



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Participación del gen AtCPK1 en la defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos

Beatriz Orosa Puente



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT
BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

BIENNI 2001- 2003

Participación del gen *AtCPK1* en la defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos

Memòria presentada per Beatriz Orosa Puente per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directora

Directora

Tutora

Autora

Dra. María Coca

Dra. Blanca San Segundo

Dra. Motserrat Arró

Beatriz Orosa

Beatriz Orosa Puente
2010



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Participación del gen *AtCPK1* en la defensa de *Arabidopsis thaliana* frente a patógenos



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorcio CSIC-IRTA-UAB, bajo la dirección de la Dra. María Coca y la Dra. Blanca San Segundo.

Beatriz Orosa Puente
2010

Agradecimientos

Según dicen lo importante no es llegar sino el camino recorrido, y si algo sé es que no podría haber hecho este camino sin vuestra ayuda...

A mis directoras de tesis, la Dra. María Coca y la Dra. Blanca San Segundo, que me dieron la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y realizar esta tesis doctoral.

A la Dra. Carmen Conde que me dio la oportunidad de continuar en la investigación cuando aun era una predoc. Gracias por confiar en mí y contagiarme su ilusión por la investigación.

No es que haya sido una buena aprendiz, sino que he tenido a los mejores maestros que además son mis amigos.....

A jordí y Laura, por donde empezar.. si fuese profesional os agradecería enseñarme a trabajar, a ser rigurosa, pero sobre todo me habéis enseñado lo importante que es ser mejor persona . A Mina, me has tratado como una hija, no creas que por estar lejos te voy a olvidar.

A mis niños, durante todo este tiempo hemos compartido tantas cosas.. celebrar cada resultado! pero sobre todos los brindis que fueron necesarios cuando nada parecía ser como debiera. A Anahit, más honesta y generosa que nadie, Hedia, amistad te define y para siempre, Isa eres puro corazón y dulzura, Jorge, siempre dispuesto a ayudarnos y defendernos, Maite, más leal que nadie para lo bueno y lo malo, Nuri eres la más sabia de todos, que habría sido de nosotros sin tus consejos, a Celine que aun en la distancia te preocupas por mí,...

A Nahuel, porque siempre conté con tu apoyo aunque no compartieses mis decisiones, por haber estado en mi vida. A Sergi, rundinalila nunca me dejaste abandonar, gracias por tu amistad incondicional. No tenéis una tesis sino dos.

Sami, que creíste en mí aun cuando yo no lo hacía, lo que sé de proteómica te lo debo a ti.

Nunca los colores nos unieron tanto...

Al laboratorio Rosa: Jordi, Soni, Bia, Eudal, Jorge, Silvi, Lidia, Cristel y Paula, si de imaginación se trata.. este laboratorio tiene para todo el departamento, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar, por todas las horas compartidas en el laboratorio y fuera de él, mucha suerte en todos vuestros proyectos.

Al lab groc que nos acogió y nos dio una nueva identidad, rosa-amarilla. A Laura, Mina, Eli, Manu, Al, y mi compi Dani, con el que discutí tanto como le quiero.., compartisteis conmigo tantos buenos y malos momentos, siempre me apoyasteis...

Al laboratorio lila, nos dais una lección por vuestra profesionalidad en el trabajo, que siempre va a la par de vuestro civismo, no es fácil encontrar ambas cosas y por eso os admiro, Jauma, Jordi, Anahit, Nico, Celine, Irma, Mersé y Marcel.

Al laboratorio rojo, Maite, Inma, Marga, Dolores, Eli, Marc, Miriam y Ester. Nadie sabe más de proteómica que vosotros. Todos, nos beneficiamos de vuestra sabiduría y experiencia, gracias por vuestra ayuda.

Si un laboratorio se caracterizaba por su alegría, energía y montañas de buen humor era el laboratorio Caño – Montes. Sabemos lo impotente que es el trabajo en grupo pero vosotros sois más que eso, sois un equipo. Jorge, Norma, M^o Paz, Albert, Pep, Nuria, Nahuel, María, Judit, Giomar, Elena y Ana.

Que decir del lab Blau... siempre en la cresta de la ola, como nos hubiésemos aburrido sin el don de la palabra de Michael, la pasión de Belmiro, la alegría de Isa, la dulzura de Imen, del gran carisma de Tomaso, y sin olvidar a Sami, la energía de Cris, la locura de Lorenzo, las reflexiones de Alicia, que con Vicky, Marta, Adela, Eva y Montse, hacen que sea un laboratorio único.

Siempre tuve gran afinidad por el lab. verde, encontré ahí a los mejores amigos, Cristian, Hedia y Nurí. También agradecer a Carlos e Ignacio que se resinaron a que casi formara parte de su laboratorio.

Al laboratorio negro, a Valeria que puede hacer tres cosas a la vez y todavía preocuparse por los demás, a Silvia y Caparrós, que junto con Víctor nos dan otra referencia de lo que es ser investigador.

Al laboratorio de Torné, por la amabilidad que tuvisteis en todo momento conmigo.

Los chicos del grupo de Paloma, Sergi, Juan X, Mariano, Benoît , David, Lisa, Tommaso (por un tiempo), Wei; sabéis que os quiero mucho aunque nunca sabréis si es únicamente por vuestro cuerpo.., gracias por vuestra ayuda, por vuestros consejos, y por tener siempre un ratito para escucharme.

No compartimos mucho tiempo en el laboratorio pero si un montón fuera de el, el Heavy, Thilia, Erica, Antia, José, Carlos, Marta Casado, Pablo, Ana, Michaela, Cristina, Helen, Nestor, Maida, Jian, Begoña, Patricia.... Sois geniales!!

Todos sabemos que si hay un lugar en el CSIC donde fluye la energía positiva (y no es radiactividad de la 7º), ese lugar son los invernaderos. Pasamos muchas horas ahí, pero no únicamente porque trabajamos en plantas... gracias Pilar por ayudarme tanto durante todos estos años, Eva, Leire, Cesar, Alejandro y Montse, no podría haber hecho esta tesis sin vosotros.

A Montse, Mº José y Raúl ("informatico"), muchas gracias peques por vuestra ayuda y por todo lo que compartimos durante este tiempo.

A Irma C., gracias por preocuparte siempre por mí. A Ángel y Mersé, que con vuestro trabajo hacéis el nuestro más fácil. A mucha gente que aunque no la he nombrado han pasado por el CSIC durante este tiempo.

Pero no solo puedo agradecer esta tesis a los chicos del CSIC, a Soni, Todd, Michaela, Jaime, María, Raul, Jordi, mi familia en Barcelona.

A mis compis del IDIS. Gracias por haber estado durante casi dos años a mi lado, animándome cuando lo hubiese dejado, y celebrándolo cuando lo conseguí, sin vosotros este tiempo podría haber sido "muerte y destrucción", a Elisa, Diego, Ana, Vane, Cris, Sandra, Jorge, Laura, Lorena, Bruno, Paula, Turo, Samu, Ariatna, Marían, Rudi, Vero, ..., aunque todos somos un cuadro, quien dice que no sea arte ...

As niñas nenas do cole, Eva, Marta C., Cris, Marta S., non chegaría ata aquí sen vos, e porque aínda que a nosas vidas seguen rumbos diferentes... e máis o que nos une que a distancia que nos separa.

Os meus amigos da alma Barbara, Marieta, Rubén, Paula, Arantxa, Mº Paz, Sabela, Silvi, Marta e Cris, por toda unha vida de amizade.

A miña familia sen necesidade de razóns nin porques.

Gracias por formar parte da miña vida.

Índice temático

Índice	1
Índice figuras y tablas.....	6
Abreviaturas	10
Introducción	15
Objetivos.....	56
Resultados.....	58
Discusión.....	124
Conclusiones.....	147
Materiales y métodos	150
Bibliografía	191

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	13
1. RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS.....	15
1.1. Sistema de defensa basal	16
1.2. Defensa específica de huésped	17
1.3. Respuesta de defensa sistémica	19
2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS.....	20
2.1. Flujo de iones a través de la membrana plasmática.....	20
2.2. El calcio como mensajero celular	21
2.3. Acumulación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.....	22
2.4. Procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas	24
2.5. Proteínas relacionadas con la patogénesis.....	25
3. HORMONAS REGULADORAS DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	27
3.1. Ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno.....	28
3.1.1. Componentes de la vía de señalización mediada por el ácido salicílico	29
3.1.2. Componentes de la vía de señalización mediada por el ácido jasmónico y el etileno	31
3.2. Ácido abscísico	32
3.3. Auxinas	33
3.4. Giberelinas	34
3.5. Citoquininas	34
3.6. Brasinosteroides	35
4. PROTEÍNAS QUINASA DEPENDIENTES DE CALCIO (CPKs).....	37
4.1 Regulación de la actividad enzimática de las CPKs	40
4.1.1 Regulación por calcio	40
4.1.2 Regulación por fosforilación reversible.	41
4.1.3 Regulación por fosfolípidos.	42
4.1.4 Regulación por proteínas 14-3-3.	42
4.2. Expresión de genes <i>CPKs</i>	43
4.3. Localización subcelular de proteínas CPKs.	44
4.4. Sustratos de las proteínas CPKs.....	45
4.5. Posibles funciones de las proteínas CPKs.....	46
4.5.1 Participación de las proteínas CPKs en procesos de desarrollo.	47
4.5.2 Participación de las proteínas CPKs en la apertura estomática.....	47
4.5.3 Participación de las proteínas CPKs en respuesta a estrés abiótico.....	47
4.5.4 Participación de las CPKs en la respuesta a estrés biótico.	48
4.5.5 Intercomunicación en vías de señalización mediadas por CPKs.	50

5. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COMO PLANTA MODELO PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO.....	52
6. RESULTADOS DE PARTIDA EN EL GRUPO RELACIONADOS CON AtCPK1.....	55
OBJETIVOS	57
RESULTADOS	59
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>AtCPK1</i> EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	61
1.1. Expresión del gen <i>AtCPK1</i> en respuesta a la infección por el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> y al tratamiento con elicitores fúngicos.....	61
1.2. Expresión del gen <i>AtCPK1</i> en respuesta al tratamiento con hormonas.	64
1.3. Análisis funcional del promotor <i>AtCPK1</i>	66
1.3.1. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen <i>AtCPK1</i>	66
1.3.2. Obtención y análisis de plantas transgénicas que expresan el gen reportero de la β -glucuronidasa (<i>GUS</i>) bajo el control del promotor <i>AtCPK1</i>	72
1.3.3. Actividad del promotor del gen <i>AtCPK1</i> en condiciones de infección con el hongo <i>F. oxysporum</i> o de tratamiento con elicitores fúngicos.....	74
1.3.4. Actividad del promotor del gen <i>AtCPK1</i> en respuesta al tratamiento con hormonas.....	77
2. ACUMULACIÓN DE LA PROTEÍNA AtCPK1 EN RESPUESTA A INFECCIÓN POR EL HONGO <i>F. OXYSPORUM</i> Y AL TRATAMIENTO CON ELICITORES FÚNGICOS	80
3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE AtCPK1.....	85
3.1. Fosforilación.....	88
3.2. Regulación por el proteasoma	91
4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN, O FORMAN PARTE DE COMPLEJOS, CON AtCPK1.....	92
4.1. Efecto de la presencia de iones calcio en la interacción de AtCPK1 con otras proteínas.....	93
4.2. Captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad con la proteína de fusión GST-AtCPK1.	95
4.2.1. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de la proteína GST-AtCPK1.	95
4.2.2. Purificación de proteínas que interaccionan con la proteína de fusión GST-AtCPK1.....	96
4.3. Purificación e identificación de proteínas que interaccionan con AtCPK1 mediante cromatografía de inmunoafinidad.	100
4.3.1. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad a escala analítica.	100
4.3.2. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad a escala preparativa.	102
4.3.3. Identificación de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad mediante mapeo peptídico y secuenciación.	105

4.4. Purificación de complejos en los que participa AtCPK1 mediante el sistema TAP (<i>TANDEM AFFINITY PURIFICATION</i>)	109
4.4.1. Obtención de plantas transgénicas que expresan el gen de fusión <i>AtCPK1-TAPa</i>	109
4.4.2. Purificación de complejos proteicos mediante el sistema TAP.....	111
4.4.3. Identificación de proteínas presentes en complejos proteicos purificados mediante el sistema TAP por espectrometría de masas.....	113
4.5. Ensayos <i>PULL-DOWN</i> para la validación de proteínas que interactúan con AtCPK1.	119
5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA AtCPK1.	122
DISCUSIÓN	126
CONCLUSIONES	149
MATERIALES Y MÉTODOS	153
1. MATERIAL VEGETAL	151
1.1. Ecotipos silvestres.....	155
1.2. Líneas transgénicas	155
2. MANEJO, CULTIVO Y TRATAMIENTOS DEL MATERIAL VEGETAL.....	155
2.1. Condiciones de cultivo en el invernadero.....	155
2.2. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> de plántulas	155
2.3. Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis</i>	156
2.4. Infección de plántulas de <i>Arabidopsis</i> con el hongo <i>F. oxysporum</i>	156
2.5. Tratamiento de plántulas con elicitores de <i>F. oxysporum</i>	157
2.6. Tratamiento de plántulas con hormonas	157
3. MATERIAL BACTERIANO	157
4. PLÁSMIDOS Y CONSTRUCCIONES	158
4.1. Vectores de clonaje de productos de PCR.....	158
4.2. Vectores binarios	158
4.3. Vectores de expresión en <i>E. coli</i>	158
4.4. Construcciones	158
4.5. Medios.....	159
4.6. Sondas de DNA.....	160
4.7. Cebadores para la amplificación de DNA por PCR	160
4.8. Anticuerpos utilizados.....	161
5. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	161
5.1. Obtención de DNA plasmídico	161
5.2. Reacciones de modificación del DNA.....	163
5.3. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	163
5.4. Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación	163

5.5. Retrotranscripción (RT-PCR):.....	164
5.6. Amplificación de DNA por PCR	165
5.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	165
5.8. Secuenciación de DNA	166
5.9. Purificación de fragmentos de DNA.....	166
5.9.1 Precipitación de DNA	166
5.9.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	167
5.10. Obtención de DNA genómico de Arabidopsis	167
5.11. Obtención de RNA de Arabidopsis.....	167
5.12. Cuantificación de ácidos nucleicos	168
5.13. Electroforesis de RNA.....	168
5.14. Transferencia de RNA a membranas de nylon (<i>Northern blot</i>)	169
5.15. Marcaje radiactivo de DNA.....	170
5.16. Hibridación de membranas de RNA.....	170
5.17. Reutilización de membranas	171
6. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	171
6.1. Obtención de extractos proteicos de plantas.....	171
6.2. Cuantificación de proteínas.....	172
6.3. Ensayos de fosforilación-defosforilación de proteínas	173
6.4. Ensayos de degradación de proteínas por el proteasoma	173
6.5 Purificación de proteínas de cloroplastos	173
6.6 Producción en <i>E. coli</i> de proteínas recombinantes por fusión a la GST.....	174
6.7. Purificación de proteínas marcadas con el epítipo de histidinas en <i>E. coli</i>	176
6.8 .Obtención de anticuerpos policlonales.....	177
6.9. Captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad	178
6.10. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunofinidad	178
6.11. Análisis del efecto de la presencia de iones calcio en la interacción de AtCPK1 con otras proteínas.....	182
6.12. Purificación de complejos proteicos mediante el sistema TAP	182
6.13. Ensayos <i>Pull down</i> para la validación de interacciones proteína-proteína.	184
6.14. Transcripción y traducción <i>in vitro</i> (TnT) de proteínas.	184
6.15. Ensayos <i>Pull down</i>	185
6.16. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	186
6.17. Electroforesis bidimensional.....	187
6.18. Transferencia de proteínas	188
6.19. Inmunodetección de proteínas fijadas a la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos.....	189
6.20. Tinción de proteínas en geles SDS-PAGE con azul de Coomassie	189
6.21. Tinción de proteínas con nitrato de plata	190
6.22. Análisis de imágenes e identificación de proteínas	190
6.23. Secuenciación peptídica de proteínas	191
7. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS.....	192
Transformación de plantas de Arabidopsis	192

8. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROMOTORES EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS.....	193
Análisis histoquímico de la actividad GUS	193
BIBLIOGRAFÍA	195

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I1: Sistemas de defensa de las plantas.....	19
Figura I2: Mecanismos moleculares asociados a la defensa de la planta.....	21
Figura I3: Hormonas señalizadoras de la respuesta de defensa de las plantas	36
Figura I4: Características estructurales de proteínas CPKs, CCaMKs y CRKs	38
Figura I5: Relaciones filogenéticas de la familia de CPKs de Arabidopsis	39
Figura I6: Modelo del mecanismo de activación de las CPKs.	41
Figura I7: Modelo de regulación de StRBOH por StCDPK5	49
Figura I8: Modelo de las vías de señalización mediadas por MAPKs y CPKs durante la respuesta de defensa basal activada por moléculas PAMPs	52
Figura I9: Procesos implicados en la respuesta de defensa en <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	54

RESULTADOS

Figura R1. Expresión de <i>AtCPK1</i> en respuesta a infección con <i>F. oxysporum</i>	62
Figura R2. Expresión del gen <i>AtCPK1</i> en respuesta al tratamiento con elicitores de <i>F. oxysporum</i>	63
Figura R3. Expresión de <i>AtCPK1</i> en respuesta al tratamiento con hormonas.....	65
Figura R4. Análisis <i>in silico</i> del promotor del gen <i>AtCPK1</i> (At5g04870)	67
Figura R5. Representación esquemática de la construcción pCAMBIA1304:prom <i>AtCPK1</i> : <i>GFP-GUS</i> utilizada para la transformación de Arabidopsis	72
Figura R6. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plántulas de Arabidopsis portadoras del gen quimérico prom <i>AtCPK1</i> : <i>GFP-GUS</i>	74
Figura R7. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras del gen quimérico <i>promAtCPK1</i> : <i>GFP-GUS</i> infectadas con el hongo <i>F. oxysporum</i>	75
Figura R8. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras del gen quimérico prom <i>AtCPK1</i> : <i>GFP-GUS</i> en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos.	77
Figura R9. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras del gen quimérico prom <i>AtCPK1</i> : <i>GFP-GUS</i> tratadas con hormonas	79
Figura R10. Producción en <i>E. coli</i> de la proteína de fusión GST-N-terminal <i>AtCPK1</i> y purificación del fragmento N-terminal <i>AtCPK1</i>	81
Figura R11. Especificidad del suero inmune anti- <i>AtCPK1</i>	82

