the DREAM4 Challenge. *PLoS One* 6: e21169.
- Tsai AY, Gazzarrini S (2012) AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 809–821.

53. Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938–942.
54. Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15: 395–401.
55. Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, et al. (2010) Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant and Cell Physiology* 51: 1821–1839.
56. Kulik A, Wawer I, Krzywinska E, Buchold M, Dobrowolska G (2011) SnRK2 protein kinases – key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS* 15: 859–872.
57. Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, et al. (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature advance online publication*.
58. Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, et al. (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.
59. Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071.
60. Kim MJ, Park MJ, Seo PJ, Song JS, Kim HJ, et al. (2012) Controlled nuclear import of the transcription factor NTL6 reveals a cytoplasmic role of SnRK2.8 in the drought-stress response. *Biochem J* 448: 353–363.
61. Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL (2011) News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 547–553.
62. Yang J, Matsumoto Y, Etoh T, Iwai S (2008) Nitric oxide (NO)-dependent and NO-independent signaling pathways act in ABA-inhibition of stomatal opening. *Plant Signal Behav* 3: 131–132.
63. Zhang Y, Andralojc PJ, Hey SJ, Primavesi LF, Specht M, et al. (2008) Arabidopsis sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 and calcium-dependent protein kinase phosphorylate conserved target sites in ABA response element binding proteins. *Ann Appl Biol* 153: 401–409.
64. Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, et al. (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* 44: 939–949.
65. Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, et al. (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 3170–3184.
66. Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* 24: 1695–1708.
67. Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park S-Y, Wang A, et al. (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 61: 290–299.
68. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology* 18: 621–663.
69. Kato T, Delhase M, Hoffmann A, Karin M (2003) CK2 Is a C-Terminal I β B Kinase Responsible for NF- κ B Activation during the UV Response. *Molecular cell* 12: 829–839.
70. Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, et al. (2006) Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 18: 3399–3414.
71. Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441–445.
72. Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, et al. (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666–671.
73. Klingler JP, Batelli G, Zhu JK (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot* 61: 3199–3210.
74. Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, et al. (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 10: 239–247.
75. Song SY, Chen Y, Chen J, Dai XY, Zhang WH (2011) Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* 234: 331–345.
76. Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, et al. (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *Plant J* 30: 601–609.
77. Kizis D, Pages M (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* 30: 679–689.
78. Lumberras V, Alba MM, Kleinow T, Konz C, Pages M (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep* 2: 55–60.
79. Bhalerao RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, et al. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5322–5327.
80. Jimenez G, Paroush Ze, Ish-Horowitz D (1997) Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes Dev* 11: 3072–3082.
81. Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voimnet O (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16: 1235–1250.
82. Morohashi K, Casas MI, Ferreyra LF, Mejia-Guerra MK, Pourcel L, et al. (2012) A genome-wide regulatory framework identifies maize pericarp color1 controlled genes. *Plant Cell* 24: 2745–2764.
83. Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protocols* 2: 1565–1572.

ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase1 Signaling in *Arabidopsis*^{CIW}

Américo Rodrigues,^{a,b,1} Mattia Adamo,^{a,1} Pierre Crozet,^{a,1} Leonor Margalha,^a Ana Confraria,^a Cláudia Martinho,^a Alexandre Elias,^a Agnese Rabissi,^c Victoria Lumbreras,^c Miguel González-Guzmán,^d Regina Antoni,^d Pedro L. Rodriguez,^d and Elena Baena-González^{a,2}

^aInstituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

^bInstituto Politécnico de Leiria, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, 2411-901 Peniche, Portugal

^cCentre for Research in Agricultural Genomics, Bellaterra, Cerdanyola del Vallés, 08193 Barcelona, Spain

^dInstituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain

ORCID IDs: 0000-0002-5293-5583 (A.R.); 0000-0001-6598-3579 (E.B.-G.).

Plant survival under environmental stress requires the integration of multiple signaling pathways into a coordinated response, but the molecular mechanisms underlying this integration are poorly understood. Stress-derived energy deprivation activates the Snf1-related protein kinases1 (SnRK1s), triggering a vast transcriptional and metabolic reprogramming that restores homeostasis and promotes tolerance to adverse conditions. Here, we show that two clade A type 2C protein phosphatases (PP2Cs), established repressors of the abscisic acid (ABA) hormonal pathway, interact with the SnRK1 catalytic subunit causing its dephosphorylation and inactivation. Accordingly, SnRK1 repression is abrogated in double and quadruple *pp2c* knockout mutants, provoking, similarly to SnRK1 overexpression, sugar hypersensitivity during early seedling development. Reporter gene assays and SnRK1 target gene expression analyses further demonstrate that PP2C inhibition by ABA results in SnRK1 activation, promoting SnRK1 signaling during stress and once the energy deficit subsides. Consistent with this, SnRK1 and ABA induce largely overlapping transcriptional responses. Hence, the PP2C hub allows the coordinated activation of ABA and energy signaling, strengthening the stress response through the cooperation of two key and complementary pathways.

INTRODUCTION

Changes in water and nutrient availability, soil salinity, and extreme temperatures, among others, generate signals in plants that need to be finely integrated with metabolic activity and development for optimal growth and survival (Smith and Stitt, 2007). One such signal is energy deficiency derived from impaired carbon assimilation and/or respiration in situations of stress, which triggers the activation of the SnRK1 protein kinases to restore homeostasis and elaborate adequate longer term responses through a vast metabolic and transcriptional reprogramming (Radchuk et al., 2006; Schwachtje et al., 2006; Baena-González et al., 2007; Baena-González and Sheen, 2008; Lee et al., 2009). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes 38 SnRKs, of which three, SnRK1.1 (KIN10/AKIN10), SnRK1.2 (KIN11/AKIN11), and SnRK1.3 (KIN12/AKIN12), represent the orthologs of the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) sucrose-nonfermenting1 (Snf1) and mammalian AMP-activated protein kinase (AMPK) metabolic sensors (Halford et al., 2003; Polge and Thomas, 2007;

Hardie, 2011). An increasing body of evidence suggests that SnRK1s act as convergence points for various metabolic, hormonal and stress signals during growth and development, linking it to key hormonal pathways and in particular to abscisic acid (ABA; Németh et al., 1998; Bhalerao et al., 1999; Bradford et al., 2003; Radchuk et al., 2006; Baena-González et al., 2007; Lu et al., 2007; Rosnoblet et al., 2007; Ananieva et al., 2008; Baena-González and Sheen, 2008; Lee et al., 2008; Jossier et al., 2009; Radchuk et al., 2010; Coello et al., 2012; Tsai and Gazzarrini, 2012). SnRK1 is a heterotrimeric complex composed of an α -catalytic subunit (SnRK1.1/1.2/1.3 in *Arabidopsis*) and two regulatory subunits, β and γ (Polge and Thomas, 2007). Similarly to its mammalian and yeast counterparts, SnRK1 activity requires phosphorylation of a highly conserved T-loop residue (T175 in SnRK1.1) (Estruch et al., 1992; Hawley et al., 1996; Stein et al., 2000; McCartney and Schmidt, 2001; Baena-González et al., 2007; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). Under normal energy conditions in mammalian cells, MgATP is bound to the γ -subunit of the AMPK complex resulting, through the joint action of the constitutively active upstream liver kinase B1 and the still unknown upstream phosphatase, in a basal T-loop phosphorylation: dephosphorylation cycle with no net AMPK activation (Hardie, 2011). Under energy deficiency conditions, the replacement of MgATP by AMP/ADP triggers a conformational change that promotes AMPK phosphorylation and, most importantly, protects AMPK from dephosphorylation by rendering it a poor substrate for phosphatases (Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). Despite the rate of dephosphorylation being a primary determinant of AMPK

¹ These authors contributed equally to this work.

² Address correspondence to ebaena@igc.gulbenkian.pt.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Elena Baena-González (ebaena@igc.gulbenkian.pt).

Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.114066

activity, the identity of the AMPK phosphatase(s) remains unclear and may differ between tissues and conditions of cell stimulation (Steinberg and Kemp, 2009; Carling et al., 2012). In budding yeast, Reg1, a regulatory subunit of the type 1 protein phosphatase Glc7, interacts with Snf1 and is required to maintain Snf1 in an inactive state during growth on Glc (Sanz et al., 2000; Hong et al., 2005). The metabolic signal underlying Snf1 regulation remained enigmatic for a long time, but recent work demonstrated that Snf1 is also regulated by ADP at the substrate level, preventing its dephosphorylation by phosphatases (Mayer et al., 2011). In plants, SnAK1/2 (also called Geminivirus Rep interacting kinase 2/1) have been identified as upstream SnRK1 kinases (Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010), but the phosphatases responsible for resetting SnRK1 signaling are unknown.

In *Arabidopsis*, at least seven of the nine type 2C protein phosphatases (PP2Cs) from clade A (Schweighofer et al., 2004) act as negative regulators of the ABA pathway (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Leonhardt et al., 2004; Saez et al., 2004, 2006; Kuhn et al., 2006; Yoshida et al., 2006; Nishimura et al., 2007; Rubio et al., 2009; Antoni et al., 2012) through their interaction with SnRK2s, more divergent members of the SnRK family and specific to plants (Halford et al., 2003; Cutler et al., 2010). *Arabidopsis* contains 10 SnRK2s, of which three, SnRK2.2/2.3/2.6, are specifically activated by ABA and play a central role in the ABA pathway (Gómez-Cadenas et al., 1999; Li et al., 2000; Mustilli et al., 2002; Boudsocq et al., 2004, 2006; Yoshida et al., 2006; Fujii et al., 2007, 2009). Clade A PP2Cs regulate SnRK2.2/2.3/2.6 through physical obstruction and direct dephosphorylation of a conserved Ser residue in the T-loop (S175 in SnRK2.6) (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009; Soon et al., 2012). In the presence of ABA, the Pyrabactin Resistance1/Pyrabactin Resistance1-Like (PYL)/Regulatory Components of ABA Receptors family of ABA receptors (hereafter PYL) inhibit PP2Cs, resulting in SnRK2 activation and downstream gene expression (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Soon et al., 2012).