Figura R12. Acumulación de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos de plantas de Arabidopsis en respuesta a infección por <i>F. oxysporum</i> y al tratamiento con elicitores	84
Figura R13. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia aminoacídica de la proteína AtCPK1	86
Figura R14. Inmunodetección de AtCPK1 en extractos proteicos de plantas de Arabidopsis infectadas mediante electroforesis bidimensional	90
Figura R15. Estabilidad de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos de Arabidopsis en ausencia o presencia del inhibidor del proteasoma MG132	92
Figura R16. Perfil de proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-AtCPK1	94
Figura R17. Esquema del clonaje y purificación de la proteína de fusión GST-AtCPK1	96
Figura R18. Perfil de proteínas capturadas por cromatografía de afinidad con la proteína de fusión GST-AtCPK1.....	97
Figura R19. Interacción <i>in vitro</i> entre la proteína AtCPK1 con proteínas de la familia 14-3-3	98
Figura R20. Interacción <i>in vitro</i> entre la proteína AtCPK1 con la proteína APX3.....	100
Figura R21. Análisis de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad a partir de extractos proteicos de plántulas de Arabidopsis	102
Figura R22. Inmunodetección de proteínas 14-3-3 y APX3 en las muestras purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1	103
Figura R23. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos anti-AtCPK1	104
Figura R24. Geles virtuales obtenidos tras el análisis electroforético de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1 a partir de plantas control y plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i>	105
Figura R25. Gel virtual representativo del perfil de proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad a partir de plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i>	106
Figura R26. Esquema de la construcción pC:AtCPK1-TAPa utilizada para la transformación de plantas de Arabidopsis.....	110
Figura R27. Acumulación de la proteína fusión AtCPK1-TAPa en plantas transgénicas de Arabidopsis..	111
Figura R28. Esquema del proceso de purificación de los complejos proteicos en los que participa AtCPK1 con el sistema TAP (<i>Tandem Affinity Purification</i>)	112
Figura R29. Análisis electroforético de las proteínas purificadas mediante el sistema TAP.....	113
Figura R30. Interacción de la proteína AtCPK1 con las proteínas 14-3-3 , APX3, ATPasa alfa, Nitrilasa 2 y Nitrilasa 3 mediante ensayos de pull-down	121
Figura R31. Imágenes de microscopia de preparaciones de cloroplastos obtenidos a partir de plántulas de Arabidopsis control o infectadas con <i>F. oxysporum</i>	123

Figura R32. Inmunodetección de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos derivados de Cloroplastos	124
--	-----

DISCUSIÓN

Figura D1. Visualización de la expresión del gen <i>AtCPK1</i> (At5g04870) en los distintos tejidos de la planta <i>Arabidopsis</i>	128
---	-----

Figura D2. Modelo de las posibles funciones celulares de AtCPK1 durante la respuesta de defensa	147
---	-----

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Esquema del proceso seguido para la purificación de complejos en los que se encuentra AtCPK1 mediante cromatografía de inmutofinidad.	181
---	-----

INDICE DE TABLAS

Tabla I1. Potenciales sustratos de CPKs	46
---	----

Tabla RI. Elementos reguladores en <i>cis</i> identificados en la secuencia promotora del gen <i>AtCPK1</i>	68
---	----

Tabla RII. Proteínas purificadas por cromatografía de inmutofinidad	107
---	-----

Tabla RIII. Proteínas identificadas en el complejo proteico purificado por el sistema TAP	114
---	-----

Tabla RIV: Proteínas identificadas que interaccionan con AtCPK1 o forman parte de los complejos proteicos en los que participa AtCPK1.....	121
--	-----

Tabla M1. Cebadores utilizados en este trabajo para la amplificación de DNA mediante PCR.....	160
---	-----

ABREVIATURAS

2,4D: Ácido diclorofenoxiacético

aa: Aminoácido

Ab: Anticuerpo

ABA: Ácido abscísico

ABRE: Elemento de respuesta a ABA

ACC: Ácido amino ciclopropano carboxílico

ACN: Acetonitrilo

Ag: Antígeno

Amp: Ampicilina

Amp^R: Resistente a ampicilina

APX: Ascorbato peroxidada

APS: Persulfato amónico

ATP: Adenosina trifosfato

BR: Brasinosteroides

BrCN: Bromuro de cianógeno

BSA: Albúmina sérica bovina

Ca²⁺: Ión calcio

CaMV: Virus del Mosaico de la Coliflor

CAT: Proteína catalasa

Cb: Carbenicilina

CcaMK: Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina

CDPK o CPK: Proteína quinasa dependiente de calcio

CE: *Coupling element*

CRK: Proteína quinasa relacionada con las CPKs

Cys: Cisteína

DAMP: Moléculas asociadas al daño

dATP: Desoxiadenosina trifosfato

dCTP: Desoxicitosina trifosfato

DEPC: Dietilpirocarbonato

dGTP: Desoxiguanosina trifosfato

dil: Dilución

DNA: Ácido desoxiribonucleico

dNTP: 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato

DO: Densidad óptica

DTT: Ditioneitol

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etileglicoltetraacético

EREBP: Proteína de unión a elementos de respuesta a etileno

ERF: Factor de respuesta a etileno

ET: Etileno

ETI: Inmunidad dependiente de efector
g: Fuerza centrífuga relativa
g: Gramos
GA: Giberelinas
GFP: GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GPx: Proteína glutatión peroxidasa
GST: Glutatión S-transferasa
GUS: β-Glucuronidasa
h: Horas
H₂O₂ : Peróxido de hidrógeno
HEPES: 4 (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfonic
His: Histidina
His-tag: 6x-His
HPLC: *High performance liquid chromatography*
HR: Respuesta hipersensible
IAA: Ácido indolacético
IAN: Indol-3-acetonitrilo
IgG: Immunoglobulina de tipo G
IP: Proteínas inmunopurificadas
IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
ISR: Resistencia sistémica inducida
JA: Ácido jasmónico
Kan: Kanamicina
Kan^R: Resistente a kanamicina
Kb: Kilopares de bases
kDa: Kilodaltons
L: Litros
LB: *Left border*
LPS: Lipopolisacárido
LRR: Repetición rica en leucinas
LRR-RLK: Proteína quinasa con repetición rica en leucinas
LTP: Proteína transportadora de lípidos
m: Metro
M: Molar
MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK: Proteína quinasa de MAPK
MAPKKK: Proteína quinasa quinasa de MAPK
MeJA: Ácido metil-jasmónico
Medio LB: Medio Luria-Bertani
Medio MS: Medio Murashige y Skoog
Met: Metionina
min: Minutos

M-MLV RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

mRNA: RNA mensajero

N: Número de ciclos

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: Nicotín adenin dinucleótido reducido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NO: Óxido nítrico

Nos: Nopalina sintasa

O₂⁻: radical superóxido

OH⁻: radical hidroxilo

p.e.: por ejemplo

p/v: Relación peso/volumen

PAMP o MAMP: Moléculas asociadas a patógenos/microbios

pb: Pares de bases

PBS: Tampón Fosfato Salino

PBST: Tampón Fosfato Salino-Tween 0.1%

PCD: Muerte celular programada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDA: *potato dextrose agar*

pI: punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

PMSF: Fluoruro de Fenilmetano-sulfonilo

POX: Proteína peroxidasa

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis

PRL: Proteína relacionada con las PR

Pro: Prolina

PRR: Receptores de reconocimiento a PAMP/MAMP

PTI: Inmunidad dependiente de MAMP

RB: *Right border*

RE: Retículo endoplasmático

Rif: Rifampicina

RIP: Proteína inactivadora de ribosomas

RLCK: Proteína quinasa receptora citoplasmática

RLK: Proteína quinasa receptora

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Retrotranscripción

SA: Ácido salicílico

SAA: Aclimatación sistémica adquirida

SAR: Resistencia Sistémica Adquirida

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida:bis-acrilamida con SDS

seg: Segundos

SEM: Error estándar de la media

SIPK: Proteína quinasa inducida por SA

SnRK: Proteína quinasa relacionada a SnF1

SOD: Proteína superóxido dismutasa

Tª: Temperatura

Ta: Temperatura de apareamiento

tac: Promotor inducible por IPTG

TAP: *Tandem Affinity Purification*

TBE: Solución tampón Tris , borato y EDTA

te: Tiempo de elongación

TF: Factor de transcripción

TFA: Ácido Trifluoroacético

THC: Éster benzothiadiazole-s-metilo

T-nos: Terminador de la nopalina sintasa

TnT: Traducción y transcripción *in Vitro*

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UV: Ultravioleta

v/v: Relación volumen/volumen

V: Voltios

W: Vatios

YEB: *Yeast Extract Peptone*

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS.

En su ambiente natural, las plantas se encuentran expuestas a una amplia gama de microorganismos potencialmente dañinos (o perjudiciales) como pueden ser hongos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos o insectos fitófagos, entre otros. A pesar de ello, en la naturaleza son pocos los organismos y en concreto los microorganismos capaces de causar enfermedad a la planta. Durante el proceso de evolución, las plantas y los microorganismos han co-evolucionado adaptándose unos a otros. Así, las plantas han desarrollado sistemas de defensa para protegerse del ataque de los microorganismos potencialmente patogénicos, mientras que éstos han sido capaces de adaptarse a dichos cambios y desarrollar nuevas estrategias que les permitan superar las barreras defensivas de la planta y por lo tanto son capaces de causar infección.

Para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tener en cuenta la **virulencia** o **avirulencia** de un patógeno siempre en relación con la **resistencia** o **susceptibilidad** de la planta huésped. La interacción que se establece entre ambos puede ser de tipo **compatible** o **incompatible**. Una *relación compatible* se refiere a una interacción entre un patógeno virulento y una planta huésped susceptible, y por tanto se desarrolla la enfermedad, mientras que una *relación incompatible* se establece cuando el huésped es resistente o el patógeno es avirulento y no se produce enfermedad.

Las plantas presentan diferentes niveles de defensa. Así, para que un microorganismo pueda establecer una infección, debe en primer lugar, superar lo que podemos definir como defensas "pasivas", basadas en la existencia de barreras físicas, que protegen a las células de la planta del medio que las rodea (la cutícula y la pared celular), o en la acumulación de compuestos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos y organismos fitófagos. En muchos órganos se acumulan compuestos fenólicos y taninos que poseen propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, en semillas se acumulan cantidades importantes de proteínas y péptidos antimicrobianos. No está claro, sin embargo, que una planta sea resistente a un patógeno concreto por el mero hecho de acumular este tipo de compuestos. Además, las plantas responden a la presencia de un patógeno mediante mecanismos "activos" que van acompañados de cambios importantes de la expresión génica.

1.1. Sistema de defensa basal

Las plantas poseen un sistema inmune innato que se manifiesta en todas las células de la planta (Nurnberger *et al.*, 2004; de Wit, 2007; Schwessinger y Zipfel, 2008; Zipfel, 2009). Ello se conoce como resistencia basal no específica de huésped, o respuesta inmune innata. Esta respuesta se inicia con el reconocimiento de moléculas microbianas conservadas, las **PAMP** o **MAMP** (*Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns*, anteriormente conocidos como elicitores) por parte de receptores específicos de la célula vegetal denominados **PRR** (*Pattern Recognition Receptors*). El reconocimiento de las moléculas PAMP por los receptores PRR desencadena una respuesta de defensa, o defensa basal (inmunidad innata). La inmunidad inducida por PAMP, o **PTI** (*PAMP-Triggered Immunity*), es en muchos casos efectiva para controlar la infección en la planta huésped (Jones y Dangl, 2006; de Wit, 2007; Zipfel, 2009).

Se han identificado varias moléculas PAMP en patógenos de plantas que actúan como elicitores de la respuesta de defensa, incluyendo la flagelina, el lipopolisacárido (LPS), el factor de elongación Tu (EF-Tu) de bacterias Gram-negativas, la quitina o β -glucanos de hongos y Oomycetos (Zipfel, 2008). También se han identificado los receptores PRR de la flagelina flg22 y del factor de elongación Tu (elf18), a los que se ha denominado FLS2 y FER, respectivamente. FLS2 es un receptor quinasa de membrana con un dominio extracelular con repeticiones de leucina (**LRR**, *Leucine Rich Repeat*) y un dominio citoplasmático serina/treonina quinasa (Zipfel *et al.*, 2006; Zipfel, 2008). El reconocimiento de flg22 por FLS2 desencadena una respuesta en la planta que va acompañada de una reducción del crecimiento de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate. Además, los mutantes para FLS2 son más susceptibles a la infección por esta bacteria, indicando que FLS2 media la respuesta de defensa primaria inducida por flg22 (Chinchilla *et al.*, 2006). Del mismo modo, elf18 desencadena una respuesta de defensa en plantas de *Arabidopsis* portadoras del receptor FER (Kunze *et al.*, 2004; Robatzek *et al.*, 2007; Zipfel, 2009). Curiosamente, mientras que flg22 y elf18 son reconocidos por diferentes receptores **RLKs** (*Receptor-Like Kinases*), la respuesta de defensa inducida en la planta huésped es muy similar en ambos casos.

El reconocimiento de estos PAMP provoca cambios intracelulares tales como aumento en los niveles de calcio citoplasmático, la producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**, *Reactive Oxygen Species*) y de óxido nítrico (**NO**, *Nitric Oxide*). Estos cambios llevan a la activación de cascadas de fosforilación reversible de proteínas que resultan en cambios de expresión génica a través de la activación de factores de transcripción.

Además de las moléculas PAMP, las plantas también son capaces de reconocer compuestos procedentes de la actuación de los microorganismos sobre la propia planta, o elicitores endógenos (**DAMP** o *Damage-Associated Molecular Pattern*) los cuales también son percibidos por receptores PRR (Boller y Felix, 2009). Con el reconocimiento de PAMP/DAMP se pone en marcha la compleja maquinaria de defensa en la cual participan múltiples procesos y vías de señalización que conducen hasta la activación de la expresión de **genes de defensa**. En el apartado 2 de esta Introducción se presentan en mayor detalle los componentes de esta respuesta y las vías de señalización activadas por moléculas PAMP.

1.2. Defensa específica de huésped

A lo largo de la evolución los patógenos han adquirido la capacidad de producir moléculas, o efectores, que interfieren con el sistema de defensa basal de la planta huésped, lo que les permite progresar en el proceso de la infección. Por su parte, y para protegerse de la acción de estos efectores microbianos, las plantas producen otro tipo de receptores, las **proteínas de Resistencia o proteínas R** que reconocen a dichos efectores microbianos permitiendo así la activación de la respuesta de defensa de la planta. Esta respuesta conocida como inmunidad dependiente de efector (**ETI**, *Effector-Triggered Immunity*) fue definida durante mucho tiempo como resistencia mediada por genes R, según la teoría de interacción gen-a-gen (Flor, 1942). La inmunidad dependiente de efector se basa en el reconocimiento altamente específico entre efectores microbianos (factores de avirulencia) y las proteínas R producidas por genes de resistencia de la planta huésped. Este reconocimiento activa de manera importante las respuestas de defensa en el huésped y en muchos casos va acompañada de una **respuesta hipersensible** (HR, *Hypersensitive Response*) que se caracteriza por la muerte celular y necrosis en el sitio de infección. La HR detiene el progreso de la infección.

Las proteínas R poseen dominios conservados con repeticiones ricas en leucinas. Durante mucho tiempo se consideró que la proteína R interacciona directamente con el efector microbiano, tal y como sucede en el reconocimiento de PAMP por los receptores PRR en la defensa basal. Sin embargo, en algunos casos, se produce un reconocimiento indirecto, de manera que las proteínas R no reconocen directamente a los efectores del patógeno sino que actúan monitorizando el estado de proteínas endógenas que son las dianas de los efectores microbianos. Esta modificación en el estado de proteínas endógenas es la señal para que las proteínas R actúen para desencadenar los mecanismos de resistencia en la planta huésped. Por tanto, según esta teoría, conocida como "hipótesis del guardián" las proteínas R han evolucionado para reconocer la función de los efectores microbianos y no a los

efectores en sí mismos. Este modelo fue inicialmente propuesto para explicar el mecanismo de percepción de *P. syringae* AvrPto por las proteínas de tomate Pto y Prf (Van der Biezen y Jones, 1998) y fue posteriormente extendido para el caso de otros efectores (Dangl y Jones, 2001). El reconocimiento indirecto del efector explicaría que diferentes efectores puedan ser reconocidos por una única proteína R, con lo cual un número limitado de proteínas R podrían conferir resistencia a un amplio espectro de patógenos. Sin embargo, desde el punto de vista evolutivo, esta situación puede verse modificada en función de la ausencia o presencia del gen *R* en la planta, y a los mecanismos de selección a que se encuentren sometidos las dianas de los efectores microbianos: a) en ausencia de un gen *R* funcional, las proteínas diana podrían ir perdiendo su capacidad de interacción con el efector microbiano, con lo que se puede llegar a perder el reconocimiento entre ambos; b) en presencia de un gen *R* funcional, la selección natural favorecerá las proteínas diana más efectivas para interactuar y reconocer el efector microbiano. Así pues, el reconocimiento efector microbiano-proteína R constituye una situación inestable desde el punto de vista evolutivo en la cual cambios en las proteínas endógenas (o proteínas "decoy") afectarían al reconocimiento del efector microbiano y por lo tanto la funcionalidad de la proteína R (Modelo "decoy") (van der Hoorn y Kamoun, 2008). Las proteínas "decoy" pueden originarse por duplicación génica en las propias proteínas diana seguido de una evolución independiente que mimetizaría la función de la proteína diana propiamente dicha.

En la **figura I1** se muestra un esquema que ilustra los diferentes sistemas de defensa y contradefensa que se encuentran en las plantas, la inmunidad dependiente del reconocimiento de moléculas PAMP, o PTI, y la inmunidad dependiente de efector y proteínas R, o ETI. Se indican también algunos de sus componentes (en el apartado 2 de esta introducción se comentará en mayor detalle la función de estos componentes).

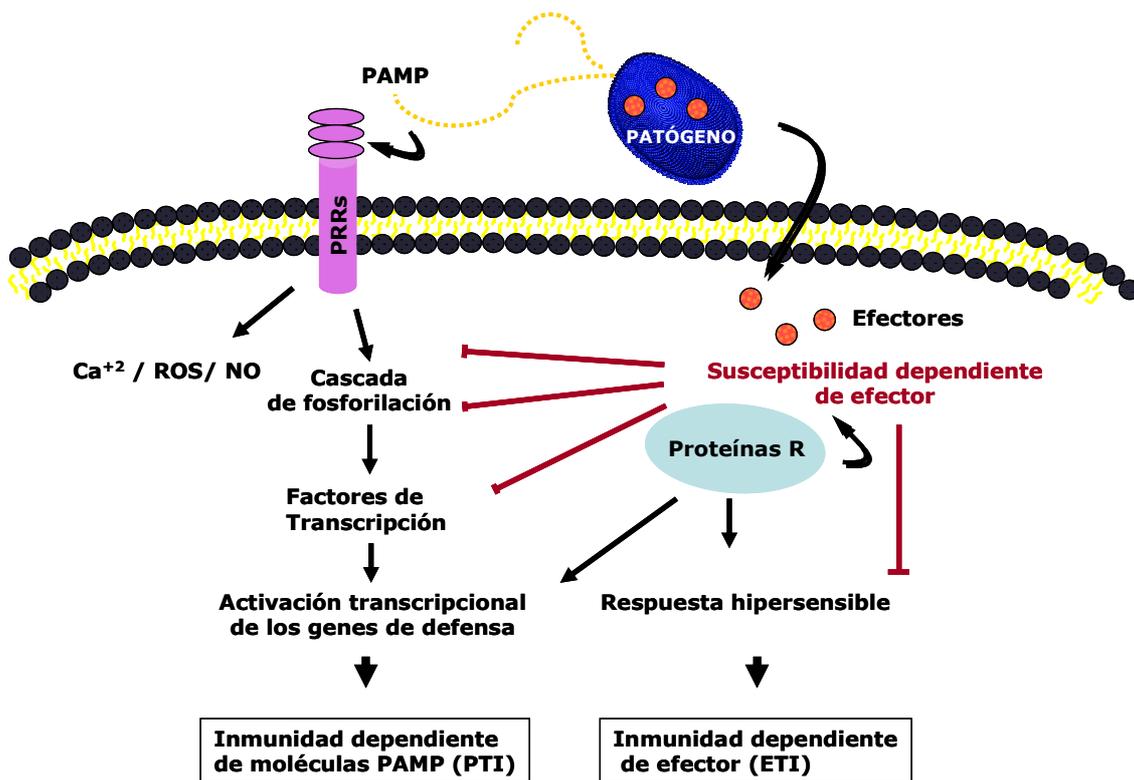


Figura I1: Sistemas de defensa de las plantas. La **defensa basal** o **inmunidad dependiente de moléculas PAMP** se basa en el reconocimiento de las moléculas **PAMP** conservadas en diversos patógenos mediante receptores **PRR** específicos. Por otra parte, determinados patógenos producen proteínas efectoras capaces de neutralizar esta defensa basal. Ante ello, las plantas pueden desarrollar lo que se conoce como **inmunidad dependiente de efector** basada en el reconocimiento de los efectores microbianos a través de las **proteínas R**. Este reconocimiento puede ir acompañado de una **respuesta hipersensible** o muerte celular programada de las células que se encuentran en la proximidad del patógeno. (He *et al.*, 2007).

1.3. Respuesta de defensa sistémica

Las plantas desarrollan mecanismos de defensa no solo en los puntos de infección, sino también en tejidos distantes del foco de infección. Este mecanismo se denomina **resistencia sistémica adquirida** (SAR, *Systemic Acquired Resistance*). La respuesta SAR es inducida tanto en la defensa basal (reconocimiento de moléculas PAMP), como en la inmunidad dependiente del reconocimiento efector-proteína R, y es efectiva no solo frente al patógeno que desencadenó esta respuesta sino también frente a otros patógenos e insectos fitófagos. El ácido salicílico (SA, *Salicylic Acid*) desempeña un papel muy importante en la respuesta SAR en Arabidopsis y tabaco. Existe un segundo tipo de resistencia

sistémica, la **resistencia sistémica inducida** (ISR, *Induced Systemic Resistance*) según la cual la colonización de la raíz de una planta por rizobacterias no patógenas (pe. *Pseudomonas fluorescens*) confiere resistencia a patógenos en la parte aérea de la planta (Verhagen *et al.*, 2004; Verhagen *et al.*, 2010). La respuesta ISR se encuentra mediada por el ácido jasmónico (JA, *Jasmonic Acid*) y el etileno (ET). En el apartado 3 se presenta en mayor detalle la participación de estas hormonas en la resistencia frente a patógenos.

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS

Tal y como se ha comentado anteriormente, las plantas son capaces de defenderse frente a patógenos de una manera “activa” mediante la puesta en marcha de una serie de procesos bioquímicos, así como también con cambios en la estructura celular y reorganización de compartimentos subcelulares (van Loon *et al.*, 2006). Ello es posible gracias a la existencia de una sofisticada y compleja red de vías de señalización en la que participan numerosos procesos y mecanismos moleculares. Para simplificar el análisis de estos procesos, muy frecuentemente se ha simplificado su estudio considerando las diferentes vías de transducción de señal de manera independiente, e intentando asociar una vía única en la respuesta a un patógeno concreto. Sin embargo, la situación es bastante más compleja ya que la respuesta que se observa en cada caso es el resultado de interacciones cruzadas (*cross-talk*) entre diferentes vías de señalización (Kunkel y Brooks, 2002; Koornneef *et al.*, 2008).

2.1. Flujo de iones a través de la membrana plasmática

Uno de los eventos más rápidos que se observan tras el reconocimiento de una molécula PAMP por su receptor PRR es el cambio transitorio en el flujo de iones a través de la membrana plasmática de la célula vegetal (Altenbach y Robatzek, 2007). Se observa una despolarización de la membrana plasmática con alteraciones importantes en el flujo de iones a través de ella que incluye la entrada de H^+ y Ca^{+2} y la salida de K^+ y Cl^- (Atkinson *et al.*, 1996)(**Figura I2**). Esta respuesta se observa inmediatamente (aproximadamente 5 minutos), dando lugar a una acidificación del citoplasma y alcalinización del apoplasto (Nurnberger y Scheel, 2001; Zhao *et al.*, 2005; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). El ejemplo mejor caracterizado es el de la flagelina bacteriana flg22 donde se observan cambios en la concentración de Ca^{+2} citoplasmático y nuclear en solo unos pocos minutos (Aslam *et al.*, 2008).

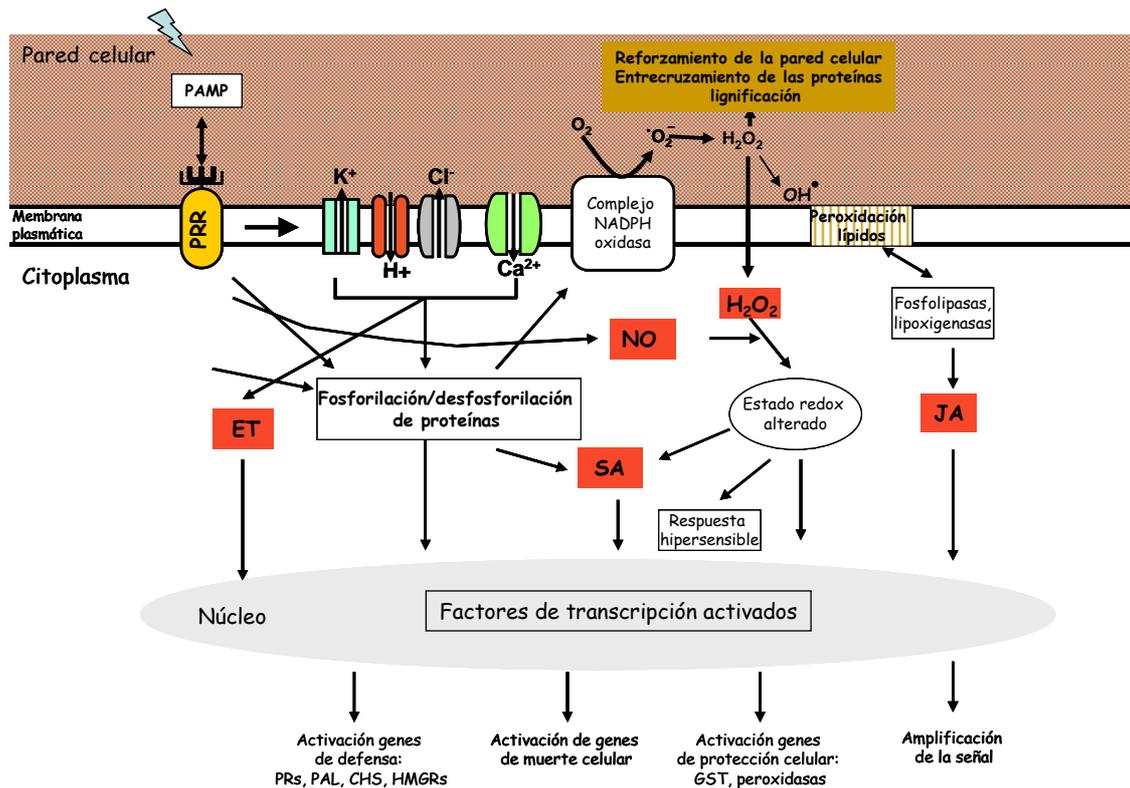


Figura I2: Mecanismos moleculares asociados a la defensa de la planta. El proceso se inicia cuando se produce el reconocimiento de moléculas PAMP del patógeno por receptores específicos (PRR) situados en la membrana plasmática de la célula vegetal. El resultado es la activación de la expresión de una gran diversidad de genes implicados en diferentes respuestas de defensa. Adaptado de San Segundo y Coca (2004).

2.2. El calcio como mensajero celular

El calcio (Ca^{+2}) es probablemente el ion más versátil en los organismos eucariotas. Está involucrado en numerosos procesos de desarrollo de la planta y respuesta a hormonas, así como también en la respuesta de la planta a estímulos externos sean de tipo abiótico (sequía, salinidad, frío, herida mecánica) o biótico (respuesta a patógenos o simbiontes).

Existe una gran diferencia en la concentración de Ca^{+2} entre los diferentes orgánulos y estructuras celulares con respecto a la concentración que se observa en el citoplasma de la célula. Así, la concentración de calcio libre en el citosol se mantiene alrededor de 200 nM, mientras que la concentración de calcio en el retículo endoplasmático, la pared celular o en la vacuola es varios órdenes de magnitud superior (entre 0,1 y 100 mM) (Bush, 1995). La primera evidencia de cambios en la concentración de Ca^{+2} citosólico, y por tanto de que el Ca^{+2} podría funcionar como segundo mensajero, se obtuvo en el alga verde *Chara* (Williamson

y Ashley, 1982). Estudios posteriores confirmaron la existencia de alteraciones en la concentración de Ca^{+2} citosólico en respuesta a diferentes estímulos, siendo estas alteraciones transitorias y de diferente intensidad dependiendo del estímulo inicial (Kudla *et al.*, 2010). El control de la homeostasis celular del Ca^{+2} es directamente dependiente del correcto funcionamiento de los canales de Ca^{+2} que se encuentran en los diferentes compartimentos subcelulares.

La señalización mediada por calcio se inicia con la entrada de Ca^{+2} en la célula a favor de su gradiente electroquímico en respuesta al estímulo. La activación de ATPasas de membrana dependientes de Ca^{+2} en la membrana del retículo endoplasmático, la vacuola, la mitocondria o en la membrana plasmática, contribuyen a que el incremento de Ca^{+2} sea transitorio y se retorne a la concentración basal. La duración del incremento en el nivel de Ca^{+2} es igualmente crucial. Un aumento de corta duración resultará en una entrada muy limitada del Ca^{+2} en el citoplasma. Mientras que un aumento de mayor duración proporciona una mayor entrada del mismo. Así pues, la amplitud, duración y frecuencia en la entrada de calcio y su acumulación diferencial en diferentes compartimentos celulares explicarían porqué el calcio puede participar como segundo mensajero en numerosos procesos celulares. Las alteraciones en el nivel de Ca^{+2} intracelular son detectadas por proteínas "sensoras" que responden a dichos cambios. En plantas hay diversos tipos de proteínas sensoras de unión a Ca^{+2} , incluyendo calmodulinas, proteínas tipo calcineurina-B y CPKs (ver apartado 4 de esta introducción).

2.3. Acumulación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico

La producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**) conocida como "explosión oxidativa" es también una de las respuestas tempranas a la infección por patógenos. Las ROS incluyen el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-). Todas las moléculas ROS son tóxicas y su capacidad destructiva depende de su reactividad. Así, el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-) son extremadamente reactivos, especialmente el radical hidroxilo considerado como una de las moléculas más tóxicas que existen y responsable de la mayoría de modificaciones irreversibles que se producen en las macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y del daño de orgánulos (Buckner *et al.*, 2000; Laloi *et al.*, 2004). Todas las ROS se producen por reducción secuencial del oxígeno molecular. El O_2^- es inestable en solución y puede dismutar a H_2O_2 por la actividad de superóxido dismutasas (SODs, *SuperOxide Dismutases*) (Piedras *et al.*, 1998). Finalmente, el radical OH^- se produce a partir de O_2^- y H_2O_2 en presencia de hierro mediante la reacción de Fenton.

En la célula vegetal, las especies reactivas de oxígeno se producen continuamente como subproductos de diversas vías metabólicas en diferentes compartimentos subcelulares, tales como cloroplastos y mitocondrias. En condiciones de infección, sin embargo, se generan cantidades importantes de moléculas ROS lo cual generalmente va acompañado de una muerte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*). Para mantener los niveles adecuados de ROS en la célula, y por lo tanto para evitar el daño oxidativo, las plantas poseen mecanismos basados en sistemas enzimáticos o no enzimáticos. Los mecanismos no enzimáticos se basan en la producción de compuestos con propiedades antioxidantes que son capaces de secuestrar las moléculas ROS (glutación, ascorbato, tocoferoles, flavonoides, alcaloides). Los mecanismos enzimáticos incluyen la producción de enzimas detoxificadoras como son las superóxido dismutasas, catalasas (CAT, *CATalases*) y peroxidasas (POX, *PerOXidases*) (Scandalios, 2002; Scandalios, 2005). Otro grupo de proteínas capaces de neutralizar ROS son la glutación peroxidasa (GPx, *Glutation Peroxidase*) (Margis *et al.*, 2008), peroxirredoxinas (Rouhier y Jacquot, 2002) y tioredoxinas (Alkhalifioui *et al.*, 2008; Nanda *et al.*, 2010). Así, la prevención frente a la toxicidad y el control de la señalización mediada por ROS implica a un gran número de genes. En *Arabidopsis* se conocen al menos 150 genes relacionados que se denominan red génica de ROS (Mittler *et al.*, 2004).

La principal fuente de ROS es el complejo NADPH oxidasa situado en la membrana plasmática, el cual forma O_2^- en el espacio extracelular que es rápidamente convertido a H_2O_2 . El H_2O_2 producido en el exterior de la célula, además de tener un efecto antimicrobiano directo, funciona como señal activadora de otras respuestas de defensa. Además, el H_2O_2 es capaz de difundir al interior de la célula a través de la membrana plasmática donde ejerce una función señalizadora para la activación de la respuesta de defensa. De esta manera, a bajas concentraciones, el H_2O_2 actúa como segundo mensajero para la activación de los mecanismos de defensa (activación de las cascadas MAPK, movilización de Ca^{+2}) (Neill *et al.*, 2002). Por el contrario, altas concentraciones de H_2O_2 provocan la muerte celular programada, lo cual contribuye a limitar el progreso de infección. Las moléculas ROS también intervienen en el reforzamiento de la pared celular y contribuyen a la formación de enlaces entre los componentes estructurales de la pared lo cual dificulta la penetración por el patógeno. La producción de ROS puede también alterar el balance redox de la célula, activando así otros componentes de la respuesta de defensa de la planta que dependen de cambios del estado redox,

como es el caso de la proteína NPR1 (Wojtaszek, 1997; Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Quilis *et al.*, 2008). Todo ello demuestra que las moléculas ROS desempeñan un papel importante en la etapa inicial de la respuesta de defensa, actuando bien a través de su actividad antimicrobiana, o bien como inductores de la respuesta de defensa de la planta (Nanda *et al.*, 2010).

El **óxido nítrico** también tiene un papel fundamental en los estadios iniciales de la respuesta de defensa frente a patógenos y en la respuesta hipersensible (Dangl y Jones, 1998; Wendehenne *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Delledonne, 2005; Lamotte *et al.*, 2005; Asai y Yoshioka, 2008; Ma *et al.*, 2008). Las moléculas ROS y el óxido nítrico juegan papeles importantes en la defensa, actuando bien de forma independiente, bien de forma coordinada. Así, el NO potencia la muerte celular iniciada por la producción de moléculas ROS para la activación de la expresión de genes de defensa. En células de la vid, el óxido nítrico es necesario para la activación del complejo NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática tras la infección por el hongo patógeno *Botrytis cinerea* (Vandelle *et al.*, 2006). Se sabe también que el óxido nítrico podría inducir respuestas de defensa relacionadas con la vía de los fenilpropanoides, y en tabaco, el óxido nítrico se le ha relacionado con la respuesta SAR (Song y Goodman, 2001). El óxido nítrico y el ácido salicílico (hormona reguladora de la defensa de las plantas, ver más adelante) participan conjuntamente en la defensa de las plantas frente a patógenos (Delledonne *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Delledonne, 2005; Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2006).

Además, existe una conexión entre el aumento que se observa en la concentración citosólica de Ca^{+2} en la inmunidad dependiente de moléculas PAMP y la síntesis de óxido nítrico (Lamotte *et al.*, 2004; Lecourieux *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual la concentración de Ca^{+2} citosólico y el óxido nítrico están vinculados. Los PAMPs, cryptogein y LPS aumentan la producción de óxido nítrico en células de tabaco (Lamotte *et al.*, 2004) o de *Arabidopsis* (Zeier *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2007). En ambos casos, la aplicación de un inhibidor del canal de Ca^{+2} o la quelación del Ca^{+2} extracelular con EGTA, bloquea la síntesis de óxido nítrico (Ma *et al.*, 2008).

2.4. Procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los mecanismos bioquímicos más ampliamente utilizados en señalización celular. La fosforilación puede alterar la actividad, localización subcelular y vida media de las proteínas y regular su interacción con otras proteínas o estructuras celulares. Algunos ejemplos de

proteínas quinasa de plantas son los **RLKs** o los receptores quinasa citoplasmáticos (**RLCK**, *Receptor-Like Cytoplasmic Kinases*), que controlan procesos como el reconocimiento de patógenos y el desarrollo (Morris y Walker, 2003; Morillo y Tax, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007; Afzal *et al.*, 2008). Otro ejemplo son las quinasas tipo SNF1 (**SnRK**, *SnF1-Related Kinases*) implicadas en la regulación del metabolismo, desarrollo y respuestas al estrés (Gong *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Polge y Thomas, 2007), o las proteínas **MAPKs** y sus quinasas reguladoras (Jonak *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2006; Colcombet y Hirt, 2008). En plantas se encuentran las proteínas quinasa dependientes de calcio, cuya función se comenta en mayor detalle en el apartado 4 de la Introducción.