Considering that clade A PP2Cs, through interaction with a wide array of targets, act as a regulatory hub for different abiotic stress responses (Sheen, 1996; Chérel et al., 2002; Guo et al., 2002; Himmelbach et al., 2002; Ohta et al., 2003; Miao et al., 2006; Yang et al., 2006; Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009; Geiger et al., 2010) and taking into account the role of SnRK1 as a convergence point for multiple types of stress (Baena-González et al., 2007), we postulated that clade A PP2Cs might function as SnRK1 phosphatases. An additional hint came from data mining on a high-throughput proteomics screen for yellow fluorescent protein (YFP)-ABI1-interacting proteins, which inadvertently identified SnRK1s as putative ABI1-interacting proteins (Nishimura et al., 2010) (see below).

Here, we provide molecular, genetic, and physiological evidence for the role of two clade A PP2Cs, ABI1 and PP2CA, as negative regulators of SnRK1 signaling in *Arabidopsis* through their direct interaction with the SnRK1 α -catalytic subunit, its dephosphorylation, and subsequent inactivation, hence contributing to resetting SnRK1 signaling upon the remittance of stress. In contrast, PP2C inhibition allows ABA to promote SnRK1 activity, potentiating the stress response through the interplay of two complementary pathways and providing an explanation for the extensive genetic interactions reported between ABA and sugar signaling (Rolland et al., 2006).

RESULTS

ABI1 and PP2CA Interact with the SnRK1 Catalytic Subunit

A high-throughput screen using green fluorescent protein (GFP)-affinity purification and mass-spectrometric analyses was performed by Nishimura and colleagues to identify proteins interacting with YFP-ABI1 (Nishimura et al., 2010). Data mining of their results revealed the presence of peptides corresponding to both SnRK1s in several of their replicate experiments with YFP-ABI1 (SnRK1.1 in experiments 1, 3, and 8 and SnRK1.2 in experiments 1 and 3), whereas neither of the two SnRK1s was identified in any of the YFP control experiments.

As a first step to validate these data and investigate the possible regulation of SnRK1 by clade A PP2Cs, we tested in yeast two-hybrid (Y2H) assays the interaction between the SnRK1 catalytic subunit and ABI1 or PP2CA, representative members of the two clade A branches in the PP2C family (Schweighofer et al., 2004). SnRK1.1 interacted with ABI1 and PP2CA in yeast cells, and deletion of its regulatory domain (RD) abolished this interaction (Figure 1A; see Supplemental Figure 1A online). The N terminus harbors the kinase catalytic domain (CD), whereas the C terminus harbors the RD that binds the β - and γ -subunits (Polge and Thomas, 2007). The SnRK1 RD contains a subdomain of unknown function, the kinase-associated1 (KA1) domain, that was reported in the SnRK3.11/Salt Overly Sensitive2 (SOS2) protein kinase to closely superimpose on the protein phosphatase interaction domain (Sánchez-Barrena et al., 2007), a docking site for the clade A PP2C ABI2 (Ohta et al., 2003). Modeling SnRK1.1 with the structures resolved for the KA1 domain in SnRK3.11 (Sánchez-Barrena et al., 2007), the AMPK-related microtubule-affinity-regulating kinase3 (Tochio et al., 2006), and for AMPK α (Xiao et al., 2011), revealed that in SnRK1.1, this subdomain spans residues 390 to 512 (see Supplemental Figure 2 online). As shown, the KA1 domain was both required and sufficient for the interaction with the phosphatase (Figure 1A). Nevertheless, colony growth when using the KA1 domain alone was weaker than with SnRK1.1-RD or the full-length protein, suggesting that other regions may play a role in the PP2C interaction.

To further validate the Y2H data, we performed an in vitro pull-down assay (Figure 1B). Purified recombinant His-SnRK1.1-CD or His-SnRK1.1-RD was incubated with glutathione S-transferase (GST)-PP2CA, GST, or the beads and the interacting proteins were pulled down using a glutathione-agarose matrix. SnRK1.1-RD was recovered only when using GST-PP2CA as bait. In the case of SnRK1.1-CD, a fivefold enrichment was observed when using GST-PP2CA compared with GST alone, suggesting that even though not detected in the Y2H assay, PP2Cs interact also to some degree with the SnRK1.1-CD. No SnRK1-RD or SnRK1.1-CD was recovered from the beads alone. To determine whether a SnRK1.1-PP2C interaction occurs also in planta, SnRK1.1 was transiently coexpressed in *Arabidopsis* protoplasts with control DNA or with a plasmid expressing ABI1-hemagglutinin (HA). Immunoprecipitation with an anti-HA antibody revealed a specific interaction between SnRK1.1 and ABI1-HA (Figure 1C), demonstrating that ABI1 also interacts with SnRK1.1 in vivo.

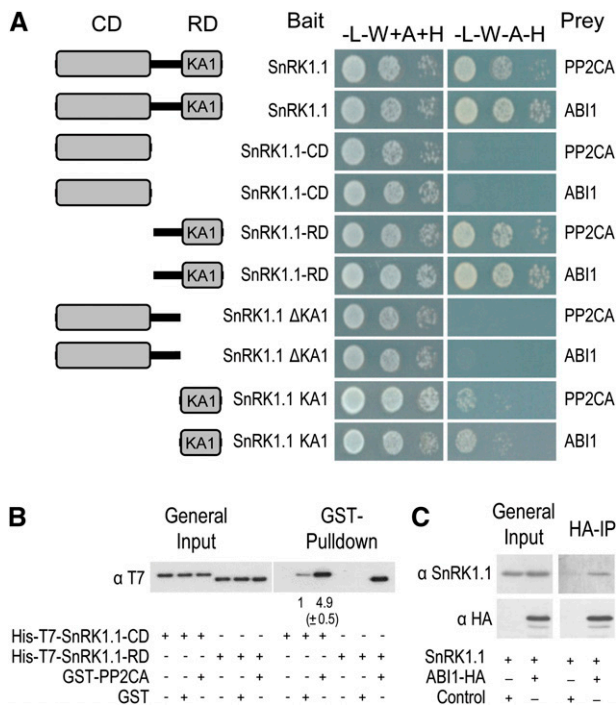


Figure 1. ABI1 and PP2CA Interact with SnRK1.1 in Vitro and in Vivo.

(A) SnRK1.1 interacts with ABI1 and PP2CA in Y2H assays. Protein interaction was determined by growth assay in medium lacking Leu, Trp, adenine and His (-L-W-A-H) compared with control medium lacking Leu and Trp but supplemented with adenine and His (-L-W+A+H).

(B) In vitro interaction between GST-PP2CA and His-T7-SnRK1.1 detected by GST pull down and T7 immunodetection of SnRK1.1 preys. Numbers below immunoblot denote band intensities compared with GST-alone control (=1); values represent means \pm SD ($n = 3$).

(C) HA immunoprecipitation pulls down SnRK1.1 from protoplasts co-expressing SnRK1.1 (untagged) with ABI1-HA, but not with control DNA. [See online article for color version of this figure.]

ABI1 and PP2CA Dephosphorylate and Inactivate SnRK1.1

To evaluate whether the detected PP2C-SnRK1.1 interaction results in SnRK1.1 dephosphorylation and inactivation, we immunoprecipitated SnRK1.1 from plants overexpressing an HA-tagged version (35S:SnRK1.1-HA) (Baena-González et al., 2007) and treated with recombinant His-PP2CA. PP2CA treatment caused a clear dephosphorylation of SnRK1.1, as assessed by a faster mobility in a Phos-Tag SDS-PAGE that selectively retards phosphorylated proteins (Kinoshita et al., 2009) (Figure 2A). To investigate the effect of this dephosphorylation on SnRK1 activity, we performed in vitro kinase assays. In agreement with previous reports, active SnRK1.1 could efficiently autophosphorylate and phosphorylate the Abscisic acid responsive elements-Binding Factor2 (ABF2) transcription factor in vitro (Bhalerao et al., 1999; Zhang et al., 2008; Shen et al., 2009) (Figure 2B, lane 1). No ABF2 phosphorylation could be observed in control HA pull downs from wild-type (WT) plants, confirming that the measured activity corresponds to SnRK1-HA (see Supplemental Figure 3A online). Addition of PP2CA to the reaction caused a substantial decrease

in the phosphorylation of both SnRK1.1 and ABF2 (Figure 2B, lane 2). The PYL receptors inhibit clade A PP2Cs in the presence of ABA, resulting in SnRK2 activation (Fujii et al., 2009; Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Adding the PYL4 receptor in the absence of ABA did not change the ability of PP2CA to inactivate SnRK1

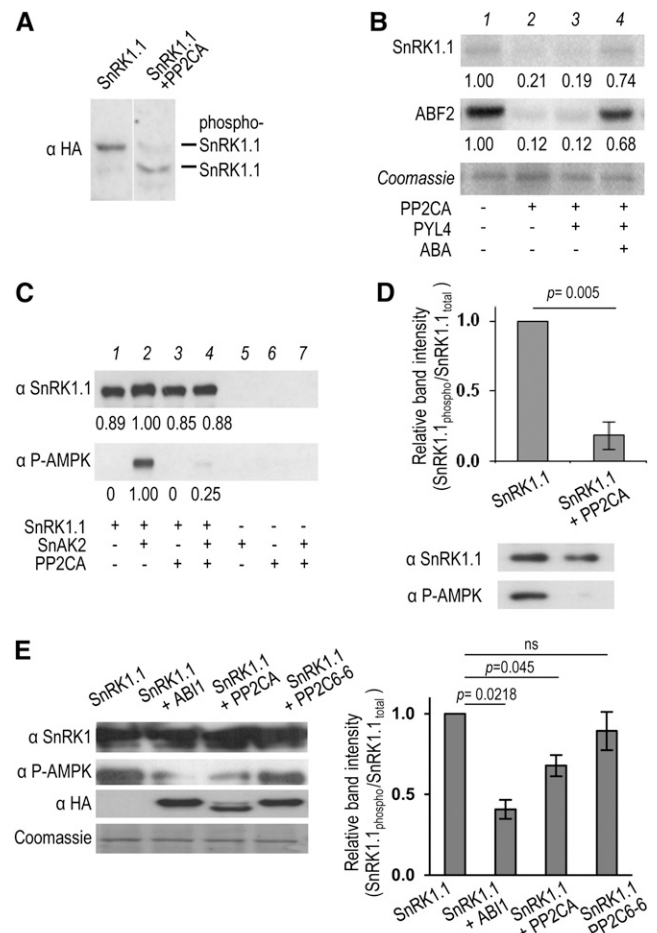


Figure 2. ABI1 and PP2CA Inhibit SnRK1.1 by Dephosphorylation.