Las cascadas de fosforilación en las que participan **MAP quinasas** son uno de los mecanismos de transducción de señales más estudiados. En la cascada de señalización mediada por MAPKs participan tres MAPK quinasas jerarquizadas, de las cuales la MAPK constituye el último componente. Por encima de ella participan una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK). Las MAPK se activan rápidamente tras el reconocimiento de las moléculas PAMP.

Una de las primeras MAPK implicada en defensa fue la proteína SIPK de tabaco (*SA-Induced Protein Kinase*), para la que se ha demostrado su activación tanto por SA, como por elicitores fúngicos derivados de *Phytophthora spp.* (Zhang y Klessig, 1997). Se han descrito diversos ortólogos de esta MAP quinasa en otras especies vegetales, tales como AtMPK6 y OsSIPK de Arabidopsis y arroz, respectivamente (Zhang y Klessig, 1997). En Arabidopsis, se ha demostrado que flg22 activa dos MAPKs, AtMPK3 y AtMPK6 (Merkouropoulos *et al.*, 2008). Además, las plantas con niveles reducidos de AtMPK6 muestran una mayor susceptibilidad a la infección por cepas virulentas y no virulentas de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*, lo que indica que la señalización a través de AtMPK6 desempeña un papel fundamental durante las respuestas de defensa (Merkouropoulos *et al.*, 2008).

2.5. Proteínas relacionadas con la patogénesis

El concepto de proteínas relacionadas con la patogénesis (*Pathogenesis-Related proteins*, PRs) fue introducido para designar aquellas proteínas que se acumulan en tejidos de una planta en situaciones de infección por patógenos, o en situaciones relacionadas (van Loon y van Kammen, 1970; Antoniw *et al.*, 1980). Su presencia se detecta en tejidos infectados por virus, bacterias u hongos, así como también en respuesta al ataque por insectos fitófagos y nematodos. El término PR-like (PRL) se acuñó para designar aquellas proteínas relacionadas con las PR que se encontraban también presentes en plantas no infectadas (Van Loon, 1994). Sin embargo, con el avance del conocimiento, la distinción entre PR y PRL ha ido desapareciendo ya que

algunas proteínas que se habían clasificado como PR se acumulan en determinados tejidos en ausencia de infección (van Loon *et al.*, 2006). De todos modos, el término PR ha seguido utilizándose, aunque sus límites no estén muy bien definidos y actualmente suele utilizarse para referirse a cualquier proteína que se induce en respuesta a infección, aunque se encuentre presente de forma constitutiva a niveles basales.

Las proteínas PRs se han agrupado en familias en base a la similitud en su secuencia de aminoácidos, relaciones serológicas, o de actividad (Ferreira *et al.*, 2007). Se han descrito 17 familias de PRs, si bien, no todas están presentes en todas las especies. Las familias se han venido numerando por orden de descubrimiento y un miembro de cada una (el más prominente o el primero que se describió) se escoge como representante típico (Van Loon, 1994; van Loon *et al.*, 2006). Aunque la función de muchas PRs es desconocida, diversas familias han sido relacionadas con la inhibición de la actividad y el crecimiento de patógenos. Por ejemplo, las proteínas de la familia PR-2 (β -1,3-endoglucanasas) y de las familias PR-3, -4 y -8 (endoquitinasas) muestran actividad antifúngica. Es notable que miembros de la familia PR-1 suelen utilizarse como marcadores de la SAR, aunque su actividad biológica se desconoce. Los inhibidores de proteasas (PR-6) pueden actuar como agentes insecticidas y antifúngicos. Las proteínas de la familia PR-8 poseen actividad lisozima, por lo que podrían actuar contra bacterias, mientras que las defensinas (PR-12) (Thomma *et al.*, 2002; Lay y Anderson, 2005) y las tioninas (PR-13) (Bohlmann, 1994) presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro. Algunas proteínas transportadoras de lípidos (LTP, *Lipid Transfer Proteins*, PR-14) también presentan actividad antimicrobiana (García-Olmedo *et al.*, 1995). Las proteínas PR-7 son endoproteasas muy abundantes en tomate y podrían participar en la disolución de la pared microbiana (Jorda y Vera, 2000). Las PR-9 son peroxidasas que podrían participar en el reforzamiento de la pared celular de manera que proporcionarían una protección de amplio espectro (Passardi *et al.*, 2004). Las proteínas PR-10 presentan homología con ribonucleasas, y se piensa que podrían estar dirigidas específicamente contra virus (Park *et al.*, 2004a). Las familias PR-15 y PR-16 son típicas de monocotiledóneas y comprenden germinas con actividad oxidasa de oxalato (*germin like oxalate oxidases*) y oxidasas de oxalato (*oxalate like oxidases*) (Bernier y Berna, 2001). Estas proteínas generan peróxido de hidrógeno que puede ser tóxico para los microorganismos y actuar, además, como señalizador de la respuesta de defensa (Hu *et al.*, 2003). La familia PR-17 se ha detectado en tabaco, trigo y cebada y contiene proteínas con homología a las metaloproteinasas de zinc (Christensen *et al.*, 2002). Finalmente,

se ha descrito una posible nueva familia (PR-18). Comprende oxidasas de carbohidratos inducibles por hongos y salicílico y viene ejemplificada por una proteína de girasol generadora de peróxido de hidrógeno y con actividad antimicrobiana (Custers *et al.*, 2004).

Otras proteínas no clasificadas como proteínas PRs, pero que también se acumulan en respuesta a la infección por patógenos son las glicoproteínas de pared ricas en hidroxiprolina (Dumas *et al.*, 1999), las proteínas ricas en glicina (Sachetto-Martins *et al.*, 2000), las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas (De Lorenzo *et al.*, 2001), y las lipoxigenasas (Feussner y Wasternack, 2002). Existen otros tipos de proteínas con actividad antimicrobiana, como son las proteínas inactivadoras de ribosomas (Ribosome Inactivating Proteins, RIP), las lectinas y diversos tipos de proteínas ricas en cisteína, pero que no han sido clasificadas como proteínas PRs (van Loon *et al.*, 2006).

El destino final de la mayoría de PRs es el apoplasto o la vacuola. Es por ello que muchas PR contienen péptidos señal que determinan su traducción asociada al RE (Retículo Endoplasmático) y, por tanto, la entrada en la ruta de secreción. Las PR-10 son la única familia que se localiza en el citoplasma. Por otra parte, tal como se mencionaba anteriormente, algunos genes PR se expresan en tejidos concretos de la planta en ausencia de infección (flor, semillas, hojas senescentes) (Thomma *et al.*, 1999; Veronese *et al.*, 2003). Por ejemplo, diversas PRs como las PR-2 y PR-3 están presentes en los órganos florales y las PR-10 han sido detectadas en el polen de diversas especies. Una PR-2 es necesaria para el desarrollo del polen en tabaco y arroz (Worrall *et al.*, 1992). Ello sugiere que estas proteínas podrían realizar funciones en la biología de la planta más allá de participar en la respuesta de defensa (van Loon *et al.*, 2006).

3. HORMONAS REGULADORAS DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Las plantas producen una gran variedad de hormonas incluyendo auxinas, giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), citoquininas, ácido salicílico, jasmonatos, etileno, brasinosteroides (BR), estrigolactonas y hormonas peptídicas. Estas hormonas están implicadas no solo en la regulación del crecimiento y el desarrollo de la planta sino también en la respuesta a estreses bióticos y abióticos. Tradicionalmente se ha considerado que las hormonas implicadas en la respuesta a estreses bióticos son el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno. Estudios más recientes han mostrado que todas o prácticamente todas las hormonas vegetales

están implicadas en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos o herbívoros. El tipo de respuesta así como su intensidad y efectividad depende del tipo de patógeno, de manera que patógenos necrotrófos y biotrófos pueden desencadenar respuestas de defensa distintas en función de la(s) hormonas que regulan dichas respuestas (Glazebrook, 2005; Brodersen *et al.*, 2006).

La identificación y caracterización de mutantes defectivos en la síntesis, percepción o transducción de las hormonas vegetales ha sido clave para determinar su papel en la respuesta de defensa. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales las plantas integran los cambios en los niveles hormonales inducidos por el estrés e inician respuestas adaptativas son todavía poco conocidos (Bari y Jones, 2009).

3.1. Ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno

El ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos y herbívoros, así como también en la respuesta a estreses de tipo abiótico (p.e. herida o sequía) (Glazebrook, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant, 2007; Balbi y Devoto, 2008).

En términos generales, el SA es la molécula señalizadora para la activación de la defensa contra patógenos biotrófos o hemibiotrófos y para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida. En cambio, el JA y el ET se asocian habitualmente a la defensa contra patógenos necrotrófos y frente al ataque por herbívoros. Las vías del SA y el JA/ET son en muchos casos antagonísticas, pero existen evidencias de interacciones sinérgicas en algunos casos (Schenk *et al.*, 2000; Kunkel y Brooks, 2002; Beckers y Spoel, 2006; Mur *et al.*, 2006). Aunque la vía de defensa inducida por la planta es dependiente del estilo de vida del patógeno, no todos los patógenos pueden ser clasificados unívocamente en una u otra categoría. Por tanto, la comunicación entre las vías del SA y el JA/ET debe ser regulada de manera positiva o negativa dependiendo de la interacción de que se trate.

Las primeras evidencias de la participación del **SA** en la defensa de las plantas se obtuvieron a partir de las plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan el gen bacteriano *NahG*. Este gen codifica una salicilato hidrolasa (*NahG*; Gaffney *et al.*, 1993), enzima que convierte el SA en catecol. Las plantas *NahG* producen SA pero rápidamente lo degradan a catecol, acumulan bajos niveles de SA, presentan una expresión reducida de genes *PR* y son deficientes en la respuesta SAR (Delaney *et al.*, 1994). Estas plantas son más susceptibles a la infección por hongos,

bacterias, oomicetos y virus (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Kachroo *et al.*, 2000).

Los **jasmonatos** son hormonas lipídicas sintetizadas a partir de los ácidos grasos linoleico y linolénico mediante la **ruta de los octadecanoídes**. Son muchas las evidencias que demuestran que el **ácido jasmónico**, o su derivado el metiljasmonato (Me-JA), median la respuesta de defensa frente a determinados hongos y especialmente a insectos herbívoros sin embargo, el conocimiento de los mecanismos moleculares de transmisión de señal mediados por jasmonatos es muy limitado (Lorenzo y Solano, 2005).

El **etileno** es una hormona gaseosa reguladora de muchos procesos de desarrollo y de respuesta a estrés en plantas. Diversos estudios indican que JA y ET pueden actuar de forma sinérgica para activar la expresión de genes de defensa (Penninckx *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005; Lorenzo y Solano, 2005) y análisis realizados con micromatrices han mostrado que existe un importante solapamiento entre los genes inducidos por ambas hormonas (Schenk *et al.*, 2000).

Por otra parte se sabe que la inducción de la expresión de genes *PR* está regulada por diferentes vías de señalización en las que participan diferentes hormonas señalizadoras. Así hay genes *PR* cuya expresión está regulada por el SA, mientras que otros se asocian a las vías del JA y/o ET. A grandes rasgos, las familias PR-1, PR-2 y PR-5 se asocian a SA, mientras que las defensinas (PDF1.2, familia PR12) se consideran marcadores típicos de la respuesta mediada por JA/ET. De todos modos, esto no se aplica a todas las especies por igual. Mientras que en *Arabidopsis* se observa lo anteriormente indicado, en tabaco se ha demostrado que miembros de una misma familia pueden ser diferencialmente regulados por SA y JA/ET (Niki *et al.*, 1998).

3.1.1. Componentes de la vía de señalización mediada por el ácido salicílico

La caracterización de mutantes de *Arabidopsis* que muestran fenotipos alterados de resistencia/susceptibilidad a patógenos y presentan niveles alterados de SA, o son defectivos en la sensibilidad a SA, ha permitido la identificación de componentes de la vía de señalización mediada por SA. Entre estos mutantes podemos destacar al mutante *cpr5* (*constitutive expressor of PR genes 5*) que muestra expresión constitutiva de genes *PR* (Bowling *et al.*, 1997), o los mutantes *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*), *pad4* (*phytoalexin deficient 4*) y *sid2* (*salicylic acid induction deficient 2*) bloqueados en una etapa anterior a la síntesis

de SA (Nawrath y Metraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001). En concreto, el mutante *sid2* presenta una mutación en el gen *ICS1* (*isochorismate synthase 1*) implicado en la biosíntesis de SA (Wildermuth *et al.*, 2001). Las proteínas EDS1 y PAD4 son lipasas de triacilglicerol que interaccionan entre ellas (Feys *et al.*, 2001). La mutación *eds1* además suprime la resistencia mediada por genes *R* (Parker *et al.*, 1996).

El gen *NPR1* (*Non-Expressor of PR1*) es un gen regulador clave en la vía de señalización del SA (Cao *et al.*, 1994). *NPR1* también es conocido como *NIM1* (*NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1*) (Ryals *et al.*, 1997), o *SAI1* (*SALICYLIC ACID INSENSITIVE 1*) (Shah *et al.*, 1999). El gen *NPR1* codifica para una proteína que contiene un péptido de localización nuclear y dos dominios de interacción proteína-proteína (un dominio con repeticiones anquirina y un dominio BTB/POZ (Kinkema *et al.*, 2000). En condiciones normales (ausencia de infección), la proteína NPR1 se encuentra en el citoplasma en forma de oligómero. En respuesta a la infección, se observa una acumulación de SA que induce cambios en el estado redox de la célula, promoviendo la reducción de puentes disulfuro de la proteína NPR1, lo cual provoca la separación de los monómeros. En forma monomérica, la proteína NPR1 es translocada al núcleo donde interacciona con factores de transcripción de tipo TGA (Fan y Dong, 2002). Esta interacción estimula la unión de estos factores de transcripción a elementos de respuesta a SA presentes en los promotores de genes *PR*, activando así la expresión de dichos genes *PR*. Así el mutante *npr1* es defectivo en la respuesta SAR y no expresa los genes *PRs*, entre ellos el gen *PR1* se utiliza comúnmente como marcador de la SAR (Kogel y Langen, 2005).

NPR1 también modula la comunicación cruzada de la señalización mediada por SA y JA, y puede funcionar como un regulador que integra y ajusta la respuesta de defensa dependiendo de la naturaleza del patógeno atacante. Así, algunas dianas de NPR1 pueden ser reguladores negativos de la señalización por SA, como es el caso del gen *AtMPK4*. Este gen regula negativamente las respuestas de defensa asociadas a SA y positivamente las de JA (Petersen *et al.*, 2000). Otro ejemplo de genes moduladores de la respuesta de defensa son los factores de transcripción WRKY (Li *et al.*, 2004). Un ejemplo destacable es *WRKY70*. Este gen constituye un nodo de convergencia para la señalización mediada por SA y JA, ya que su expresión es inducida por SA y reprimida por JA. Se ha visto que la sobreexpresión del gen *WRKY70* provoca la expresión constitutiva de genes *PR* dependientes de SA y *NPR1* mientras que los genes activados por JA se encuentran reprimidos (Gong *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

Por otra parte, se sabe que la respuesta SAR es dependiente de la acción del SA el cual se acumula tanto local como sistémicamente en la planta infectada. La SAR también está asociada a un efecto de potenciación (*priming*), mecanismo por el cual la planta activa la respuesta de defensa de una manera más rápida y efectiva (Conrath *et al.*, 2002; van Hulten *et al.*, 2006; van Loon *et al.*, 2006).

3.1.2. Componentes de la vía de señalización mediada por el ácido jasmónico y el etileno.

El análisis de mutantes afectados en diferentes etapas de la señalización mediada por JA y ET, y el clonaje de los genes mutados han permitido identificar diversos componentes de la ruta de señalización del JA y del ET, así como demostrar el papel crucial de estas hormonas en la resistencia a determinados patógenos. Uno de estos mutantes es *coi1* (*coronatine insensitive 1*). *COI1* codifica una proteína con dominios F-box y LRR que forma parte de un complejo ubiquitina ligasa (E3). *COI1* tiene un papel central en la señalización por JA y su función es necesaria para todas las respuestas dependientes de JA conocidas, indicando que la degradación de proteínas mediada por el proteasoma tiene un papel central en la señalización por JA (Xie *et al.*, 1998; Feys *et al.*, 2001). La mutación *ein2* (*ET insensitive 2*) permitió identificar al primer regulador positivo y componente esencial en la señalización por etileno. El gen *EIN2* codifica una proteína nueva y específica de plantas que contiene dos dominios, un dominio N terminal hidrofílico implicado en la interacción proteína-proteína y un dominio C terminal hidrofóbico conservado en los transportadores de la familia N-ramp (Alonso *et al.*, 1999).

Por otra parte, diversos estudios indican que JA y ET pueden actuar de forma sinérgica para activar la expresión de genes de defensa (Penninckx *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook *et al.*, 2005; Lorenzo y Solano, 2005). Los factores de transcripción, *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*) y *AtMYC2/JIN1* (*JASMONATE INSENSITIVE 1*) participan en la señalización mediada por JA y ET en *Arabidopsis*. *ERF1* juega un papel clave en la integración de las señales de JA y ET durante la activación de las defensas de la planta. Así, la expresión de *ERF1* se induce tras la infección por patógenos necrotrofos y regula positivamente la expresión de genes de defensa como *PDF1.2* y *b-CHI*. La expresión constitutiva de *ERF1* es suficiente para conferir resistencia a diversos hongos necrotrofos (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). En cambio, *AtMYC2* induce la expresión de genes implicados en la respuesta a herida pero reprime la expresión de genes de defensa a patógenos (Lorenzo y Solano, 2005).

3.2. Ácido abscísico

El ácido abscísico está implicado en la regulación de procesos del desarrollo como la germinación, la maduración del embrión, la senescencia foliar, la apertura estomática, así como también en la adaptación a estreses ambientales (Wasilewska *et al.*, 2008). Varios estudios han demostrado que el ABA esta asociada a la respuesta de las plantas a estrés biótico causado por una amplia gama de patógenos de plantas (Mauch-Mani y Mauch, 2005; Asselbergh *et al.*, 2008) o insectos herbívoros (Thaler *et al.*, 2004; Bodenhausen y Reymond, 2007). No obstante, su función varía mucho en diferentes sistemas de interacción planta-patógeno. En muchos casos el ABA actúa como un regulador negativo de la respuesta de defensa, si bien, también se han descrito casos en los que actúa como un regulador positivo.