Immunoprecipitated SnRK1.1-HA is dephosphorylated **(A)** and inactivated **(B)** in vitro by PP2CA.

(A) HA immunoblot following Phos-Tag-SDS-PAGE (Kinoshita et al., 2009). **(B)** Autoradiograms showing that SnRK1.1 activity on itself and ABF2 (lane 1) is lost following His-PP2CA-treatment (lane 2) but rescued by PYL4 and ABA (lane 4). GST-PP2CA dephosphorylates T175 in recombinant SnRK1.1, phosphorylated or not with SnAK2 **(C)**, and in immunoprecipitated SnRK1.1 ($n = 3$) **(D)** in vitro. Numbers below autoradiograms and immunoblots denote band intensities relative to SnRK1.1 control (=1). At least three independent experiments were performed in **(A)** to **(C)** with similar results.

(E) Coexpression in protoplasts of SnRK1.1 with clade A PP2Cs ABI1 and PP2CA, but not with clade E PP2C6-6, results in SnRK1.1(T175) dephosphorylation. PP2Cs and SnRK1.1 bear HA and GFP tags, respectively. SnRK1.1(T175) phosphorylation was detected by immunodetection with anti-phospho-AMPK α (T172) antibodies ($n = 6$). Error bars = SE; P values, two-tailed paired Student's t test **(D)** and one-way ANOVA with Tukey test **(E)** on the nonnormalized ratio of SnRK1.1(T175) phosphorylation relative to total SnRK1.1.

(Figure 2B, lane 3), whereas in the presence of ABA, PYL4 fully blocked SnRK1.1 inactivation by PP2CA (Figure 2B, lane 4). To rule out the possibility that decreased ABF2 phosphorylation in the presence of PP2CA results from direct ABF2 dephosphorylation by PP2CA rather than from lower SnRK1 activity, SnRK1.1 was preincubated with PP2CA and PYL4 in the absence (PP2CA active) or presence (PP2CA inactive) of ABA (see Supplemental Figure 3B, lanes 2 and 3, online). Following this incubation, ABA was added to block further PP2CA action before the addition of ABF2. Preincubation of SnRK1 with PP2CA in the absence of ABA resulted in undetectable SnRK1 activity and ABF2 phosphorylation, suggesting that the effect of PP2CA on ABF2 phosphorylation was at least partly due to a reduction in SnRK1 activity rather than to a direct dephosphorylation of ABF2 by the phosphatase.

SnRK1 requires phosphorylation of the T-loop T175 residue for activity (Baena-González et al., 2007; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). To test whether T175 could be a substrate for ABI1 and PP2CA, we first performed *in vitro* dephosphorylation experiments. Recombinant SnRK1.1 is not phosphorylated and hence is barely active but it can be strongly activated by the upstream kinases SnAK1/2 through the specific phosphorylation of T175 (Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). GST-PP2CA treatment of recombinant GST-SnRK1.1, prephosphorylated with GST-SnAK2, resulted in significant T175 dephosphorylation, as detected with an anti-phospho-AMPK α (T172) (T172) antibody (Sugden et al., 1999; Baena-González et al., 2007) (Figure 2C) that specifically recognizes SnRK1.1 and SnRK1.2 phosphorylated in the T-loop (T175 for SnRK1.1; see Supplemental Figure 4 online). A similar effect was observed when SnRK1.1 was immunoprecipitated from *35S:SnRK1.1-HA* plants and treated with GST-PP2CA (Figure 2D), altogether showing that T175 is efficiently dephosphorylated by PP2Cs *in vitro*.

To determine whether T175 is a PP2C substrate *in vivo*, we used *Arabidopsis* mesophyll protoplasts to transiently express SnRK1.1-GFP alone or in combination with various PP2Cs. As shown in Figure 2E, coexpression of SnRK1.1-GFP with either ABI1 or PP2CA (from clade A) resulted in a significant reduction in T175 phosphorylation levels, while coexpression with the unrelated PP2C6-6 from clade E (Schweighofer et al., 2004) did not have an impact on T175 phosphorylation. These results suggest that T175 is a substrate for ABI1 and PP2CA also *in vivo*.

ABI1 and PP2CA Repress SnRK1 Signaling

To further explore the functional implications of SnRK1 regulation by PP2Cs, we employed a transient cell-based assay that uses luciferase (LUC) induction from the *DIN6:LUC* reporter as a read-out of SnRK1 activity (Baena-González et al., 2007). In transfected mesophyll protoplasts, SnRK1.1 overexpression is sufficient to induce strong LUC activity under control conditions (Figure 3A) (Baena-González et al., 2007). Coexpression with the ABI1 or PP2CA phosphatases reduced SnRK1.1-mediated *DIN6:LUC* induction by 60% without affecting SnRK1.1 levels (Figure 3A). Importantly, the ability of these phosphatases to repress reporter gene induction by SnRK1.1 was strongly diminished in the corresponding catalytically inactive variants (ABI1_D177A and PP2CA_D142A; Figure 3A), suggesting that repression of SnRK1

signaling by ABI1 and PP2CA occurs to a large extent through dephosphorylation. As a negative control, coexpression with the unrelated PP2C6-6 from clade E (Schweighofer et al., 2004) had no significant effect on the ability of SnRK1.1 to induce the reporter (Figure 3B), altogether supporting the specific repressive role of ABI1 and PP2CA on the SnRK1 pathway.

To investigate the influence of ABI1, PP2CA, and other clade A PP2Cs on endogenous SnRK1 signaling, we treated detached *Arabidopsis* leaves of the wild type, the double *abi1-2 pp2ca-1* (Rubio et al., 2009), and two different quadruple *pp2c* knockout mutants (*hai1-1 pp2ca-1 hab1-1 abi1-2*, hereafter *Qhai1-1*; *abi2-2 pp2ca-1 hab1-1 abi1-2*, hereafter *Qabi2-2*; see Supplemental Figure 5 online; Antoni et al., 2013) under control (3 h of light [L]), activating (3 h of darkness [D]) and inactivating conditions (3 h of darkness followed by 1 h of darkness in 50 mM Glc [DG]), and analyzed SnRK1 target gene expression (Baena-González et al., 2007) by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Exposure to darkness triggered a strong induction of SnRK1 target genes in all genotypes (Figure 3C), in agreement with the current view that the conformation adopted by AMPK and Snf1 under conditions of low energy renders the kinases resistant to phosphatase action (Mayer et al., 2011; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). In marked contrast, SnRK1 inactivation in response to subsequent Glc addition was deficient in *abi1-2 pp2ca-1* plants (for *DIN6*) and completely blocked in the quadruple *pp2c* mutants (Figure 3C), demonstrating that clade A PP2Cs are essential components for the poststress inactivation of SnRK1 signaling.

In agreement with previous work (Baena-González et al., 2007), and despite the clear effect of PP2Cs on SnRK1 signaling under L, D, and DG conditions, analyses of total protein extracts of wild-type and *Qabi2* leaves revealed no clear differences with regard to T175 phosphorylation or total SnRK1 activity (Figures 3D and 3E). This suggests that subtle changes in SnRK1 phosphorylation and activity are sufficient to trigger significant downstream effects in gene expression, and that neither immunodetection with phospho-AMPK α (T172) antibodies nor SnRK1 kinase assays on total cellular SnRK1 are sensitive enough to monitor these changes.

Altered Sugar Responses in *pp2c* Mutants

High concentrations of sugars (6% Glc, ~330 mM) induce a developmental arrest characterized, for instance, by repression of cotyledon greening and expansion (Rolland et al., 2006). Wild-type seedlings grow well on plates containing 4% Glc but cotyledon greening and expansion are clearly impaired on higher sugar concentrations (Figure 4). Such adverse conditions trigger SnRK1 activation, leading to sugar hypersensitivity in *35S:SnRK1.1* seedlings (Jossier et al., 2009) (Figure 4). The *abi1-2 pp2ca-1* double mutant displays Glc hypersensitivity visible only in 6% Glc, but this is markedly enhanced in the quadruple *pp2c* mutants, which exhibit a clear phenotype in 4% Glc (Figure 4). Even though the ABA hypersensitivity of these mutants (see Supplemental Figure 5 online) renders them more sensitive to increased osmolarity in the 4% sorbitol control plates (Antoni et al., 2012), a clear impact on development can be observed on 4% Glc plates. In 6% sorbitol and Glc plates, the growth of these mutants is so compromised that a distinction between osmotic and sugar effects is not possible. Consistent with the loss-of-function