La caracterización molecular de las plantas de *Arabidopsis NahG* deficientes en SA reveló una expresión elevada de NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE5 (NCED5, enzima que cataliza la oxidación de 9-cis-xantofilas a xanthoxin, regulador clave en la biosíntesis de ABA). Estas plantas acumulan altos niveles de ácido abscísico endógeno. Los análisis adicionales demostraron que el ABA endógeno tiene un efecto sinérgico con JA y muestra una relación antagónica con SA durante el desarrollo de la enfermedad. A partir de este estudio se obtuvieron evidencias de que los niveles fisiológicos de ABA pueden desempeñar un papel importante en la modulación de diversas interacciones planta-patógeno (Fan *et al.*, 2009).

Otra evidencia de la implicación del ácido abscísico en la respuesta de defensa es el factor de transcripción de *Arabidopsis MYB96* que participa en la respuesta a sequía mediada por ABA. Existen evidencias a favor de una función de MYB96 en las respuestas al estrés biótico y abiótico en plantas. Así, se sabe que plantas que sobreexpresan MYB96 muestran mayor expresión en los genes implicados en la biosíntesis de SA y niveles elevados de SA (Seo y Park, 2010). Las líneas transgénicas para *myb96-1d* muestran una mayor expresión de genes *PR* y son resistentes a la infección por patógenos, mientras que el mutante deficiente para MYB96 (*myb96-1*) es más susceptible al ataque por patógenos. Con el fin de investigar el papel de MYB96 en relación a la señalización mediada por SA y ABA, se cruzaron líneas *myb96-1d* con las plantas transgénicas *NahG*, y se observó que el ABA, por medio de MYB96, induce la biosíntesis de SA, aumentando la resistencia a enfermedades de las plantas (Seo y Park, 2010). Estos resultados permitieron hipotetizar que MYB96 puede funcionar como un vínculo molecular en la señalización cruzada entre ABA-SA. En la actualidad, está aceptado que el ABA es

una molécula señalizadora en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos o herbívoros, sin embargo, los mecanismos concretos por los cuales esta hormona ejerce su función no están bien caracterizados.

3.3. Auxinas

Las auxinas son moduladores del crecimiento y el desarrollo vegetal que regulan numerosos procesos, como los tropismos a la luz y la gravedad, el crecimiento general de las raíces y la arquitectura del tallo, el patrón de desarrollo de los órganos o el desarrollo vascular (Woodward y Bartel, 2005). Debido a que muchos microorganismos patógenos de plantas producen auxinas (ácido indol acético, IAA) durante sus interacciones con las plantas, se propuso la participación de esta hormona en el desarrollo de la enfermedad (Spaepen *et al.*, 2007; Kazan y Manners, 2009). En un estudio para determinar el origen de IAA que se encuentra en plantas de tabaco infectadas *P. solanaceraum*, se pudo comprobar que la mayor parte del IAA que se detecta en la etapa inicial de la interacción es aportado por la planta huésped (Sequeira, 1965). Posteriormente se ha demostrado que las auxinas reprimen la expresión de genes *PR* lo que indica que las auxinas pueden modular la respuesta de defensa de la planta (Kazan y Manners, 2009). Existen también evidencias que indican que el SA podría interferir negativamente en la señalización dependiente de auxinas. Por ejemplo, se sabe que un análogo del SA, el THC (éster benzothiadiazole-s-metilo), inhibe la expresión de un número importante de genes implicados en el transporte, la recepción y la respuesta de auxinas. La expresión de la mayoría de estos genes también depende de *NPR1*, un gen regulador de la SAR mediada por SA. Además, el mutante *axr2* (*auxin resistant 2*) presenta una mayor resistencia a *P. syringae*, lo que sugiere que la vía de señalización de auxina promueve la susceptibilidad a este patógeno (Wang *et al.*, 2007; Kazan y Manners, 2009). Por otra parte, se sabe que las auxinas inhiben la expresión de *PR1* y que las plantas deficientes en SA (*NahG*) muestran niveles altos de IAA (Kazan y Manners, 2009). En definitiva, parece que el SA y las auxinas tienen funciones antagonistas en la defensa de la planta. Posiblemente detrás de este antagonismo entre la SA y la señalización de auxinas haya una razón evolutiva, por la cual las plantas en situaciones de infección deban desviar recursos a procesos relacionados con la defensa a expensas del crecimiento de la planta huésped (Kazan y Manners, 2009).

En contraste con la relación antagónica que se encuentra entre SA y auxinas, parece que JA y auxinas comparten muchos puntos comunes en la ruta de señalización e interactúan de manera positiva en la mayoría de casos en los que se

ha estudiado. Además, la represión de la señalización por auxinas ya sea por mutación en los componentes de la ruta de señalización o por interferencia en el transporte de auxinas, disminuye la resistencia de *Arabidopsis* a patógenos necrótrofos como *Plectosphaerella cucumerina* o *Botrytis cinerea*, sugiriendo que las auxinas serían necesarias para la defensa contra este tipo de patógenos. Esta respuesta sería independiente de SA y JA, ya que la expresión de genes marcadores de estas vías no está afectada en los mutantes de señalización de auxinas (Llorente *et al.*, 2008). Estos resultados apuntan que las auxinas podrían estar implicadas en la potenciación de la defensa frente a necrótrofos y en la atenuación de las respuestas de defensa frente a patógenos biótrofos (o hemibiótrofos). Adicionalmente, las auxinas regulan la expresión de genes asociados a la señalización de otras hormonas, tales como etileno, brasinoesteroides y giberelinas (Paponov *et al.*, 2008). Parece pues claro que todavía quedan muchos aspectos por aclarar para determinar de que manera las auxinas regulan la respuesta específica a diferentes tipos de patógenos y como interactúan con otras hormonas reguladoras de la defensa de la planta.

3.4. Giberelinas

Aunque las giberelinas fueron identificadas originalmente como la sustancia que producía el hongo patógeno de arroz *Gibberella fujikuroi*, no se ha prestado mucha atención al papel que juegan como reguladores de la respuesta de defensa. Se sabe que las giberelinas estimulan el crecimiento vegetal promoviendo la degradación de las proteínas DELLA que actúan como reguladores negativos del crecimiento. Recientemente se visto que las proteínas DELLA modulan las respuestas de defensa dependientes de SA y JA (Navarro *et al.*, 2008). El cuádruple mutante para proteínas de la familia DELLA es muy susceptible a patógenos necrótrofos (*A. brassicicola* o *B. cinerea*) pero más resistente a patógenos biótrofos (*P. syringae pv. tomato*). Además, en estos mutantes la expresión de genes marcadores de SA se produce antes y es más intensa que en las plantas silvestres, mientras que la expresión de genes marcadores de JA/ET se encuentra retrasada. También se ha visto que las proteínas DELLA inducen la expresión de genes detoxificadores de especies reactivas de oxígeno, regulando por tanto los niveles de ROS tras estímulos bióticos y abióticos (Bari y Jones, 2009).

3.5. Citoquininas

Las citoquininas regulan diferentes procesos del desarrollo de la plantas como la diferenciación vascular, la biosíntesis de cloroplastos, el crecimiento y ramificación

de las raíces, el tallo y las inflorescencias, la senescencia foliar, el desarrollo de las semillas, el balance nutricional o la tolerancia al estrés (Muller y Sheen, 2007). Aunque su papel en la regulación de la respuesta al estrés biótico está poco estudiado, existen indicios de que participan en este proceso. Se ha descrito que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *citoquinina oxidasa/deshidrogenasa*, muestran mayor resistencia a la infección por *Plasmodiophora brassicae* (Siemens *et al.*, 2006). Sin embargo, no se conoce el mecanismo mediante el cual las citoquininas pueden regular la respuesta de las plantas a patógenos (Siemens *et al.*, 2006). Además, se sabe que las citoquininas pueden actuar como inductores de la expresión de genes *PR*, y que son necesarias para la biosíntesis de SA y JA (Sano *et al.*, 1994). Estudios paralelos han observado que el efecto de las citoquininas es mediado a través de la estimulación en la producción de ET (Cary *et al.*, 1995).

3.6. Brasinosteroides

Los brasinoesteroides son hormonas estructuralmente relacionadas con las hormonas esteroideas animales implicadas en diversas respuestas celulares como la germinación, la elongación del tallo, el crecimiento del tubo polínico, la inhibición de la raíz, la inducción de la síntesis de etileno y maduración del fruto, y la diferenciación del xilema (Wang *et al.*, 2006). Su papel en el estrés biótico está poco estudiado, pero existen evidencias de su participación en el mismo. Así por ejemplo, se sabe que la aplicación de brasinosteroides aumenta la resistencia a diversos patógenos en tabaco y arroz (Nakashita *et al.*, 2003). Los brasinosteroides también han sido implicados en la regulación de la expresión de genes de defensa, así como en la biosíntesis de otras hormonas. Por ejemplo, genes implicados en la biosíntesis de etileno como la *ACC sintasa*, o del JA (gen *OPR3*), se inducen por brasinosteroides en *Arabidopsis* (Mussig *et al.*, 2006).

BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) y BKK1 (BAK1-LIKE 1) son dos proteínas quinasas ricas en regiones leucina (LRR-RLKs) implicadas en la transducción de la señal en brasinosteroides. BAK1 interacciona con el receptor de brasinosteroides BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) y media la transducción de señal inducida por estas hormonas (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002). Tres grupos independientes han demostrado la implicación de BAK1 en la regulación de la defensa basal y la muerte celular programada en plantas (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007; Kemmerling *et al.*, 2007). BAK1 se induce en respuesta a PAMP (flagelina) y en los mutantes *bak1* de *Arabidopsis* la producción de ROS en respuesta al tratamiento con flagelina está bloqueada (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007). Además los mutantes *bak1* presentan mayor susceptibilidad a patógenos necrótrofos como *A. brassicicola* y *B. cinerea*, pero mayor resistencia a

los biotrofos como *H. parasitica* que las plantas del tipo silvestre. Sin embargo, la aplicación exógena de brasinosteroides en los mutantes *bak1* no restaura el fenotipo y otros mutantes afectados en otros componentes de la vía de señalización de brasinosteroides no presentan afectada su respuesta a patógenos, indicando que BAK1 está implicado en este proceso de forma independiente de BR (Kemmerling *et al.*, 2007).

A pesar de todos los estudios realizados, todavía son muchos los aspectos que quedan por aclarar sobre la señalización mediada por hormonas y su implicación en la respuesta de defensa de las plantas. Dependiendo del tipo de la interacción planta-patógeno (biotrofos, necrótrofos, hemibiotrofos), las diferentes hormonas desempeñan un papel como reguladores positivos o negativos de la respuesta de defensa. Todavía no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes y muchas cuestiones permanecen aún sin respuesta. En la **Figura I3** se muestra un resumen de la función que se ha propuesto para las diferentes hormonas en la respuesta de defensa de las plantas y de la interrelación que existe entre ellas.

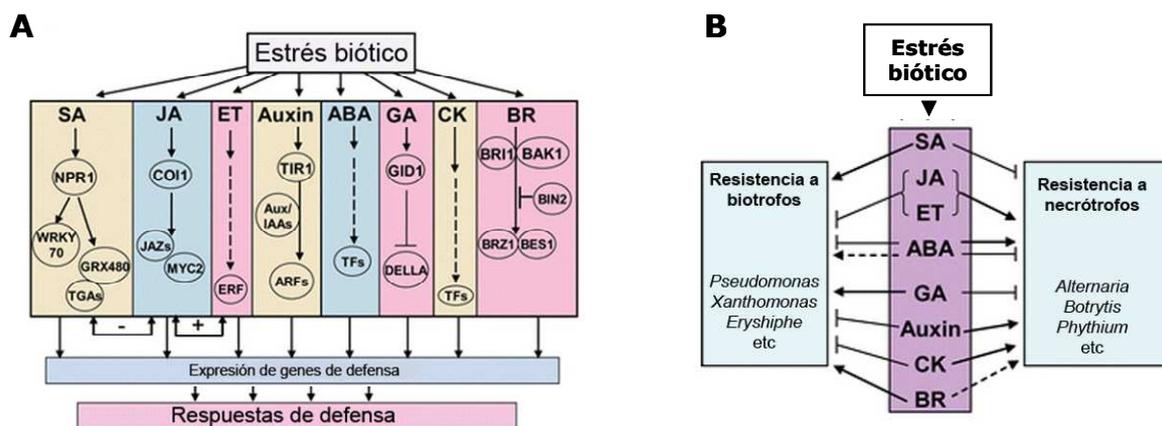


Figura I3: Hormonas señalizadoras de la respuesta de defensa de las plantas. A. Esquema de los principales componentes implicados en la señalización de diferentes hormonas en respuesta al estrés biótico. El signo más (+) indica una interacción positiva, mientras que un signo menos (-) indica interacción negativa. **B.** Resumen de la participación de las diferentes hormonas en la regulación positiva o negativa de la respuesta de defensa frente a patógenos biotrofos y necrotrofos. Abreviaciones: ABA, ácido abscísico; ARF, factores de respuesta a auxinas (*Auxine Response Factors*); Aux/IAA, auxina/ácido indolacético; BR, brasinoesteroides; BRI1, *BRIinsensitive 1*; BAK1, proteína quinasa 1 asociada BRI1; BIN2, *BR insensitive 2*; BRZ1, *Brassinazole Resistant 1*; BES1, *BRI1 Ems Suppressor 1*; CK, citoquina; COI1, *Coronatine Insensitive 1*; ERF factor de respuesta de etileno (*Ethylene Response Factor*); ET, etileno; GA, giberelinas; GID1, *gibberellin insensitive dwarf1*; JA, ácido jasmónico; MYC2, factor de transcripción; NPR1, *Non-expressor of PR1*; SA, ácido salicílico; TGA, factores de transcripción TGAs; TFS, factores de transcripción; TIR1, *transport inhibitor response 1*; WRKY70, factor de transcripción WRKY70. Tomado de (Bari y Jones, 2009).

4. PROTEÍNAS QUINASA DEPENDIENTES DE CALCIO (CPKs)

Las CPKs forman parte de una super-familia de quinasas de plantas con una función importante en la percepción de alteraciones en el nivel calcio intracelular. Además de las CPKs, otras proteínas sensoras de calcio en plantas son las calmodulinas (y proteínas relacionadas con la calmodulina o *calmodulin-like proteins*) y las calcineurinas. Sin embargo, las CPKs representan una clase única de sensores de calcio al presentar en una misma cadena polipeptídica un dominio quinasa y un dominio calmodulina, lo cual hace que estas proteínas tengan una doble función, la de sensores y transductores de la señal en respuesta a alteraciones en el nivel de calcio.

Las proteínas CPKs se encuentran en plantas, algas y protistas (Harper *et al.*, 2004; Harper y Harmon, 2005; Klimecka y Muszynska, 2007). Presentan cuatro dominios: un dominio N-terminal que es de longitud y secuencia variable entre las diferentes isoformas CPKs, un dominio **catalítico** Ser/Thr quinasa, un dominio autoinhibidor, y un dominio calmodulina **regulador** en C-terminal que contiene 4 dominios de unión a Ca^{+2} (4 *EF-hands*) (**Figura I4**). Otras proteínas relacionadas estructuralmente con las CPKs son las proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CCaMKs, Calcium/calmodulin protein kinases) y las proteínas tipo CPKs (CRKs, CPK-related protein kinases).

El genoma de Arabidopsis contiene 34 genes *CPKs* (Harmon *et al.*, 2000). En la **Figura I5A** se muestran las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes CPKs de Arabidopsis. Los 34 genes de Arabidopsis están distribuidos entre los cinco cromosomas, sin embargo, cinco de estos genes (*AtCDPK31*, *AtCDPK27*, *AtCDPK22*, *AtCDPK21* y *AtCDPK23*) se encuentran en tándem en el cromosoma 4 (**Figura I5B**). Todos ellos pertenecen al grupo II, lo que sugiere que han surgido por eventos de duplicación génica (Cheng *et al.*, 2002).

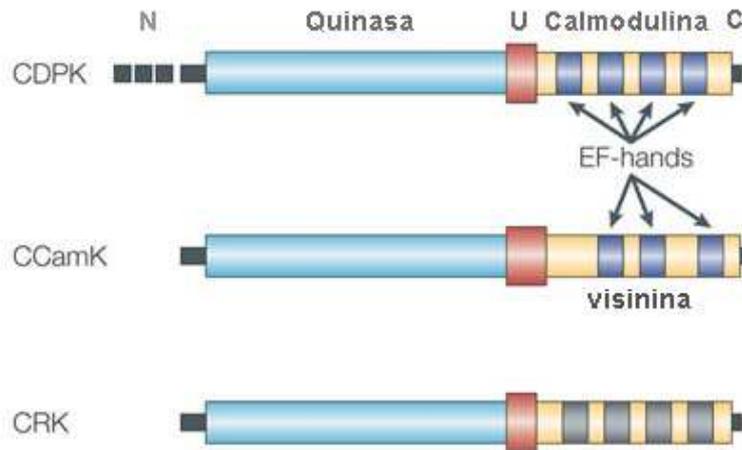
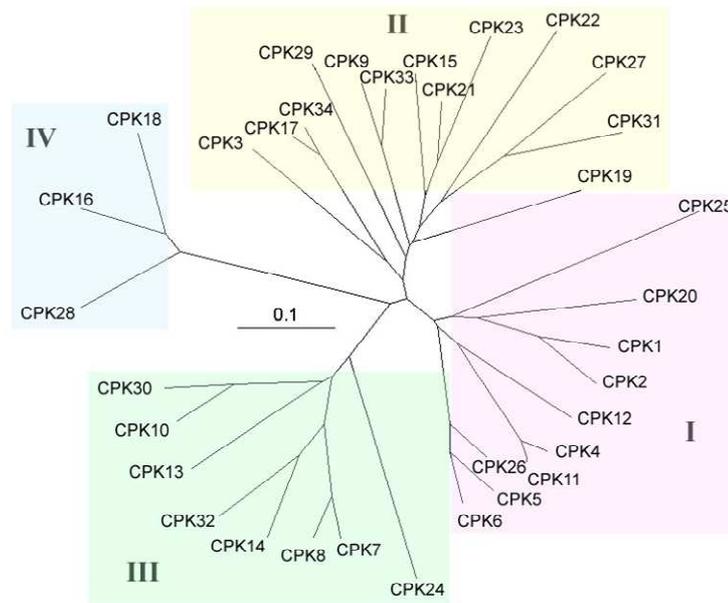


Figura I4: Características estructurales de proteínas CPKs, CCaMKs y CRKs. Las 3 quinasa presentan 5 dominios. El **dominio N-terminal (N)** es variable en secuencia y longitud. Los **dominios quinasa** (cajas azul claro) de las CPKs (o CDPKs) y CRKs están más relacionados entre sí que el de las CCaMKs. El **dominio de unión (U)** contiene un pseudosustrato autoinhibidor y un sitio de interacción con la proteína calmodulina (en CCaMKs y algunas CRKs) o para la unión intramolecular con el **dominio calmodulina** (en las CPKs) o el **dominio visinina** (en las CCaMKs). La principal característica distintiva de los tres grupos de quinasa es el dominio adyacente al dominio de unión. Las CPKs presentan un dominio calmodulina que presenta 4 dominios de unión a Ca^{+2} (4 *EF-hands*) en la mayoría de las isoformas (cajas azules oscuras). El dominio calmodulina de las CRKs presenta homología de secuencia con el de las CPKs, pero aparentemente ha degenerado y no es funcional (cajas grises). Las CCaMKs tienen un dominio visinina con tres dominios de unión a Ca^{+2} . Finalmente hay un **dominio C-terminal (C)** corto, cuya función es desconocida. Modificado de Harper y Harmon, 2005.

Las CPKs son proteínas monoméricas, con una masa molecular de 40 a 90 kDa. La estructura de los dominios catalítico y calmodulina se encuentra muy conservada entre las diferentes CPKs (Harmon *et al.*, 2000). De hecho, el dominio catalítico quinasa presenta casi un 100% de homología entre las 34 CPKs de Arabidopsis. Las diferencias más importantes en la secuencia de las CPKs se encuentran en la región N-terminal, cuya extensión varía desde los 21 a 185 aminoácidos y su homología entre un 15% a un 91%. (Harmon *et al.*, 2000). El dominio catalítico y el dominio calmodulina están unidos por un dominio autoinhibidor que contiene una secuencia pseudosustrato que interactúa con el centro activo e inhibe su actividad. El dominio regulador contiene 4 motivos de unión a Ca^{+2} (*EF-hands*) y es capaz de unir a cuatro moléculas. Finalmente hay una extensión C-terminal corta, también variable entre las diferentes CPKs (Klimecka y Muszynska, 2007).

A



B

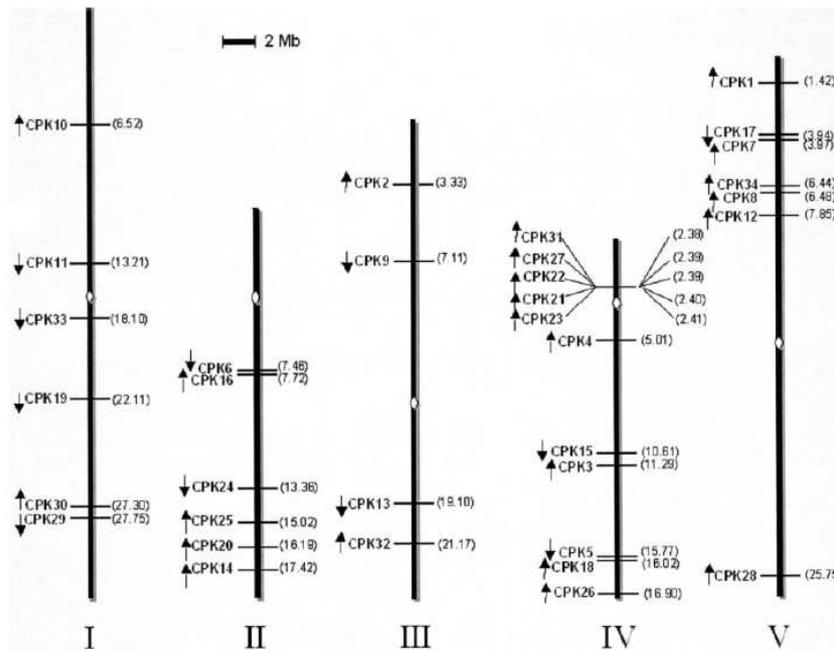


Figura I5: Relaciones filogenéticas de la familia de CPKs de Arabidopsis. (A). El árbol filogenético fue creado usando el programa ClustalW, basado en la predicción de secuencias aminoacídicas de CPKs de Arabidopsis. (B) Distribución de las CPKs en el genoma de Arabidopsis. Las flechas indican la dirección de la transcripción y los números la posición del primer exon de cada gen en megabases (tomado de Cheng *et al.*, 2002).

La presencia de familias multigénicas complejas para las CPKs vegetales indica que son necesarias múltiples isoformas de estas proteínas en la célula. Ahora bien, la regulación de un número tan elevado de genes capaces de responder a un

estímulo tan ubicuo como los picos de calcio, requiere un control muy fino tanto de su expresión como de su funcionalidad para poder conseguir las respuestas adecuadas. En consecuencia, las CPKs están reguladas a diversos niveles, desde la regulación de la transcripción hasta la regulación de la actividad de la proteína. Todos estos factores complican enormemente su estudio. Por eso, a pesar del elevado número de CPKs existentes en los genomas vegetales, en la mayoría de casos no se sabe en qué proceso (o procesos) participa cada CPK particular. En muchos casos tan sólo se conoce el patrón de expresión del gen, pero no los procesos en los que participa la proteína codificada por el gen, ni tampoco cuales son los sustratos sobre los que actúa.

4.1 Regulación de la actividad enzimática de las CPKs

El conocimiento actual acerca de las propiedades bioquímicas y actividad enzimática de las proteínas CPKs es relativamente limitado. Estos estudios se han realizado casi exclusivamente en la proteína AtCPK1 de Arabidopsis (anteriormente denominada AK1) y se han centrado en los mecanismos por los cuales el Ca^{+2} regula la actividad quinasa de AtCPK1 (Binder *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994; Christodoulou *et al.*, 2004; Chandran *et al.*, 2006).

4.1.1 Regulación por calcio

En ausencia de estímulos que hagan aumentar la concentración intracelular de Ca^{+2} , las CPKs presentan un nivel de actividad bajo debido a que el dominio inhibidor actúa como un pseudo-sustrato que bloquea el sitio activo del enzima (Harper *et al.*, 1994) (**Figura I6**). La unión de Ca^{+2} al dominio calmodulina induce un cambio conformacional que altera esta interacción, liberando el sitio activo y permitiendo la actividad enzimática (Harper y Harmon, 2005).

El dominio calmodulina de las CPKs consta, al igual que la proteína calmodulina, de 2 dominios estructurales: el lóbulo N (N-terminal) y el lóbulo C (C-terminal), que contienen 2 *EF-hands* cada uno. Mediante los estudios cristalográficos, Chandran y colaboradores (2006) determinaron que únicamente el lóbulo C se unía al dominio autoinhibidor. Además, anteriormente habían observado que el lóbulo C presenta una afinidad por el calcio significativamente mayor que el lóbulo N y que, por tanto, a las concentraciones basales de calcio existentes en la célula el lóbulo C estaría probablemente ya unido a calcio (Christodoulou *et al.*, 2004). El aumento de la concentración de calcio en respuesta a un estímulo determinaría la unión de calcio al lóbulo N que actuaría como el verdadero sensor. La unión de calcio al lóbulo N alteraría la interacción entre ambos lóbulos (N y C), haciendo que el dominio

autoinhibidor libere el centro activo de la quinasa permitiendo así que el enzima sea activo. Aunque los cambios estructurales que tienen lugar como resultado de la unión de Ca^{+2} aún no están totalmente claros, parece que serían diferentes del modo de unión típico de la proteína calmodulina. En la **Figura I6** se muestra un esquema de este mecanismo de activación.

Mecanismo de activación

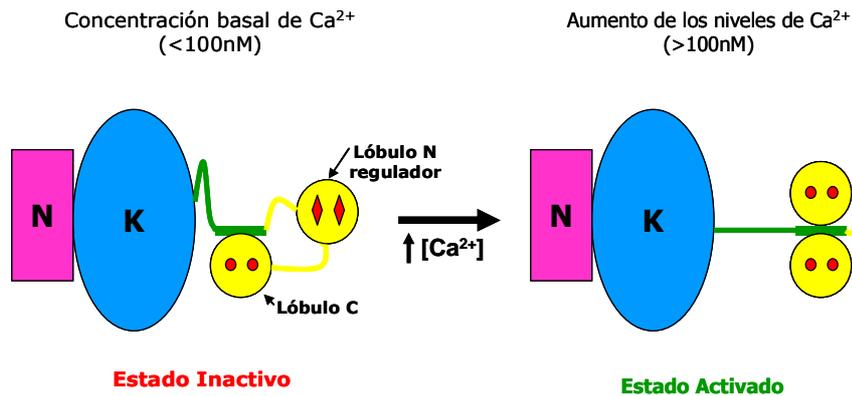


Figura I6. Modelo del mecanismo de activación de las CPKs. El dominio N-terminal se presenta en rosa (N), el dominio quinasa en azul (K), el dominio autoinhibidor en verde y el dominio calmodulina (CaM) en amarillo. Los lóbulos N y C-terminal del dominio CaM contienen 2 motivos de unión a calcio (*EF-hands*) cada uno (rombos: *EF-hands* libres de Ca^{+2} , círculos rojos, *EF-hands* unidos a Ca^{+2}). El lóbulo C del dominio CaM es capaz de unir Ca^{+2} a las concentraciones de Ca^{+2} basales (<100 nM). El lóbulo N sólo une Ca^{+2} cuando aumenta la concentración de éste en respuesta a un estímulo (>100nM). En el estado basal, el dominio autoinhibidor interacciona con el dominio quinasa (K) y bloquea la actividad enzimática. La activación tiene lugar cuando iones Ca^{+2} se unen a los 4 motivos de unión a calcio (*EF_hands*) del dominio calmodulina, provocando un cambio conformacional de la proteína que libera el centro activo de la quinasa. Adaptado de Harper y Harmon, 2005.

4.1.2 Regulación por fosforilación reversible.

Además del calcio, la fosforilación reversible y/o autofosforilación también regula la actividad enzimática de las CPKs. La autofosforilación *in vitro* de CPKs purificadas o expresadas en *E. coli* ha sido observada para casi todas las CPKs estudiadas (Harmon *et al.*, 2000), sin embargo, no está claro cómo esta autofosforilación regula su actividad. Por ejemplo, la autofosforilación *in vitro* es un prerrequisito para la activación de Ah-CDPK de cacahuete, pero por el contrario causa la inhibición de la actividad de WbCDPK en haba (Chaudhuri *et al.*, 1999). En la mayoría de las CPKs estudiadas, la autofosforilación es dependiente de calcio (Klimecka y Muszynska, 2007). Los sitios de autofosforilación han sido mapeados

en varias CPKs, y la mayoría de ellos se localizan en el dominio N-terminal variable (Hegeman *et al.*, 2006). Además, la relevancia funcional *in vivo* de los procesos de autofosforilación de las CPKs no ha sido analizada de forma exhaustiva. Tan solo para las proteínas NtCDPK2 y NtCDPK3 de tabaco se ha confirmado que la autofosforilación es requerida para su activación *in vivo* (Witte *et al.*, 2010).

Por otra parte, las proteínas CPKs también pueden ser fosforiladas por otras proteínas quinasas. Por ejemplo, en el caso de las proteínas NtCDPK2 y NtCDPK3 de tabaco se ha demostrado que no sólo son autofosforiladas sino que también son sustratos de otras quinasas, y por tanto, son componentes de cascadas de fosforilación de proteínas quinasas. La fosforilación de estas NtCDPK de tabaco por proteínas quinasas (aún no identificadas) es dependiente de estímulo, y de la apropiada localización subcelular (Witte *et al.*, 2010).

4.1.3 Regulación por fosfolípidos.

Estudios bioquímicos han puesto de manifiesto que en presencia de calcio ciertos fosfolípidos potencian la fosforilación *in vitro* de proteínas por CPKs en avena, *Arabidopsis* (AtCPK1), zanahoria (DcCPK1) y maíz (ZmCPK11), entre 2 y 30 veces por encima de la observada únicamente con calcio (Cheng *et al.*, 2002). Curiosamente los fosfolípidos que regulan la actividad quinasa no son los mismos para cada una de las CPKs estudiadas, lo que sugiere una especificidad en la interacción (Cheng *et al.*, 2002). Algunos de estos fosfolípidos actúan como segundos mensajeros en procesos de transducción de señales, y por lo tanto actúan a través de CPKs (Klimecka y Muszynska, 2007).

4.1.4 Regulación por proteínas 14-3-3.

Datos acumulados en los últimos años han demostrado que la fosforilación sola no es siempre suficiente para completar la transducción de la señal mediada por proteínas quinasas. En muchos casos, la proteína fosforilada debe asociarse con una proteína adaptadora especializada. Las proteínas adaptadoras mejor conocidas son las proteínas 14-3-3, las cuales son capaces de completar la acción reguladora de la fosforilación. Las proteínas 14-3-3 son ubicuas en eucariotas, y constituyen familias multigénicas. Por ejemplo en *Arabidopsis* se han identificado 12 isoformas 14-3-3. Experimentos *in vitro* han demostrado que tres isoformas diferentes de 14-3-3 se unen y activan AtCPK1 en presencia de iones calcio (Camoni *et al.*, 1998). En este sentido, el dominio N-terminal de AtCPK1 contiene una secuencia similar a la región consenso de unión 14-3-3, formada por R-S/T-X-S-X-P donde la Ser subrayada es fosforilada (Camoni *et al.*, 1998). Este sitio potencial de unión a proteínas 14-3-3

también está presente en otras dos CPKs de Arabidopsis, la AtCPK24 y AtCPK28, lo que sugiere que las proteínas 14-3-3 podrían estar regulando la actividad de un subconjunto de CPKs en Arabidopsis (Cheng *et al.*, 2002).

4.2. Expresión de genes CPKs

La información existente en la literatura indica que determinados genes CPKs se expresan de una forma ubicua, mientras que otros se expresan específicamente en determinados tejidos, o bien se inducen sólo en ciertos momentos del desarrollo y/o en respuesta a estímulos específicos (Klimecka y Muszynska, 2007). En líneas generales, la expresión de los genes CPKs está altamente regulada. De entre los 34 genes identificados en Arabidopsis, se ha confirmado la expresión para 30 de ellos (Cheng *et al.*, 2002).

Algunos ejemplos de genes CPKs que presentan patrones de expresión restringida a tejidos o estadíos del desarrollo concretos son un gen CPK de maíz que se expresa específicamente en polen (Estruch *et al.*, 1994), un gen CPK de arroz que se expresa en semillas (Kawasaki *et al.*, 1993; Frattini *et al.*, 1999) y un gen CPK de patata que se expresa en los estolones (Raices *et al.*, 2001). Además, resultados obtenidos por diversos laboratorios han puesto de manifiesto que determinados genes CPKs presentan variaciones de su nivel de expresión en respuesta a diferentes estímulos ambientales. Así, por ejemplo, se han descrito la expresión de genes inducibles por herida, p.e. *LeCDPK1* (Chico *et al.*, 2002); sequía p.e. *AtCPK10* y *AtCPK11* (Urao *et al.*, 1994); y salinidad o frío *OsCPK13*, (Saijo *et al.*, 2000). También se ha observado la inducción de CPKs en respuesta a hormonas, tales como giberelinas p. e. *OsCPK13* (Abbasi *et al.*, 2004); ABA, p.e. la *ACPK1* del mesocarpo de la uva (Yu *et al.*, 2006); auxinas, p.e. *NtCDPK1* (Yoon *et al.*, 1999); o JA, p.e. *StCPK2* (Ulloa *et al.*, 2002). Además se ha descrito la expresión de genes CPKs en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos, como el gen *NtCDPK1* (Yoon *et al.*, 1999) y el gen *LeCDPK1* (Chico *et al.*, 2002). En nuestro laboratorio se ha demostrado la inducción de genes CPKs concretos en la defensa de la planta de maíz gen *ZmCPK10*, (Murillo *et al.*, 2001) y de Arabidopsis gen *AtCPK1*, (Coca y San Segundo, 2010) frente a infección por hongos.

Aunque en la literatura se pueden encontrar numerosos estudios de la expresión de genes CPKs en respuesta a diferentes condiciones de estrés y en diferentes sistemas vegetales, la información sobre la actividad de las proteínas codificadas normalmente no está disponible. Son escasos los estudios que describen cambios en la actividad CPK en extractos proteicos de plantas, y no existen los que permiten determinar la actividad de una CPK individual. Algunos de estos estudios muestran actividad quinasa dependiente de calcio en respuesta a estrés osmótico (Takahashi

et al., 1997), frío (Martin y Busconi, 2001), embriogénesis (Anil y Rao, 2000), hormonas (Abo-el-Saad y Wu, 1995) o en respuesta a efectores específicos de patógeno (Romeis *et al.*, 2000). Aunque escasos, existen varios ejemplos en la literatura en los cuales se ha podido correlacionar la inducción de la expresión de genes *CPKs* concretos en respuesta a un estímulo con función biológica en la respuesta a dicho estímulo (ver más adelante en el apartado 4.5).

4.3. Localización subcelular de proteínas CPKs.

La Localización subcelular de las CPKs es muy diversa. Las CPKs se encuentran tanto en forma soluble como unidas a membrana, en el citoplasma, el núcleo, la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, los peroxisomas, las mitocondrias y los cuerpos lipídicos (Harper *et al.*, 2004). Estudios realizados en *Arabidopsis* con proteínas fusión CPK-GFP muestran que las proteínas AtCPK3 y la AtCPK4 se encuentran solubles en el núcleo y el citoplasma, AtCPK7, 8, 9, 16, 21 y 28 se encuentran asociadas a la membrana plasmática, mientras que la proteína AtCPK1 asociada a peroxisomas (Dammann *et al.*, 2003). Además, la proteína AtCPK2 se ha localizado asociada a retículo endoplasmático (Lu y Hrabak, 2002). Estudios recientes en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto una doble localización subcelular de la proteína AtCPK1, en los peroxisomas y cuerpos lipídicos (Coca y San Segundo, 2010). La multiplicidad de localizaciones hace que las CPKs tengan acceso a un gran número de sustratos potenciales y puedan participar en múltiples procesos de señalización.