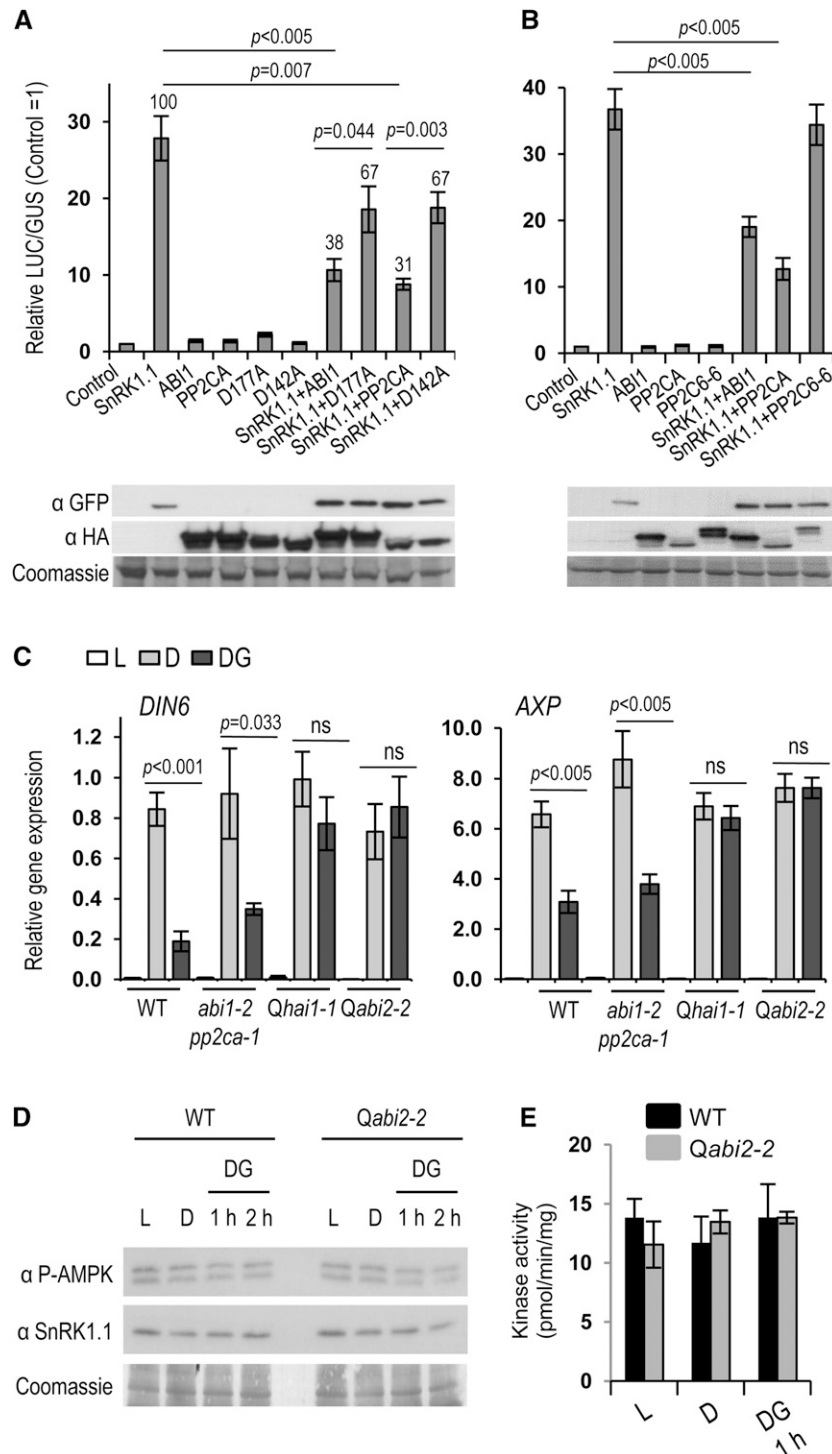


Figure 3. ABI1 and PP2CA Repress SnRK1 Signaling.

(A) SnRK1.1 activity, measured as the induction of the *DIN6:LUC* reporter in protoplasts is severely reduced by clade A PP2Cs ABI1 and PP2CA, but to a much lesser extent by the corresponding catalytically inactive mutants ABI1_D177A and PP2CA_D142A ($n = 9$). Numbers above columns designate the percentage of SnRK1.1 inhibition as compared with 100% activity in the absence of PP2Cs.

(B) An unrelated clade E PP2C6-6 does not impinge on SnRK1.1 activity ($n = 8$).

(C) Reduced SnRK1 inactivation in double and quadruple *pp2c* knockout mutants *Qhai1-1* and *Qabi2-2*. Relative gene expression of SnRK1.1 marker genes (*DIN6*, *AXP*) in control (L), activating (D), and inactivating (DG) conditions ($n = 4$). P values, one-way ANOVA with Tukey **(A)** and **(B)** and two-way

phenotype, plants overexpressing PP2CA are sugar insensitive (Figure 4), altogether genetically supporting the role of PP2Cs as negative regulators of SnRK1 signaling.

ABA Promotes SnRK1 Signaling via PP2Cs

We next wanted to assess whether PP2C regulation of the SnRK1 pathway could allow ABA to modulate SnRK1 activity. The transient coexpression of PYL receptors with ABI1 in ABA-treated mesophyll protoplasts is enough to efficiently repress ABI1 action and to trigger the activation of an ABA signaling reporter (Fujii et al., 2009). Similarly, coexpression of ABI1 with PYL4 in the presence of ABA fully restored SnRK1.1 ability to induce the *DIN6:LUC* reporter in protoplasts (Figure 5A), presumably through ABI1 sequestration in the ABA-PYL-PP2C ternary complex. We observed an overall twofold increase in LUC activity when comparing mock- and ABA-treated samples (see Supplemental Figure 6 online), further suggesting that ABA can induce SnRK1 signaling. To further explore this possibility and to examine the effect of ABA on other SnRK1 target genes (Baena-González et al., 2007), we treated *Arabidopsis* leaf discs with or without ABA (100 μ M) for 5 h and quantified downstream gene expression changes by qualitative qRT-PCR. ABA treatment did activate SnRK1, albeit to an extent 1 order of magnitude lower than that triggered by darkness (Figure 5B). Most importantly, the impact of ABA on SnRK1 target genes was reduced in plants overexpressing PP2CA (35S:PP2CA; Figure 5C) (Antoni et al., 2012), indicating that the effect of ABA on SnRK1 activity is *via* PP2C inhibition. To investigate this connection at the whole genome level, we compared the transcriptional profile associated with SnRK1.1 activation in protoplasts (Baena-González et al., 2007) with that of seedlings treated with ABA (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, AtGenExpress Consortium; Nemhauser et al., 2006). Despite differences in tissue type and developmental stage in the two data sets, there was a significant overlap between the transcriptional changes triggered by SnRK1.1 and by ABA (Figure 5D; see Supplemental Data Set 1 online). More than 22 and 28% of the total number of genes upregulated and downregulated by SnRK1.1, respectively, were similarly regulated by ABA, in marked contrast with the negligible overlap with other hormone treatments or when comparing genes oppositely regulated in the SnRK1.1 and ABA data sets (see Supplemental Figure 7 online). Despite the wide impact of both SnRK1 and ABA on the transcriptome, the probability of obtaining such an overlap of similarly regulated genes by chance is very low (hypergeometric test, $P < 9.2^{-42}$).

We next analyzed SnRK1 target gene expression in wild-type leaf discs subjected to ABA at the beginning of the dark treatment to test the combined effect of ABA and energy stress or 2 h prior to

Glc addition to test the impact of ABA on the sugar-induced inactivation of SnRK1. Addition of ABA enhanced SnRK1 activation by darkness (Figure 5E, samples *D*, and *DA*). Moreover, adding ABA prior to Glc diminished SnRK1 inactivation in response to sugar (Figure 5E, samples *DG* and *DGA*). Collectively, these results show that ABA positively regulates SnRK1 signaling by inhibiting clade A PP2Cs, thereby promoting SnRK1 signaling during stress and once energy deficiency remits.

DISCUSSION

Despite the central role of SnRK1 kinases in the plant stress response, the regulatory mechanisms underlying SnRK1 function are poorly understood. We have demonstrated here that ABI1 and PP2CA are bona fide SnRK1 phosphatases that contribute to resetting SnRK1 activity upon restoration of energy levels and that allow ABA to induce and potentiate SnRK1 signaling during stress (Figure 6). Although our results indicate that several clade A PP2Cs, including ABI1 and PP2CA, are important for SnRK1 regulation, this may not be true for all members of this clade. Furthermore, even though clade E PP2C6-6 had no significant impact on SnRK1 phosphorylation and signaling (Figures 2E and 3B), we cannot exclude the possibility that other PP2Cs regulate SnRK1 in other tissues or under different conditions. A clear interaction of SnRK1.1 with ABI1 and PP2CA was observed both *in vitro* and *in vivo* (Figure 1), demonstrating that PP2Cs act through direct binding to the SnRK1 α -catalytic subunit, probably using the C-terminal RD of SnRK1 as a docking site, albeit interacting also with the catalytic region that harbors the T175 target residue. Based on Y2H experiments, the KA1 domain of SnRK1 may play a key role in the PP2C-SnRK1 interaction (Figure 1A). As previously noted (Sánchez-Barrena et al., 2007), the KA1 domain can be closely superimposed on the phosphatase interaction domain of SOS2/SnRK3.11 and, given its presence also in the related AMPK and microtubule-affinity regulating kinase 3 kinases, has been suggested to represent an ancient highly conserved scaffold for interaction with PP2Cs (Sánchez-Barrena et al., 2007) (see Supplemental Figure 2 online). SnRK2.2/2.3/2.6 also require their C-terminal region, namely the ABA box, for PP2C binding (Vlad et al., 2009; Soon et al., 2012), and additional regions of interaction exist within the N-terminal CD (Soon et al., 2012), some of which, such as the T-loop and the α G helix, correspond to conserved features of the protein kinase canonical fold (Hanks and Hunter, 1995) (see Supplemental Figure 2 online). Our *in vitro* pull-down assays suggested that the SnRK1.1-PP2CA interaction may not solely rely on the SnRK1 RD and that similarly to SnRK2s, some parts of the CD may also play a role in this interaction (Figure 1B). Interestingly, a high-throughput screen for

Figure 3. (continued).

ANOVA with Sidak test (**C**). Error bars = SE. Analyses of SnRK1(T175) phosphorylation (**D**) and SnRK1 activity (**E**) from total cellular extracts reveal no differences in various conditions and between wild-type and *Qabi2-2* mutant plants.