Muchas CPKs contienen sitios de miristoilación y palmitoilación en el dominio N-terminal, por ejemplo en *Arabidopsis* 27 de las 34 isoformas contienen sitios potenciales de miristoilación en la glicina en la posición 2 del dominio N-terminal variable (Cheng *et al.*, 2002). La adición de grupos lipídicos puede promover la asociación de la proteína con las membranas celulares (Resh, 1999). Así para varias isoformas CPKs se ha demostrado experimentalmente que son aciladas, en concreto para las proteínas OsCPK2, LeCPK1 y AtCPK2 (Martin y Busconi, 2000; Lu y Hrabak, 2002; Rutschmann *et al.*, 2002). Además, la mutación del sitio de miristoilación (sustitución de la Gly en posición 2 por una alanina) resulta en la pérdida de la asociación a membranas en las proteínas OsCPK2 (Martin y Busconi, 2000), AtCPK2 (Lu y Hrabak, 2002), AtCPK1 (Dammann *et al.*, 2003; Coca y San Segundo, 2010) y NtCPK2 (Witte *et al.*, 2010). Por el contrario, isoformas que no contienen sitios potenciales de acilación, tales como AtCPK3 y AtCPK4, se encuentran solubles en el citoplasma o el núcleo (Dammann *et al.*, 2003). Estas evidencias sugieren que las modificaciones lipídicas en el dominio N-terminal desempeña un papel importante en la localización subcelular de muchas proteínas

CPKs. La localización en la membrana plasmática de algunas CPKs es importante, ya que muchos eventos de señalización se inician en la membrana plasmática (Cheng *et al.*, 2002).

Por otra parte, se han descrito cambios en la distribución subcelular de proteínas CPKs en respuesta a estrés. Esta situación ha sido observada en la planta *Mesembryanthemum crystallinum*, donde la proteína de fusión McCPK1-GFP se transloca del citoplasma al núcleo en respuesta a estrés salino y deshidratación (Patharkar y Cushman, 2006). Aunque no está claro si representa una traslocación de la proteína existente o corresponde a una nueva distribución de la proteína sintetizada *de novo*, claramente indica que la localización subcelular de las CPKs es dinámica. Resultaría interesante determinar si la relocalización de McCPK1 en el núcleo va asociada a cambios en su función en respuesta a estrés.

Las múltiples isoformas de CPKs pueden ser requeridas para mediar los procesos de señalización regulados por Ca^{+2} en los diferentes compartimentos subcelulares, formando parte de diferentes complejos proteicos. El complejo del proteasoma 26S representa el primer ejemplo de una CPK asociada a un complejo proteico específico (Harper *et al.*, 2004). Así se ha descrito la interacción entre la proteína NtCPK1 de *Nicotiana tabacum* con la proteína NtRpn3, subunidad reguladora de proteasoma 26S. Ambas proteínas se localizan en el núcleo, en la región periférica del mismo, y también en la proximidad de la membrana plasmática (Lee *et al.*, 2003). La variabilidad observada en el dominio N-terminal entre las distintas CPKs, sugiere que este dominio podría facilitar el anclaje de las CPKs a complejos proteicos específicos de isoforma y así mediar diferentes procesos de señalización.

4.4. Sustratos de las proteínas CPKs.

Ensayos de fosforilación *in vitro* han permitido identificar múltiples sustratos de fosforilación para las CPKs, que sugieren que las CPKs son multifuncionales y están implicadas en la regulación de diversos aspectos de la función celular. En la **Tabla I1** se presenta una lista de los sustratos descritos para CPKs. Estos potenciales sustratos las implican en el metabolismo del carbono y nitrógeno, la síntesis de fosfolípidos, la respuesta de defensa, el transporte de agua e iones, la organización del citoesqueleto, transcripción, fertilización y regulación por el proteasoma (Reddy y Reddy, 2004). Por señalar algún ejemplo, la enzima fenilalanina amonio liasa, implicada en la producción de compuestos de defensa en respuesta al ataque de patógenos, es fosforilada *in vitro* por AtCPK1 (Cheng *et al.*, 2001). Otro ejemplo es la fosforilación de una ACC sintasa de tomate, enzima que cataliza una etapa

determinante de la biosíntesis de etileno (Hernandez Sebastia *et al.*, 2004). En casi todos los casos, sin embargo las evidencias *in vivo* que corroboren los datos *in vitro* no están disponibles

Tabla I1. Potenciales sustratos de CPKs. Los sustratos fueron identificados a través de fosforilación *in vitro* y se agrupan de acuerdo a sus funciones biológicas (Klimecka y Muszynska, 2007).

POSIBLES SUSTRATOS	Origen CPK	REFERENCIAS
Metabolismo del carbono		
Sacarosa sintasa fosfato	Espinaca	McMichael <i>et al.</i> , 1995
Sacarosa sintasa	Soja	Nakai <i>et al.</i> , 1998; Zhang y Chollet, 1997
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	Maíz y soja	Ogawa <i>et al.</i> , 1998
Metabolismo del nitrógeno		
Nitrato reductasa	Espinaca	Douglas <i>et al.</i> , 1998; McMichael <i>et al.</i> , 1995
Metabolismo de fosfolípidos		
Activador PI 4-quinasa	Zanahoria	Yang y Boss, 1994
Biosíntesis de etileno		
ACC sintasa	Maíz	Hernandez-Sebastia <i>et al.</i> , 2004
Respuesta de defensa		
Componentes de Cf9/Avr9	Tabaco	Romeis <i>et al.</i> , 2001
Fenilalanina amonio liasa	Arabidopsis	Cheng <i>et al.</i> , 2001
Transporte de iones y agua		
Aquaporina	Espinaca	Huang <i>et al.</i> , 2001
H ⁺ -ATPase de la membrana plasmática	Avena y maíz	Camoni <i>et al.</i> , 1998; Harmon <i>et al.</i> , 1996
Canal de potasio KAT1	Haba	Li <i>et al.</i> , 1998; Berkowitz <i>et al.</i> , 2000
Ca ²⁺ -ATPasa (ACA2)	Arabidopsis	Hwang <i>et al.</i> , 2000
Citoesqueleto		
Factor de despolimerización de actina	Haba francesa	Allwood <i>et al.</i> , 2001
Transcripción		
Regulador de pseudorespuesta	Planta de hielo	Patharkar y Cushman, 2000
Regulación por el proteasoma		
Factor de regulación del proteasoma 26S	Tabaco	Lee <i>et al.</i> , 2003
Regulación de la fertilidad		
Auto-incompatibilidad RNAsas	Tabaco	Kuntz <i>et al.</i> , 1996
Actividad RNAsa		
Ser acetiltransferasa	Soja	Harmon, 2003

4.5. Posibles funciones de las proteínas CPKs.

Las CPKs se han implicado como reguladores de muchos procesos de señalización, como era de esperar para un grupo de proteínas multifuncionales con múltiples sustratos de fosforilación. Los estudios funcionales se han realizado con aproximaciones de ganancia y pérdida de función, que han resultado efectivas en algunos casos para demostrar la participación funcional de CPKs concretas en determinados procesos biológicos. Las estrategias de silenciamiento génico basadas en homología de secuencia, en las cuales no solo una enzima individual sino un grupo de genes filogenéticamente relacionados puede ser silenciado han sido

efectivas para asignar funciones a estos genes *CPKs*. Los estudios de ganancia de función mediante sobreexpresión o la expresión ectópica de quinasas activas constitutivamente (dominante positiva) o de quinasas inactivas (dominante negativa) han resultado igualmente útiles, aunque estos estudios han de considerarse con cautela debido a los efectos pleiotrópicos de la desregulación de una proteína quinasa. Es por ello, que en la mayoría de los casos se desconoce la isoforma de *CPK* reguladora de los diferentes procesos biológicos.

4.5.1. Participación de las proteínas *CPKs* en procesos de desarrollo.

Mediante la expresión antisentido de un oligonucleótido corto dirigido frente a un gen *CPK* de maíz expresado en polen Estruch y colaboradores (1994) demostraron su participación funcional en el desarrollo del tubo polínico. Aunque en este estudio no se determinó si solo se silenció ese gen *CPK* concreto, se demuestra que proteínas *CPKs* regulan este proceso biológico.

Asano y colaboradores (2002) demostraron la participación de una *CPK* de arroz, *SPK*, en el desarrollo de la semilla. El silenciamiento de *SPK* (expresión antisentido del gen *SPK*) en plantas de arroz bloquea la acumulación de almidón dando como resultado semillas que muestran un desarrollo retrasado sin que completen la etapa de desecación. Los autores proponen que *SPK* es una quinasa de la sacarosa sintasa que regula la biosíntesis de almidón.

Otro ejemplo de *CPK* asociada a una función concreta es la *HvCDPK1* de cebada. Mediante el uso de una versión mutante dominante negativa de la proteína, se demostró su participación en la diferenciación de la aleurona en respuesta a giberelinas (McCubbin *et al.*, 2004).

4.5.2. Participación de las proteínas *CPKs* en la apertura estomática.

Mori y colaboradores (2006) han demostrado que dos *CPKs* de *Arabidopsis* *AtCPK3* y *AtCPK6* expresadas en las células guarda de estomas, participan funcionalmente en la apertura estomática regulada por ABA. El ABA regula la apertura estomática induciendo cambios en los niveles de calcio citoplasmático. Estudios realizados con mutantes simples y dobles por inserción de T-DNA en los genes *AtCPK3* y *AtCPK6* muestran que estas quinasas regulan la actividad de los canales iónicos actuando como sensores de calcio y transductores de la señalización por ABA en estomas.

4.5.3. Participación de las proteínas *CPKs* en respuesta a estrés abiótico.

Se han identificado un gran número de *CPKs* de diferentes especies que son activadas transcripcionalmente en respuesta a estreses ambientales como frío, sequía y salinidad. Por ejemplo, en los últimos años se han descrito diversas *CPKs*

de *Arabidopsis* relacionadas con la respuesta a ABA y al estrés abiótico. Ma y Wu publicaron en 2007 que *AtCPK23* actúa como un regulador negativo de la respuesta a estrés hídrico y salino en *Arabidopsis*. Así, mutantes de inserción del gen *AtCPK23* mostraban una mayor tolerancia a sequía y salinidad, mientras que plantas sobreexpresantes de dicho gen mostraban una mayor sensibilidad a estos estreses. Simultáneamente, Zhu y colaboradores (2007) publicaron que las dos proteínas *AtCPK4* y *AtCPK11*, altamente homólogas, regulan positivamente la señalización mediada por ABA durante la germinación y la adaptación al estrés salino. Ambas quinasas son estructuralmente muy similares, presentan patrones de expresión y localización subcelular similares y fosforilan los factores de transcripción ABF1 y ABF4 (inducibles por ABA), sugiriendo que ambas funcionan de manera redundante en la misma ruta. Las mutaciones de pérdida de función resultan en fenotipos similares a los descritos de insensibilidad a ABA durante la germinación, el crecimiento de la semillas y el movimiento de los estomas, y aumento de susceptibilidad a estrés salino.

En arroz, se ha descrito que *OsCDPK7* (actualmente renombrada como *OsCDPK13*) tiene una función reguladora en la tolerancia a salinidad, sequía y frío (Saijo *et al.*, 2000). Los autores demuestran que la sobreexpresión de *OsCDPK7* en arroz confiere tolerancia a estos estreses abióticos, mientras que el silenciamiento de este gen reduce su tolerancia. Las líneas de sobreexpresión muestran un incremento transcripcional de genes marcadores de respuesta a estrés salino y sequía, pero no de respuesta a frío. Ello sugiere que la tolerancia a frío y a salinidad/sequía es promovida a través de vías de señalización diferentes y que ambas vías están interconectadas a nivel de *OsCDPK7*.

4.5.4. Participación de lasCPKs en la respuesta a estrés biótico.

Varias CPKs han sido relacionadas con la señalización de la respuesta de defensa en diferentes interacciones planta-patógeno. Entre ellas, podemos mencionar las *NtCDPK2* y *NtCDPK3* de tabaco. Los genes *NtCDPK2* y *NtCDPK3*, que presentan una gran homología entre ellos, se inducen transcripcionalmente y se activan bioquímicamente en respuesta a efectores (respuesta de defensa tipo ETI) y a estrés hiposmótico (infiltración de agua) (Romeis *et al.*, 2001). La expresión transitoria en hojas de tabaco de una versión activa constitutiva de *NtCDPK2*, pero no de *NtCDPK3*, desencadena la activación de reacciones defensivas (incluyendo la respuesta hipersensible, la producción de ROS y la expresión de genes de defensa) en respuesta a estrés hiposmótico (Ludwig *et al.*, 2005). La función de *NtCDPK2* en defensa está apoyada por la observación de que su silenciamiento resulta en una reducción de la respuesta de defensa (ETI) (Romeis *et al.*, 2001).

Trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación demostraron la activación transcripcional de *ZmCPK10* de maíz en respuesta a infección con el hongo *Fusarium moniliforme* y al tratamiento con elicitores. La activación de *ZmCPK10* es extremadamente rápida y transitoria, así como muy específica de tipo celular y tejido. Además, la expresión de *ZmCPK10* ocurre en los mismos tipos celulares en los se expresa el gen *PRms*, que codifica una proteína de defensa, en respuesta a infección. La estrecha correlación en el patrón de expresión entre ambos genes sugiere que *ZmCPK10* podría participar en la cascada de señalización de la respuesta a infección por hongos que conduce a la inducción de genes de defensa, como *PRms* (Murillo *et al.*, 2001).

Tal y como se ha comentado anteriormente (apartado 2.3), uno de los eventos más tempranos que tienen lugar tras el reconocimiento del patógeno es la producción de ROS debido a la actividad de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática. La activación de la NADPH oxidasa es dependiente de calcio y de fosforilación. Aunque la NADPH oxidasa puede ser regulada directamente por calcio (Kobayashi *et al.*, 2007), se ha observado que StCDPK5 de *Solanum tuberosum* podría estar directamente implicada en la activación de la NADPH oxidasa de patata (StRBOH). Se ha propuesto un modelo para la activación de StRBOH en el cual participaría StCDPK5 (Kobayashi *et al.*, 2007) que se muestra en la **figura 17**.

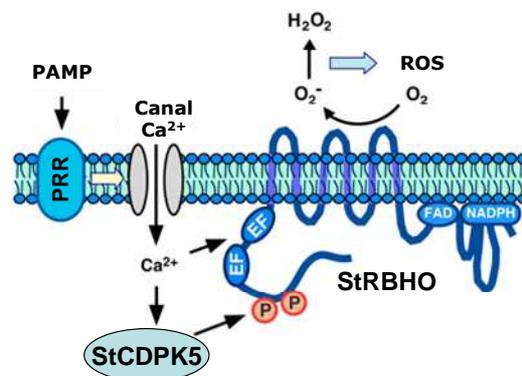


Figura 17: Modelo de regulación de StRBOH por StCDPK5. El reconocimiento entre la molécula elicitora (PAMP) y el receptor (PRR) induce la entrada de calcio en la célula. El aumento en el nivel de calcio es detectado tanto por la NADPH oxidasa (StRBOH) a través de los motivos EF-Hands situados en su región N-terminal y también por la proteína StCDPK5. La fosforilación de StRBOH por la CDPK tiene como resultado la producción de ROS. Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2007.

Finalmente, comentar que CPKs que son activadas por patógenos también podrían afectar el flujo de iones a través de membranas. Un ejemplo lo constituyen las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática que son reguladas, tanto por calcio

como por fosforilación. En concreto, mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que determinadas CPKs purificadas en remolacha (60KDa-50KDa) pueden fosforilar H⁺-ATPasas de la membrana plasmática (Lino *et al.*, 2006).

4.5.5. Intercomunicación en vías de señalización mediadas por CPKs.

Las plantas están sujetas a múltiples estreses que pueden darse de manera simultánea o sucesiva. Por eso es necesario que existan mecanismos reguladores para integrar todas las señales y adaptarse efectivamente a las múltiples situaciones posibles. Sin embargo, hasta el momento, las vías de transducción de señal han sido, generalmente, estudiadas de forma aislada para simplificar la interpretación, aunque lo cierto es que en la planta existe una intensa comunicación entre ellas. Así pues, sería más correcto hablar de redes de transducción en lugar de "vías" de transducción.

La comunicación cruzada (*cross-talk*) puede definirse como la interacción entre dos o más vías de transducción de señales. Esta interacción puede ser antagonista o sinérgica dando lugar a diferentes resultados. Probablemente la comunicación cruzada surgió como un mecanismo para ayudar a la planta a procesar adecuadamente el elevado número de estímulos ambientales a través de un número relativamente pequeño de mensajeros (Sanders *et al.*, 1999), minimizando así el gasto energético y creando una red flexible que le permita ajustar finamente su respuesta a los diferentes estímulos.

Las quinasas son buenas candidatas para actuar como mediadores de la comunicación cruzada entre las diferentes vías de transducción. La fosforilación puede tener efectos activadores o inhibidores en la actividad de las proteínas. Existen evidencias de que uno de los puntos en los que se produce la integración de señales es a nivel de las MAP quinasas. Diversos trabajos han demostrado la implicación de MAPK en la modulación de la respuesta a varios estreses. Por ejemplo, se ha visto que dos MAP quinasas integran la señalización en respuesta a herida, elicitores y ácido salicílico en tabaco (Romeis *et al.*, 1999) y que la OsMAPK5 de arroz modula de manera antagonística la respuesta al estrés biótico y abiótico en arroz (Xiong y Yang, 2003).

Las CPKs por ser sensores de un mensajero tan ubicuo como el calcio son también buenas candidatas para actuar como moduladores de diferentes vías de transducción. Además otras características como la modulación de su actividad quinasa por otros mensajeros como lípidos, y sus múltiples localizaciones subcelulares apoyan esta idea. Sin embargo, hasta el momento esta afirmación se ha demostrado en pocos casos. Un ejemplo podría ser el gen *OsCDPK7*, que participa en la respuesta a frío, salinidad y sequía en arroz (Saijo *et al.*, 2000).

Además existen indicios a través del análisis de expresión mediante micromatrices de la posible participación de la *OsCDPK7* en la señalización por estrés biótico (Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003).

Otro ejemplo lo constituye el gen *NtCDPK1* de tabaco. El gen *NtCDPK1* se induce transcripcionalmente por herida, tratamiento con hormonas, salinidad y elicitores fúngicos (Yoon *et al.*, 1999). Las plantas de tabaco con niveles reducidos de *NtCDPK1* muestran anomalías en la morfología celular y desarrollan lesiones espontáneas y un aumento de la expresión de genes de la respuesta de defensa (Lee *et al.*, 2003). Se ha propuesto que *NtCDPK1* modula la comunicación entre los procesos de desarrollo celular y la respuesta de defensa. La interacción de esta CPK y la subunidad reguladora del proteosoma 26S (*NtRpn3*) sugiere que podría regular la actividad del proteosoma, modulando así la degradación de componentes reguladores dependiendo del desarrollo y estímulos ambientales (Lee *et al.*, 2003). Existen también ejemplos de la intercomunicación entre vías de señalización mediadas por CPKs y MAPKs. Ludwig y colaboradores (2005) observaron que la actividad de la *NtCDPK2* de tabaco inhibía la señalización mediada por las MAP quinasas, WIPK y SIPK, en respuesta a estrés biótico. Más recientemente, un estudio en *Arabidopsis* ha demostrado que las rutas de señalización mediadas por MAPKs y CPKs actúan diferencialmente en cuatro programas activados por moléculas MAMP para el control de la activación de genes implicados en la síntesis de péptidos y compuestos antimicrobianos, modificaciones de la pared celular y señalización redox (Boudsocq *et al.*, 2010). Este estudio demuestra además que las *AtCPK4*, 5, 6 y 11 constituyen puntos de convergencia en la señalización activada por las moléculas PAMP. Los mutantes dobles, triples o cuádruples muestran una reducción en la producción de ROS, en la activación de la respuesta de defensa y una mayor susceptibilidad a infección por patógenos. En la **figura 18** se muestra un modelo de las vías de señalización mediadas por CPKs y MAPKs en la respuesta de defensa basal activada por moléculas PAMP.

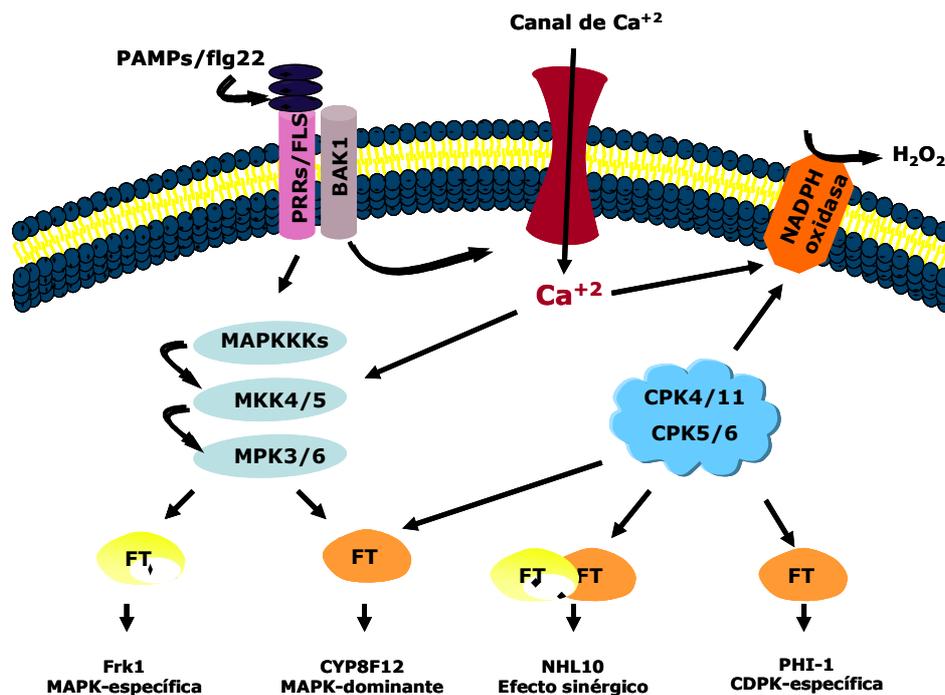


Figura 18: Modelo de las vías de señalización mediadas por MAPKs y CPKs durante la respuesta de defensa basal activada por moléculas PAMP. CYP8F12, *CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE*; Frk1, *FLG22-INDUCED RECEPTOR KINASE1*; NHL10, *NDR1/HIN1-LIKE10*; PHI-1, *PHOSPHATE-INDUCED 1*; TF, factores de transcripción. Esquema adaptado de Boudsocq *et al.*, 2010.

5. *ARABIDOPSIS THALIANA* COMO PLANTA MODELO PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO.

Arabidopsis thaliana fue descubierta en las montañas Harz (Alemania) en el siglo XVI por Johannes Thal quien la denominó originalmente *Pilosella siliquosa*. Es una planta dicotiledónea de la familia de las crucíferas (o brassicáceas). Son muchos los atributos que han hecho de esta planta un modelo de estudio en la biología vegetal entre los que cabe destacar: su pequeño tamaño, sus escasos requerimientos de crecimiento y un ciclo de vida corto, que permite acelerar los estudios, posee un genoma pequeño (125 megabases, distribuido en 5 cromosomas, $2n=10$), completamente secuenciado (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) y se transforma con facilidad. Ello ha permitido la generación de muchas herramientas para estudios de genómica funcional como colecciones de mutantes mapeados, una extensa base de datos de análisis de transcriptómica y un amplio repertorio de recursos informáticos integrados en bases de datos públicas que son accesibles en su mayoría desde la dirección electrónica del TAIR (siglas de *The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>).

Centrándonos en el tema de la interacción planta-patógeno, el modelo de estudio de *Arabidopsis* en su interacción con diferentes patógenos mediante la explotación de las herramientas genéticas, genómicas y transcriptómicas disponibles ha permitido profundizar considerablemente en el conocimiento de las redes de señalización implicadas en las respuestas de defensa. Así, se han identificado algunos de los principales componentes reguladores de los procesos defensivos a través de la caracterización de mutantes cuya resistencia o susceptibilidad a patógenos está alterada. Gracias a estos estudios se sabe que los diferentes agentes agresores activan diferencialmente las distintas rutas de señalización (Glazebrook, 2005). Las aproximaciones de análisis globales de expresión por micromatrices, han permitido identificar factores de transcripción, y patrones moleculares asociados a las vías de señalización. Así, cada ruta de señalización activa distintos grupos de genes de defensa. Estos estudios a su vez han mostrado que existe una interconexión entre las distintas rutas de señalización en una compleja red reguladora que permite a la planta sintonizar la respuesta más apropiada frente al agente agresor. Las investigaciones actuales se centran en entender cómo se interrelacionan las distintas rutas de señalización durante la respuesta de defensa.

Los estudios de esta tesis doctoral se han centrado en el patosistema *Arabidopsis*-*Fusarium oxysporum*. El género *Fusarium* comprende varias especies de hongos ampliamente distribuidos en suelos y sustratos orgánicos. Una de las especies más relevantes de este género es *Fusarium oxysporum*, que provoca el marchitamiento vascular y la pudrición de la raíz en más de 100 especies de plantas. Las plantas más afectadas por este hongo se encuentran en áreas tropicales y subtropicales, probablemente debido a que a temperaturas elevadas el marchitamiento es más pronunciado. Por lo tanto, como *F. oxysporum* crece mejor en ambientes cálidos, el calentamiento global puede hacer que esta especie afecte a zonas en las que hasta ahora no estaba presente (Berrocal-Lobo y Molina, 2008). Entre los más de 100 patovares (forma *specialis*, f. sp.) de *F. oxysporum* que han sido clasificados, tan sólo algunos son capaces de colonizar una amplia gama de plantas. La persistencia de la enfermedad se puede atribuir a que la resistencia parece ser genéticamente compleja (multigénica) Además *F. oxysporum* puede persistir en un campo afectado durante largos periodos de tiempo sobre la superficie de las plantas en forma de macroconidios, o incluso en el suelo como clamidosporas latentes en ausencia de una planta huésped adecuada.

F. oxysporum, al igual que otros agentes patógenos vasculares, coloniza las plantas a través de las raíces, induciendo una respuesta de defensa tanto local como sistémica. En la **figura 19**, se presenta un modelo de la red de señalización activada por la interacción entre *F. oxysporum* y *Arabidopsis thaliana* reguladora de

la respuesta de defensa. El mecanismo de percepción de *F. oxysporum* por la planta *Arabidopsis* sigue el concepto de resistencia basal activada por moléculas PAMP (tales como NEP1) a través de receptores tipo RPP (tales como RFO1) que inician toda la señalización posterior. El reconocimiento del hongo conduce a cambios en los niveles de calcio intracelular que activan tanto a peroxidasas como a NADPH oxidasas que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y resultan en la muerte celular o necrosis. Esta muerte celular permite al hongo *F. oxysporum* (necrotrofo) tener acceso a los nutrientes lo que contribuye al crecimiento del hongo y al desarrollo de la enfermedad. Las hormonas SA, JA, ET y ABA, parecen desempeñar una función esencial en la modulación de la respuesta de *Arabidopsis* frente a *F. oxysporum*. Varias evidencias genéticas apoyan que las vías del SA, JA y ET interaccionan de forma positiva en la activación de la resistencia a *F. oxysporum*. Finalmente, la activación de las distintas vías de señalización controla la expresión de los genes de defensa frente a *F. oxysporum*, tales como *PR1*, *PR5*, *PR4 (HEL)*, *PR3(CHI)*, *PDF1.2* (defensina) y *Thi2.1* (tionina), a través de diferentes factores de transcripción, tales como ATAF2, WRKY, ERF1, ERF2, ERF14 y MYC2. Estos factores de transcripción (TF) pertenecen a diferentes familias y desempeñan funciones reguladoras tanto positivas como negativas de la resistencia a *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

Activación de las vías de señalización a través del reconocimiento de PAMP

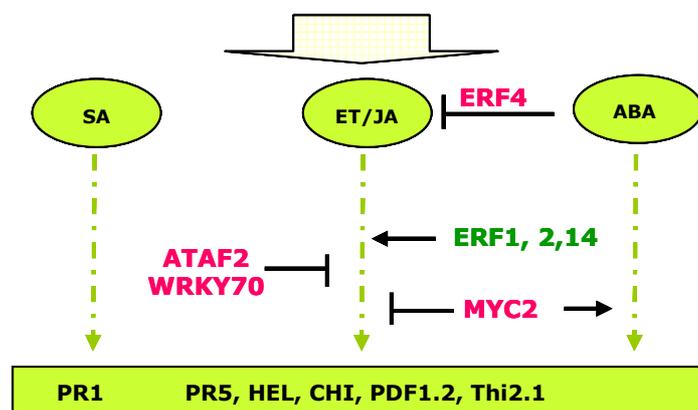


Figura I9: Procesos implicados en la respuesta de defensa en *Arabidopsis thaliana* frente a *F. oxysporum*. Las hormonas SA, ET, JA y ABA participan en esta respuesta modulando la expresión de los factores de transcripción ERF1, 2, 14 (reguladores positivos) y ATAF2, WRKY70, MYC2 y ERF4 (reguladores negativos) los cuales a su vez controlan la activación transcripcional de los genes de defensa. (Esquema adaptado de Berrocal-Lobo y Molina, 2008).

6. RESULTADOS DE PARTIDA EN EL GRUPO RELACIONADOS CON *AtCPK1*.

Al inicio de este trabajo, se tenían evidencias de que la expresión del gen *AtCPK1* de *Arabidopsis* se activa transcripcionalmente en respuesta a infección fúngica. Así pues, se plantearon nuevos experimentos para caracterizar en detalle la regulación de la expresión de *AtCPK1* en plantas de *Arabidopsis* infectadas por el hongo necrotrofo *F. oxysporum* y en respuesta al tratamiento con elicitores derivados de este hongo, así como también la posible regulación hormonal de su expresión. La información obtenida con estos estudios permitió a continuación abordar nuevos estudios para la identificación de proteínas que interactúan con *AtCPK1*, y que representan una parte importante de esta Tesis Doctoral.

Asimismo, en el laboratorio se habían generado líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *AtCPK1* y líneas que tienen silenciada su expresión mediante una estrategia de interferencia de RNA (líneas antisentido). Ensayos preliminares de infección con patógenos también sugerían que las líneas de sobreexpresión son más resistentes a la infección por el hongo *Fusarium oxysporum* mientras que las líneas silenciadas son más sensibles a la infección por este patógeno. Así pues, la validación funcional de *AtCPK1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* justificaba el interés por los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral con el fin de identificar los componentes de la vía de transducción de la señal mediada por *AtCPK1* en la defensa de *Arabidopsis*.





OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivos principales estudiar y caracterizar la regulación transcripcional y post-transcripcional del gen *AtCPK1* de *Arabidopsis thaliana*, así como la identificación de nuevos componentes de las rutas de transducción de señal que son activadas por la infección, y su interacción con la proteína AtCPK1.

Entrando en más detalle, los objetivos de nuestro estudio fueron los siguientes:

- Estudiar la expresión del gen *AtCPK1* en respuesta a la infección por el hongo *Fusarium oxysporum* y al tratamiento con elicitores fúngicos, así como a las hormonas implicadas en la respuesta de defensa de plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Análisis funcional del promotor *AtCPK1* en plantas transgénicas.
- Estudiar posibles mecanismos de regulación de la estabilidad y/o actividad de AtCPK1
- Identificación de proteínas que interaccionan con AtCPK1, o forman parte de los complejos en los que participa AtCPK1, y posible localización subcelular.





Resultados

Resultados



1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *AtCPK1* EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Se ha caracterizado el patrón de expresión del gen *AtCPK1* en respuesta a la infección fúngica, al tratamiento con elicitores fúngicos y al tratamiento con distintas hormonas vegetales mediadoras de la respuesta de defensa de la planta. Estos estudios se han llevado a cabo mediante ensayos de hibridación de RNAs fijados a un soporte sólido (ensayos *Northern-blot*). Posteriormente, se ha realizado un estudio funcional del promotor del gen *AtCPK1*, mediante el análisis de la expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa dirigido por el promotor del gen *AtCPK1* en plantas transgénicas de Arabidopsis.

1.1. EXPRESIÓN DEL GEN *AtCPK1* EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR EL HONGO *F. OXYSPORUM* Y AL TRATAMIENTO CON ELICITORES FÚNGICOS.

Se ha analizado la expresión del gen *AtCPK1* en plántulas de Arabidopsis del ecotipo Columbia 2 (Col2) cultivadas en condiciones estériles o de infección por el hongo *F. oxysporum*. Este hongo muestra una interacción de tipo compatible con el ecotipo Col2 de Arabidopsis. Para ello se crecieron las plántulas durante 15 días en cultivo *in vitro*. A continuación, las plántulas fueron infectadas con el hongo por rociado con una suspensión de esporas (10^5 esporas/ml) y se tomaron muestras a distintos tiempos de infección que fueron inmediatamente congeladas. La acumulación de los transcritos *AtCPK1* se analizó mediante ensayos *Northern-blot*. Las membranas se hibridaron con el fragmento de DNA correspondiente al dominio N-terminal variable de *AtCPK1* (**Figura R1A**). Ensayos *Southern-blot* realizados previamente en el grupo de investigación habían demostrado la especificidad de este fragmento de DNA, ya que es capaz de reconocer únicamente al gen *AtCPK1* pero no a otros genes *CPKs* de Arabidopsis. Se realizaron cuatro experimentos independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura R1B-C**. Este análisis mostró un nivel de expresión basal del gen *AtCPK1* en condiciones control, así como también una inducción de su expresión en respuesta a la infección fúngica que fue más acusada a tiempos tempranos de infección (3 h).

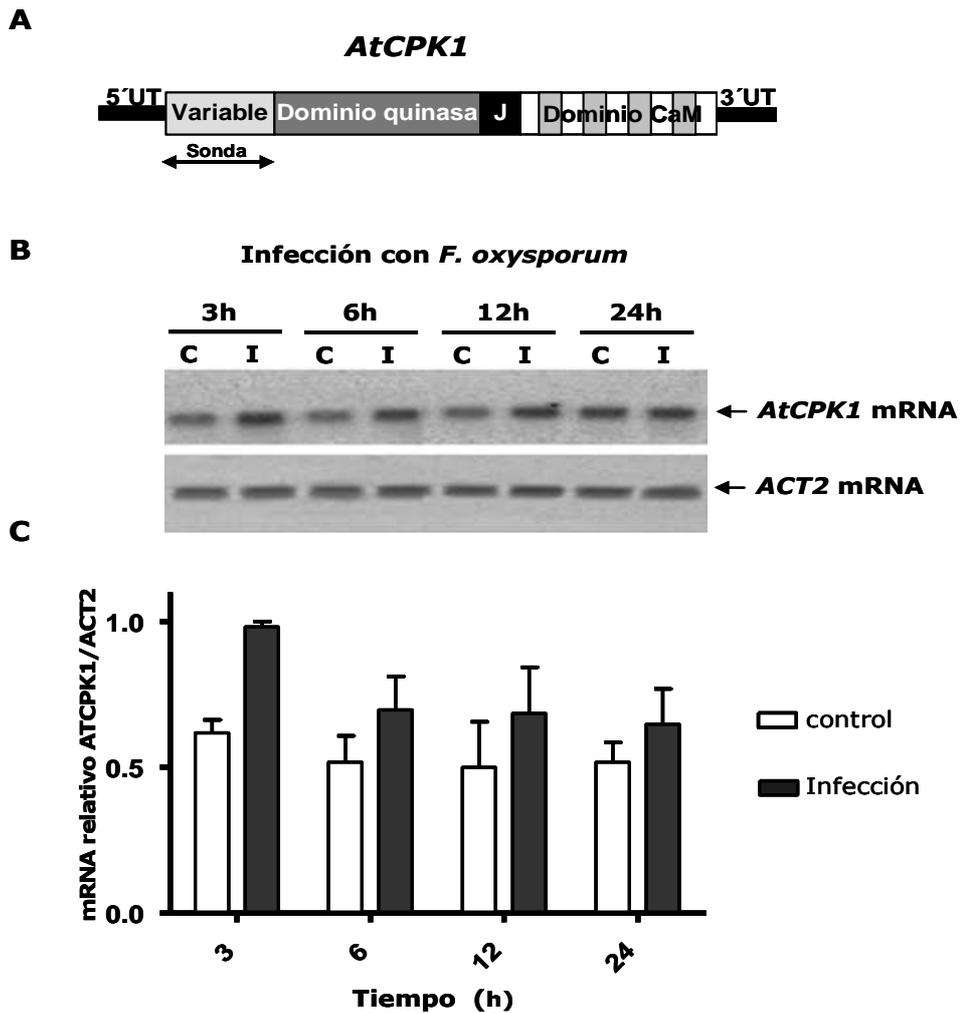


Figura R1. Expresión de *AtCPK1* en respuesta a infección con *F. oxysporum*. A. Esquema del mRNA *AtCPK1* donde se ha representado las secuencias 5' no traducidas (5'UT), el dominio N-terminal variable, el dominio quinasa, el dominio de unión (J) y el dominio calmodulina con los cuatro dominios de unión a calcio (cajas grises) y las secuencias 3' no traducidas (3'UT). Se indica el fragmento de DNA usado como sonda en los experimentos de *Northern blot*. **B.** Acumulación de los mRNAs *AtCPK1* en plántulas de 15 días de *Arabidopsis* controles (C) o infectadas (I) con esporas del hongo *F. oxysporum* (10^5 esporas/ml). Se tomaron muestras a distintos tiempos después de la infección (3, 6, 12 y 24 h). Las muestras de RNA total