(**D**) SnRK1.1(T175) phosphorylation was detected by immunodetection with anti-phospho-AMPK α (T172) antibodies at the indicated time points. (**E**) SnRK1 activity was measured using SnRK1 immunoprecipitated from wild-type or *Qabi2-2* leaves using the AMARA peptide assay. Values represent means \pm SD ($n = 2$).

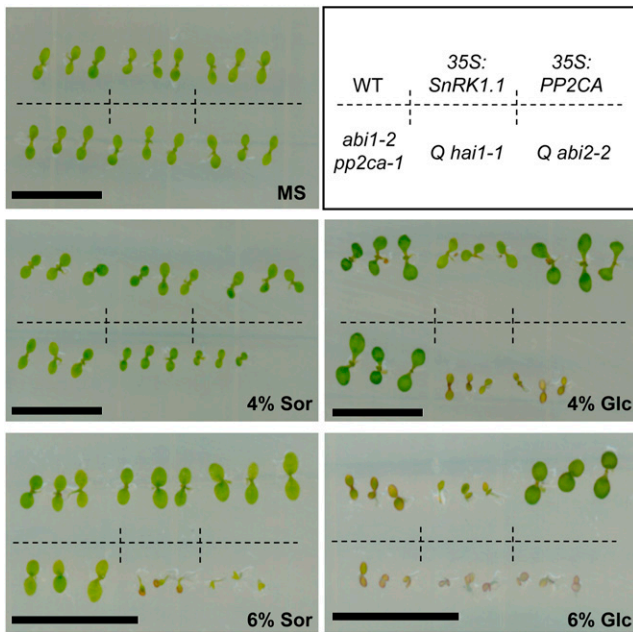


Figure 4. Altered Glc Response in *pp2c* Knockout Mutants and PP2C Overexpressors.

Glc hypersensitivity of SnRK1.1 overexpressors (*35S:SnRK1.1*; 4–6% glc), double (*abi1-2 pp2ca-1*; 6% glc) and quadruple *pp2c* knockout mutants (*Qhai1-1* and *Qabi2-2*; 4% glc), and Glc insensitivity of PP2CA overexpressors (*35S:PP2CA*; 6% glc) in early seedling development. Sor, sorbitol osmotic control; MS, control media without Glc or sorbitol. Bar = 1 cm.

YFP-ABI1 interactors employing affinity purification and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry identified SnRK1s as candidate ABI1-interacting proteins, whereas peptides corresponding to SnRK2.6 were not retrieved and the ABI1–SnRK2.6 interaction could only be confirmed by coimmunoprecipitation of the transiently overexpressed proteins in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) (Nishimura et al., 2010).

As an outcome of the interaction with ABI1 and PP2CA, SnRK1 is dephosphorylated and inactivated (Figures 2 and 3). Nevertheless, disruption of the catalytic site in the ABI1_D177A and PP2CA_D142A mutants did not fully restore SnRK1 activity (Figure 3A), suggesting that, although dephosphorylation plays a major role in SnRK1 inactivation, physical blockage may, similarly to SnRK2s (Soon et al., 2012), also be important for SnRK1 repression. The mechanism of action also may differ between the various PP2Cs, as suggested by the fact that despite having a lower impact on SnRK1(T175) phosphorylation (Figure 2E), PP2CA had a consistently stronger effect than ABI1 on SnRK1 signaling (Figure 3A). Given that the SnRK1 RD is the major region of interaction with PP2Cs (Figure 1) and that this region is responsible for binding the regulatory subunits (Bhalerao et al., 1999; Kleinow et al., 2000), it is plausible that PP2C binding affects SnRK1 activity also by interfering with trimer formation.

PP2CA was able to efficiently dephosphorylate T175 *in vitro* and *in vivo* (Figure 2), consistent with the *in vitro* dephosphorylation of this residue by mammalian PP2C (Sugden et al.,

1999). Nevertheless, despite the clear differences in gene expression observed between control, inducing, and inactivating conditions and between the wild-type and *Qabi2-2* leaves (Figure 3C), we were unable to detect differences in T175 phosphorylation or SnRK1 activity in these conditions in the endogenous SnRK1 (Figures 3D and 3E), suggesting that the relatively short treatment times employed result in subtle changes in kinase

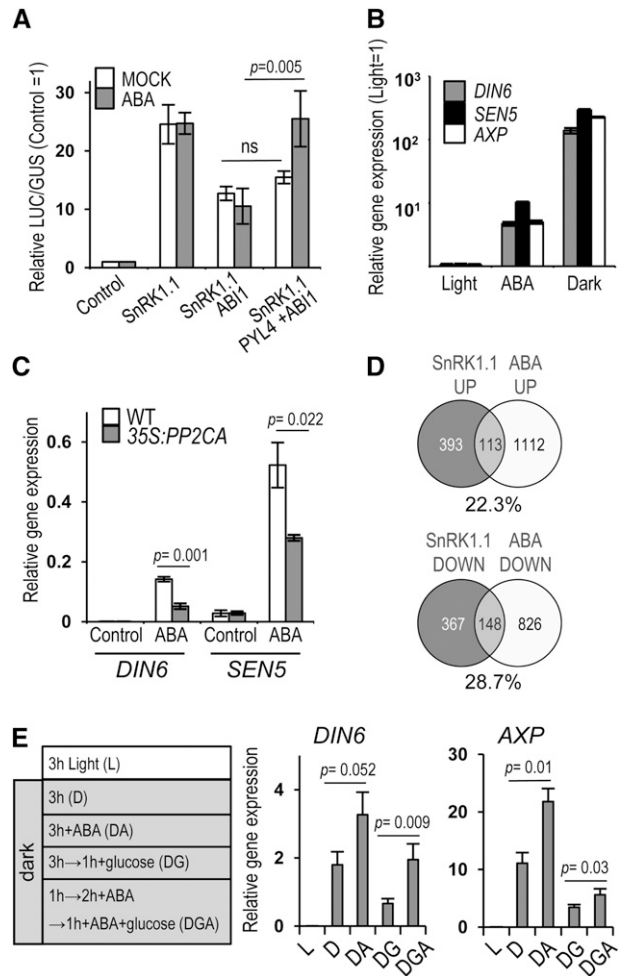


Figure 5. ABA Promotes SnRK1 signaling.

(A) PP2C repression of SnRK1 signaling in protoplasts is blocked by coexpression of the PYL4 receptor in the presence of ABA ($n = 3$).

(B) Induction of SnRK1 target genes by ABA ($n = 10$) and energy stress (D; $n = 12$).

(C) Reduced induction of SnRK1 target genes by ABA in *35S:PP2CA* plants ($n = 3$).

(D) SnRK1 activation and ABA treatment induce largely overlapping transcriptional responses. Percentage of upregulated or downregulated SnRK1.1 targets similarly regulated by ABA.

(E) ABA enhances SnRK1 activation by darkness and diminishes its Glc-triggered inactivation. SnRK1 target gene expression in L, DA, or D. Following dark activation, SnRK1 repression triggered by Glc was examined with (DGA) or without (DG) ABA pretreatment ($n = 4$). Error bars = SE. P values, two-way ANOVA with Fisher's least significant difference test. *DIN6*, *SEN5*, *AXP*, SnRK1, target genes.

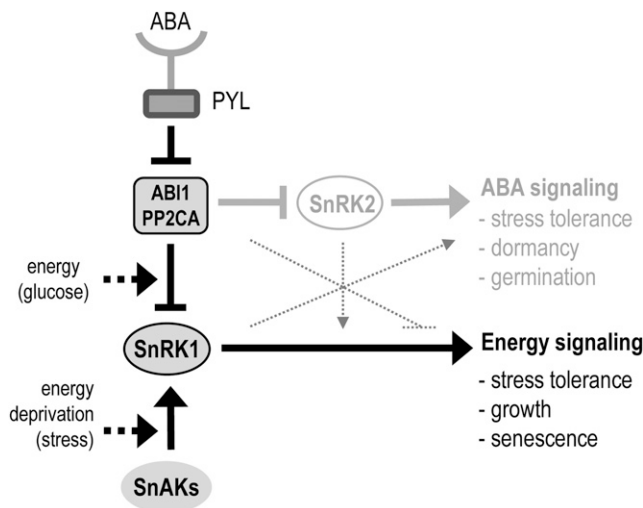


Figure 6. SnRK1 Regulation by Energy Signals and ABA through ABI1 and PP2CA.

SnRK1 is activated by the energy deficiency triggered by stress and is inactivated by ABI1 and PP2CA once normal energy levels are restored. These PP2Cs repress also SnRK2s and ABA signaling but are inhibited by PYL receptors upon ABA binding. Via its effect on PP2Cs, the ABA-PYL complex induces SnRK1 signaling, potentiating the effect of energy stress, diminishing the effect of sugar on SnRK1 repression, and complementing the ABA response. The SnRK1 and ABA pathways are likely to undergo crosstalk also at other levels (dotted lines). SnAK, SnRK1-activating kinases.

phosphorylation and activity that are not possible to detect with the phospho-AMPK α (T172) antibodies or the kinase activity assays from total cellular SnRK1.1. Indeed, a much longer (24-h) starvation treatment of rice suspension cells resulted in mild (1.9-fold) differences in SnRK1 activity, as measured with the SAMS peptide (Lu et al., 2007). These results are in agreement with the view on cellular enzyme cascades in which slight changes in enzyme activity may trigger significant downstream effects by amplifying the signal (Chock et al., 1980). More sensitive and quantitative techniques like Mass Western (Lehmann et al., 2008) and/or the enrichment of specific SnRK1 subcellular pools may be required for accurately assessing changes in SnRK1 T-loop phosphorylation and activity in response to stress and nutrient signals.

Our results employing reporter gene assays and gene expression analyses in the wild type, *pp2c* knockout mutants, and PP2CA overexpressors show that PP2Cs are negative regulators of SnRK1 signaling (Figures 3 and 4). Transient coexpression of ABI1 and PP2CA with SnRK1 in protoplasts reduced by 60% the ability of SnRK1 to activate gene expression (Figure 3). Using a similar approach, Fujii and colleagues showed that the extent of repression by ABI1 was nearly 100% when coexpressing SnRK2.6 and its downstream ABF2 transcription factor to activate an ABA reporter (Fujii et al., 2009). However, the ability of PP2Cs to repress kinase activity varied depending on the SnRK2 and PP2C combination employed, and in the case of SnRK2.6 and HAB1, the repression was only 30%. Because some clade A PP2Cs have been shown to dephosphorylate ABF2 (Antoni et al.,

2012), it is also possible that the difference in the extent of repression is due to a simultaneous effect of ABI1 on the kinase and on the transcription factor.

Most importantly, constitutive PP2C depletion in the quadruple *pp2c* mutants abrogates SnRK1 inactivation and downstream target gene repression after stress-derived energy deprivation subsides (Figure 3C, *DG* samples). However, the impact of PP2C depletion is less obvious under activating stress conditions (Figure 3C, *D* samples) presumably because, as for AMPK and Snf1 (Mayer et al., 2011; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011), the kinase is protected from dephosphorylation when energy levels are low (Sugden et al., 1999). Similarly to plants overexpressing SnRK1.1, double and quadruple *pp2c* knockout mutants showed varying degrees of a sugar hypersensitive phenotype, while PP2CA overexpressors displayed an opposite phenotype (Figure 4), all consistent with the conclusions from the molecular data that PP2Cs negatively regulate SnRK1.

Our results indicate that the ABA and energy signaling pathways interact through PP2Cs and that ABA can induce SnRK1 signaling through PP2C inhibition (Figure 5). This is in agreement with a recent study reporting enhanced SnRK1 activity in wheat (*Triticum aestivum*) roots in response to ABA (Coello et al., 2012), and provides a molecular explanation for the extensive interactions observed between ABA and sugar signaling in genetic screens (Rolland et al., 2006). SnRK1s were never identified among ABA-activated kinases, most probably because the extent of SnRK1 activation by ABA is 1 order of magnitude lower than that by energy stress (Darkness; Figure 5B), and would probably remain masked by the much stronger activities of SnRK2s. In contrast, these studies relied on in-gel kinase assays for detecting of kinase activities (Yoshida et al., 2002; Furihata et al., 2006; Fujii et al., 2007). Despite our current lack of knowledge regarding the exact subunit composition of functional SnRK1, and despite the fact that the catalytic subunit alone is active (Bhalerao et al., 1999; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010), in vivo SnRK1 most likely operates, similarly to Snf1 and AMPK, as a heterotrimeric complex (Polge and Thomas, 2007; Hedbacker and Carlson, 2008; Hardie, 2011; Ramon et al., 2013), whose dissociation under the denaturing conditions employed in the in-gel kinase assays may result in loss of kinase activity.

In addition to the interaction through PP2Cs, other points of crosstalk are likely to exist between ABA and energy signaling, and SnRK1 may regulate ABA transcription factors, such as ABF2 (Figure 2B) or FUS3 (Zhang et al., 2008; Tsai and Gazzarrini, 2012) that can also be directly dephosphorylated by PP2Cs (Antoni et al., 2012). It is conceivable that aberrant PP2C:SnRK1 ratios as well as the possible PP2C/SnRK1 coregulation of downstream factors could account for the altered ABA sensitivity and ABA-related phenotypes of plants with altered SnRK1 signaling (Radchuk et al., 2006; Lu et al., 2007; Rosnoble et al., 2007; Jossier et al., 2009; Radchuk et al., 2010; Tsai and Gazzarrini, 2012).

We propose a dual role for the regulation of SnRK1 by ABI1 and PP2CA (Figure 6). On one hand, activation of the SnRK1 pathway through alternative signals like ABA, could support the ABA response with a more general one directed toward a metabolic and transcriptional reprogramming to cope with energy deficiency. Activation of SnRK1 by ABA could also serve to prime the SnRK1 system, potentiating a subsequent response to energy imbalance

derived from stress. On the other hand, PP2C regulation appears to be an integral part of the SnRK1 signaling pathway, resetting the system once stress subsides or an energy balance is attained through the appropriate metabolic readjustments. Persistence of ABA under these conditions would in turn promote the maintenance of SnRK1 in an active state, similarly to how elevated interleukin-6 sustains high AMPK activity in skeletal muscle when energy levels are presumably no longer altered after exercise (Ruderman et al., 2006). With this scenario in mind, one could envision that in tissues directly exposed to stress, SnRK1 activation would be mainly dictated by the energy-dependent branch, whereas in distant tissues, this activation could be mediated by ABA. In addition to interleukin-6, AMPK responds to other inflammatory mediators and hormones, but the precise mechanisms underlying this regulation are in most cases unknown (Steinberg and Kemp, 2009; Lim et al., 2010). Interestingly, chronic Tumor Necrosis Factor α treatment in muscle cells suppresses the AMPK pathway by inducing the repressor PP2C (Steinberg et al., 2006), suggesting that a connection between hormone signals and energy signaling through the inhibitory PP2Cs might be conserved in multicellular eukaryotes.

In summary, we have identified ABI1 and PP2CA as upstream phosphatases of SnRK1, uncovering a mechanism through which ABA can stimulate SnRK1 action. Future work to further understand SnRK1 regulation and to unravel the interplay of these two central pathways may offer insight not only into the mechanisms of stress tolerance but also into fundamental developmental processes, such as seed maturation and germination.

METHODS

Primers and Constructs

A list of all primers, cloning steps, and vectors is provided in Supplemental Table 1 online.

Plant Material and Growth Conditions

All used *Arabidopsis thaliana* plants are in the Columbia (Col-0) background, except *35S:SnRK1.1-HA* (Landsberg *erecta*) (Baena-González et al., 2007). The *35S:SnRK1.1 (35S:SnRK1.1-2)* (Jossier et al., 2009), *35S:PP2CA* (Antoni et al., 2012), and *abi1-2 pp2ca-1* (Rubio et al., 2009) lines have been described. Quadruple *pp2c* knockout mutants were generated from *pp2ca-1 hai1-1* (Antoni et al., 2012) and the corresponding triple *pp2c* mutants (Rubio et al., 2009).

Plants were grown in soil under a 12-h-light (100 μ E)/12-h-dark regime. For in vitro culture, sterilized seeds were stratified in the dark at 4°C for 2 days and sowed on plates containing Murashige and Skoog medium with 0.1% MES, 0.8% phytoagar, and Glc (4 or 6%) or sorbitol (4 or 6%). Plates were sealed and incubated at 23°C under continuous light.

Antibodies and Protein Expression Analyses

The SnRK1.1 antibody was purchased from Agriser (anti-AKIN10, AS10919). Phospho-SnRK1.1(T175) was detected with an anti-phospho-AMPK α (T172) antibody (referred to as α P-AMPK; Cell Signaling), which also detects phospho-SnRK1.2(T176) as a lower band (Baena-González et al., 2007). An anti-GST polyclonal antibody (Sigma), anti-HA (Roche), and anti-T7 (Novagen) monoclonal antibodies were used to detect the corresponding tagged proteins.

For analyses of protein expression from protoplast pellets and leaf tissue, the material was directly ground in 2 \times Laemmli solubilization buffer to maintain the phosphorylation status during protein extraction.

Protoplast Transient Expression Assays

Vectors for protoplast transient expression and assays were as described (Yoo et al., 2007), using the UBQ10- β -glucuronidase reporter as transfection efficiency control. For constructs for overexpression of SnRK1.1-GFP, ABI1-HA, PP2CA-HA, PP2C6-6-HA, and FLAG-PYL4, the corresponding coding sequences were cloned into a pHBT95 vector harboring the indicated C- or N-terminal tag. SnRK1 signaling was monitored using a *DIN6:LUC* reporter (Baena-González et al., 2007). ABA and Glc were added to a final concentration of 5 μ M and 30 mM, respectively.

For coimmunoprecipitation assays, untagged SnRK1.1 was expressed with ABI1-HA or mER7 control DNA (Yoo et al., 2007) in 3 mL of protoplasts (6×10^5 cells) under standard conditions.

Frozen cell pellets were lysed in 500 μ L of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, and complete protease inhibitor cocktail [Roche]), 20 mM sodium fluoride, 1 mM orthovanadate, 1/500 (v/v) phosphatase inhibitor 2 (Sigma P044), and 1/500 (v/v) phosphatase inhibitor 3 (Sigma P5726)], incubated at 4°C for 10 min, and diluted to a final volume of 1.5 mL with lysis buffer without Triton X-100. The cleared lysate was incubated with 40 μ L of anti-HA affinity matrix (Roche 11815016001) for 3 h at 4°C. Agarose beads containing immunoprecipitated proteins were washed five times with lysis buffer containing 0.05% Triton, eluted with 4 \times Laemmli solubilization buffer, and analyzed by immunoblotting with an anti-SnRK1.1 antibody.

Recombinant Protein Production

The coding sequence of PP2CA was cloned into pGEX-4T1. Recombinant GST-PP2CA was produced in *Escherichia coli* (BL21:DE3) and purified through S-linked glutathione agarose affinity chromatography as recommended by the manufacturer (Sigma G4510).

N- (residues 1 to 293, CD) and C-terminal (residues 294–512, RD) SnRK1.1 were cloned into pET28a (Novagen). Recombinant proteins were produced in *E. coli* (BL21:DE3) and purified using immobilized metal ion affinity chromatography (TALON, BD Clontech) following the manufacturer's instructions. Successful protein production and purification were verified by immunoblotting with anti-GST and anti-T7 antibodies. Recombinant His-PYL4, His-PP2CA, and His- Δ C ABF2 (residues 1–173) were produced as described by Antoni et al. (2012), and recombinant GST-SnRK1.1 and GST-SnAK2 were produced as described by Crozet et al. (2010).

In Vitro Pull-Down Assays

Proteins (3 μ g of each) were incubated for 1 h at room temperature in 100 μ L of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, and 1/500 [v/v] plant-specific protease inhibitor cocktail [Sigma P9599]), mixed with 30 μ L of glutathione-agarose beads and incubated one more hour. Beads were washed four times with buffer A, and bound proteins were analyzed by immunoblotting using anti-T7 antibodies.

SnRK1.1 Immunoprecipitation, Phosphatase Treatment, and in Vitro Kinase Assays

SnRK1.1 was immunoprecipitated from leaves of *35S:SnRK1.1-HA* plants treated for 1 h in darkness. Plant material (~1 g) was extracted in 3 volumes of 1 \times PBS supplemented with 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, and 1/500 (v/v) plant-specific protease inhibitor cocktail (Sigma). After centrifugation (16,000g, 4°C, 15 min), the supernatant was recovered, and

1 mg of total protein was incubated overnight at 4°C with 30 μ L of anti-HA affinity matrix. The matrix was washed three times with extraction buffer and resuspended in a total volume of 66 μ L of buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 250 mM KCl, 10% glycerol, and 0.1% Tween 20), of which 3 μ L was used for each reaction.

To assess dephosphorylation of immunoprecipitated SnRK1.1 by PP2CA, SnRK1.1 was incubated with His-PP2CA (2 μ g) in a 50- μ L reaction containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, and 1 mM DTT. The reaction was stopped with Laemmli solubilization buffer and analyzed by Phos-Tag SDS-PAGE (50 μ M Phos-Tag ligand [Wako] and 100 μ M MnCl₂) (Kinoshita et al., 2009) and immunoblot with an anti-HA antibody. The Phos-Tag ligand selectively retards phosphorylated proteins. For assessing the effect of PP2CA on T-loop phosphorylation, immunoprecipitated SnRK1.1-HA (5 μ L of beads) was treated or not with GST-PP2CA (1 μ g) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 1/1000 protease inhibitor cocktail (Sigma P9599) at 30°C for 30 min. The beads were then washed twice with the same buffer complemented with 150 mM NaCl and 0.05% Triton X-100. Finally, they were boiled in Laemmli solubilization buffer and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-AMPK α (T172) and anti-SnRK1.1 antibodies.

For *in vitro* kinase assays, immunoprecipitated SnRK1.1 was preincubated (for 10 min) or not with His-PP2CA (0.6 μ g) and His-PYL4 (2.0 μ g) in 30 μ L of kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 20 mM MgCl₂, and 2 mM MnCl₂) \pm ABA (30 μ M) and further incubated with GST- Δ C ABF2 (0.5 μ g) for 1 h at room temperature in the presence of 3.5 μ Ci of [γ -³²P]ATP. The reaction products were resolved in an 8% SDS-PAGE gel, transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore), and detected using a phosphor image system (FLA5100; Fujifilm; Antoni et al., 2012).

For preactivation of SnRK1.1, GST-SnRK1.1 and GST-SnAK2 (1 μ g of each) were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 μ M ATP, 1 mM DTT, and 1/1000 protease inhibitor cocktail (Sigma) at 30°C for 30 min. After adding or not GST-PP2CA (1 μ g), the mix was further incubated for 30 min and analyzed by immunoblot employing anti-phospho-AMPK α (T172) and anti-SnRK1.1 antibodies.

For measurements of endogenous SnRK1 activity, SnRK1.1 was immunoprecipitated from leaves of 4-week-old plants of the indicated genotypes. Plant material (~1 g) was extracted in 2 volumes of Buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100), and complete protease inhibitor cocktail (one tablet/50 mL, Roche) and 1/500 (v/v) phosphatase inhibitor 2 (Sigma P044) and 1/500 (v/v) phosphatase inhibitor 3 (Sigma). After two successive centrifugations (20,000g, 4°C, 10 min), the supernatant was recovered, and 1 mg of total protein was incubated with gentle shaking for 3 h at 4°C with 15- μ L beads of protein A-antibody complex prepared as follows. For each immunoprecipitation, 15 μ L (bed volume) of protein A-agarose (Roche) was equilibrated in 1 \times PBS (Sigma-Aldrich) and incubated with 1.5 μ g of anti-SnRK1.1 antibody in 500 μ L of 1 \times PBS for 1 h at room temperature with gentle shaking. After three washes in buffer C, the beads were used for immunoprecipitation. After the incubation for 3 h at 4°C under shaking, the beads were washed three times with buffer C, and one-third (5 μ L) was kept for immunoblot analysis with an anti-SnRK1.1 antibody.

The remaining 10 μ L was used to determine the specific activity of SnRK1 on the AMARA peptide as described previously (Crozet et al., 2010). Briefly, the beads were incubated for 1 h at 30°C in a kinase assay buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 200 μ M ATP, 1 mM EDTA, and 1/500 anti-protease and anti-phosphatase cocktails), 90 μ M AMARA peptide (AMARAASAAALARRR), and 2 μ Ci [γ -³²P]ATP. Ten microliters of the reaction was spotted three times on P81 filter (GE-Whatman), and the filters were subsequently washed three times for 5 min in 1% phosphoric acid. After a quick wash in acetone, radioactivity was measured using a scintillation counter. A positive control with recombinant SnRK1.1 and SnAK2 was always performed to confirm that the reaction was occurring.

Y2H Assays

Y2H assays were performed as described (Saez et al., 2008). The full-length coding sequence of SnRK1.1 and the various deletions, cloned into pGBKT7, were faced with constructs harboring full-length PP2CA and ABI1 in fusion with the GAL4 activation domain. To generate the GAL4 activation domain-PP2CA fusion, the PP2CA coding sequence was cloned into pGADT7. The pGADT7-ABI1 construct was described previously (Vlad et al., 2010).

Gene Expression Analyses

Fully expanded leaves of 5-week-old plants were used as such or to cut leaf discs (9-mm diameter) and incubated on sterile MilliQ water in Petri dishes. For examining SnRK1 regulation in wild-type and *pp2c* mutants, leaves were incubated for 3 h in L (control; 100 μ E) or D or DG. Unexpected darkness is perceived as stress and activates SnRK1 (Baena-González et al., 2007). For assessing the effect of ABA, leaf discs of wild-type or 35S:PP2CA plants were incubated \pm ABA under light for 5 h. For the effect of ABA on SnRK1 activation by stress and inactivation by sugar, leaf discs of wild-type plants were incubated for 3 h in light (L), in darkness with (DA) or without ABA (D), or for 1 h in darkness followed by 2 h in darkness with ABA and 1 h in darkness with ABA and Glc (DGA). Glc and ABA were added to a final concentration of 50 mM and 100 μ M, respectively.

Following the indicated treatments, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies), treated with RNase-Free DNase (Promega), and reverse transcribed (1.5 μ g) using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). qRT-PCR analyses were performed using a 7900HT fast real-time PCR System (Applied Biosystems) employing the Eva-Green fluorescent stain (Biotium), and the 2^{- Δ CT} or comparative CT method (Livak and Schmittgen, 2001). Expression levels were normalized using the CT values obtained for *EIF4*. Efficient ABA uptake and signaling was confirmed by monitoring the induction of the ABA marker genes *RAB18* and *RD29*.

Microarray Dataset Comparisons

The data set for the SnRK1.1-induced transcriptional profile corresponds to supplemental table 3 in Baena-González et al. (2007). The hormone treatment data sets, as compared in (Nemhauser et al., 2006), are from the *Arabidopsis* AtGenExpress consortium (<http://Arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>). A twofold change filter was applied to all the hormone data sets and, given the 6-h incubation of the SnRK1.1 overexpression data set, only the 3-h (and not the 1-h) time points were considered for the comparisons. Overlap between the compared data sets was revealed using the Venny Venn diagram online application (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). The data set for the SnRK1.1-induced transcriptional profile corresponds to supplemental table 3 in Baena-González et al. (2007). For determining the significance of overlap between the two experiments, hypergeometric testing was applied using the *dhyper* function in R (<http://www.r-project.org/>).

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software. For analyses of qPCR data, the statistical significance of the indicated changes was assessed employing log₂-transformed relative expression values (Rieu and Powers, 2009).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: SnRK1.1, At3g01090; SnRK1.2, At3g29160; ABI1, At4g26080; PP2CA, At3g11410; ABI2, At5g57050; HAB1, At1g72770; HAI1, At5g59220;

PYL4, At2g38310; PP2C6-6, At1g03590; DIN6, At3g47340; SEN5, At3g15450; and AXP, At2g33830.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Y2H Controls for the SnRK1.1 and PP2C Interaction.

Supplemental Figure 2. Alignment and Structural Comparison of SnRK1 and SnRK2.

Supplemental Figure 3. SnRK1.1 Is Inactivated by Recombinant His-PP2CA In Vitro.

Supplemental Figure 4. Specific Detection of Phosphorylated SnRK1.

Supplemental Figure 5. Clade A *pp2c* Quadruple Mutants Are ABA Hypersensitive.

Supplemental Figure 6. ABA Promotes SnRK1 Signaling in Protoplasts.

Supplemental Figure 7. Overlap between Transcriptional Changes Induced by SnRK1.1 and Various Hormone Treatments.

Supplemental Table 1. Primers and Cloning Strategies Used in This Study.

Supplemental Data Set 1. Genes Similarly Regulated by SnRK1.1 and ABA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vera Nunes for plant management, Filip Rolland and Jörg Kudla for comments, and Júlia Costa for help with the scintillation counter. The 35S:SnRK1.1-2 line was provided by Martine Thomas. E.B.-G. was supported by grants from Marie Curie IRG, the EMBO Installation program, Marie Curie Actions FP7-People-2010-ITN, the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT-PTDC/AGR-AAM/104939/2008), and the Portugal-Spain Bilateral Collaboration program Ações integradas (Ação E-26/10). A.C. was supported by SFRH/BPD/47280/2008, C.M. was supported by SFRH/BD/33563/2008, L.M. was supported by SFRH/BD/51627/2011, and P.C. was supported by SFRH/BPD/79255/2011. A. Rabissi was supported by a Generalitat de Catalunya PhD grant (FI-AR067443). P.L.R. was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grants BIO2011-23446 and PT2009-0155), R.A. was supported by the Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas-Consejo Superior de Investigaciones Científicas fellowship, and M.G.-G. was supported by a Juan de la Cierva contract.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A. Rodrigues and E.B.-G. conceived the project. A. Rodrigues, M.A., P.C., P.L.R., and E.B.-G. designed the research. A. Rodrigues, M.A., P.C., L.M., A.C., C.M., A.E., M.G.-G., R.A., A. Rabissi, and E.B.-G. performed the research. A. Rodrigues, M.A., P.C., L.M., A.C., C.M., A.E., M.G.-G., R.A., P.L.R., A. Rabissi, V.L., and E.B.-G. analyzed the data. A. Rodrigues, P.C., P.L.R., and E.B.-G. wrote the article.

Received May 28, 2013; revised September 27, 2013; accepted September 15, 2013; published October 31, 2013.

REFERENCES

- Ananieva, E.A., Gillaspay, G.E., Ely, A., Burnette, R.N., and Erickson, F.L. (2008). Interaction of the WD40 domain of a myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol.* **148**: 1868–1882.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G.A., Fernandez, M.A., De Winne, N., De Jaeger, G., Dietrich, D., Bennett, M.J., and Rodriguez, P.L. (2013). PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol.* **148**: 931–941.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L. (2012). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiol.* **158**: 970–980.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–942.
- Baena-González, E., and Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* **13**: 474–482.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bakó, L., Okrészl, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J., and Koncz, C. (1999). Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5322–5327.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**: 41758–41766.
- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **63**: 491–503.
- Bradford, K.J., Downie, A.B., Gee, O.H., Alvarado, V., Yang, H., and Dahal, P. (2003). Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol.* **132**: 1560–1576.
- Carling, D., Thornton, C., Woods, A., and Sanders, M.J. (2012). AMP-activated protein kinase: New regulation, new roles? *Biochem. J.* **445**: 11–27.
- Chérel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H., and Thibaud, J.B. (2002). Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K+ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**: 1133–1146.
- Chock, P.B., Rhee, S.G., and Stadtman, E.R. (1980). Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 813–843.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumar, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M.A., and Halford, N.G. (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J. Exp. Bot.* **63**: 913–924.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., and Thomas, M. (2010). Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **285**: 12071–12077.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R. (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 651–679.
- Estruch, F., Treitel, M.A., Yang, X., and Carlson, M. (1992). N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* **132**: 639–650.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.K.

- (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**: 660–664.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and 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**: 485–494.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 1988–1993.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T., and Hedrich, R.** (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 8023–8028.
- Gómez-Cadenas, A., Verhey, S.D., Holappa, L.D., Shen, Q., Ho, T.H., and Walker-Simmons, M.K.** (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1767–1772.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N., and Giraudat, J.** (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**: 1897–1910.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U., and Zhu, J.K.** (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **3**: 233–244.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M., and Zhang, Y.** (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* **54**: 467–475.
- Hanks, S.K., and Hunter, T.** (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**: 576–596.
- Hardie, D.G.** (2011). AMP-activated protein kinase: An energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**: 1895–1908.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G.** (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 27879–27887.
- Hedbacker, K., and Carlson, M.** (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.* **13**: 2408–2420.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**: 3029–3038.
- Hong, S.P., Momcilovic, M., and Carlson, M.** (2005). Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J. Biol. Chem.* **280**: 21804–21809.
- Jossier, M., Bouly, J.P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., and Thomas, M.** (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **59**: 316–328.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T.** (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **4**: 1513–1521.
- Kleinow, T., Bhalerao, R., Breuer, F., Umeda, M., Salchert, K., and Koncz, C.** (2000). Functional identification of an *Arabidopsis* snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *Plant J.* **23**: 115–122.
- Kuhn, J.M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M.B., Maktabi, M.H., and Schroeder, J.I.** (2006). The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol.* **140**: 127–139.
- Lee, J.H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.B., Yoon, H.J., Chen, H., He, Y.J., Xiong, Y., and 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**: 152–167.
- Lee, K.W., Chen, P.W., Lu, C.A., Chen, S., Ho, T.H., and Yu, S.M.** (2009). Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci. Signal* **2**: ra61.
- Lehmann, U., Wienkoop, S., Tschöep, H., and Weckwerth, W.** (2008). If the antibody fails—A mass western approach. *Plant J.* **55**: 1039–1046.
- Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and 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**: 596–615.
- Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B., and Assmann, S.M.** (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300–303.
- Lim, C.T., Kola, B., and Korbonits, M.** (2010). AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* **44**: 87–97.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lu, C.A., Lin, C.C., Lee, K.W., Chen, J.L., Huang, L.F., Ho, S.L., Liu, H.J., Hsing, Y.I., and Yu, S.M.** (2007). The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell* **19**: 2484–2499.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**: 1064–1068.
- Mayer, F.V., et al.** (2011). ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **14**: 707–714.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C.** (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* **276**: 36460–36466.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., and Giraudat, J.** (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* **25**: 295–303.
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X.C., Chen, J., Miao, C., and Song, C.P.** (2006). An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **18**: 2749–2766.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and 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**: 3089–3099.
- Németh, K., et al.** (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **12**: 3059–3073.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J.** (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467–475.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., and Schroeder, J.I.** (2010). PYR/PYL/RCAR family

- members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J.* **61**: 290–299.
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T.** (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J.* **50**: 935–949.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E.** (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* **332**: 1433–1435.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., and Zhu, J.K.** (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11771–11776.
- Park, S.Y., et al.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**: 1068–1071.
- Polge, C., and Thomas, M.** (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* **12**: 20–28.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L., and Weber, H.** (2006). Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.* **140**: 263–278.
- Radchuk, R., Emery, R.J., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J.E., Feil, R., Weschke, W., and Weber, H.** (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J.* **61**: 324–338.
- Ramon, M., Ruelens, P., Li, Y., Sheen, J., Geuten, K., and Rolland, F.** (2013). The hybrid four-CBS-domain KINbetagamma-subunit functions as the canonical gamma subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J.* **75**: 11–25.
- Rieu, I., and Powers, S.J.** (2009). Real-time quantitative RT-PCR: Design, calculations, and statistics. *Plant Cell* **21**: 1031–1033.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 675–709.
- Rosnoblet, C., Aubry, C., Leprince, O., Vu, B.L., Rogniaux, H., and Buitink, J.** (2007). The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* **51**: 47–59.
- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., and Rodriguez, P.L.** (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* **150**: 1345–1355.
- Ruderman, N.B., et al.** (2006). Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* **55** (Suppl 2): S48–S54.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., and 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 Physiol.* **141**: 1389–1399.
- Saez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S., and 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**: 2972–2988.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M.P., Nicolas, C., Lorenzo, O., and 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 J.* **37**: 354–369.
- Sánchez-Barrena, M.J., Fujii, H., Angulo, I., Martínez-Ripoll, M., Zhu, J.K., and Albert, A.** (2007). The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Mol. Cell* **26**: 427–435.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., and Carlson, M.** (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1321–1328.
- Schwachtje, J., Minchin, P.E.H., Jahnke, S., van Dongen, J.T., Schittko, U., and Baldwin, I.T.** (2006). SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 12935–12940.
- Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* **9**: 236–243.
- Sheen, J.** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**: 1900–1902.
- Shen, W., Reyes, M.I., and Hanley-Bowdoin, L.** (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol.* **150**: 996–1005.
- Smith, A.M., and Stitt, M.** (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ.* **30**: 1126–1149.
- Soon, F.F., et al.** (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**: 85–88.
- Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., and Carling, D.** (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* **345**: 437–443.
- Steinberg, G.R., and Kemp, B.E.** (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **89**: 1025–1078.
- Steinberg, G.R., et al.** (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* **4**: 465–474.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G., and Hardie, D.G.** (1999). Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* **19**: 433–439.
- Tochio, N., et al.** (2006). Solution structure of the kinase-associated domain 1 of mouse microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 3. *Protein Sci.* **15**: 2534–2543.
- Tsai, A.Y., and Gazzarrini, S.** (2012). AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *Plant J.* **69**: 809–821.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 17588–17593.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Laurière, C., and Merlot, S.** (2009). Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3170–3184.
- Vlad, F., Droillard, M.J., Valot, B., Khaffif, M., Rodrigues, A., Brault, M., Zivy, M., Rodriguez, P.L., Merlot, S., and Laurière, C.** (2010). Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *Plant J.* **63**: 778–790.
- Xiao, B., et al.** (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**: 230–233.
- Yang, Y., Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A., and Grill, E.** (2006). Fibrillin expression is regulated by abscisic

acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6061–6066.

Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**: 1565–1572.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **281**: 5310–5318.

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1473–1483.

Zhang, Y., Andralojc, P.J., Hey, S.J., Primavesi, L.F., Specht, M., Koehler, J., Parry, M.A.J., and Halford, N.G. (2008). Arabidopsis sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 and calcium-dependent protein kinase phosphorylate conserved target sites in ABA response element binding proteins. *Ann. Appl. Biol.* **153**: 401–409.

**ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase1
Signaling in *Arabidopsis***

Américo Rodrigues, Mattia Adamo, Pierre Crozet, Leonor Margalha, Ana Confraria, Cláudia Martinho, Alexandre Elias, Agnese Rabissi, Victoria Lumbreras, Miguel González-Guzmán, Regina Antoni, Pedro L. Rodriguez and Elena Baena-González

Plant Cell 2013;25;3871-3884; originally published online October 31, 2013;
DOI 10.1105/tpc.113.114066

This information is current as of July 7, 2014

| | |
|---------------------------------|---|
| Supplemental Data | http://www.plantcell.org/content/suppl/2013/10/21/tpc.113.114066.DC1.html |
| References | This article cites 90 articles, 52 of which can be accessed free at: http://www.plantcell.org/content/25/10/3871.full.html#ref-list-1 |
| Permissions | https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&issn=1532298X&WT.mc_id=pd_hw1532298X |
| eTOCs | Sign up for eTOCs at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain |
| CiteTrack Alerts | Sign up for CiteTrack Alerts at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain |
| Subscription Information | Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at: http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm |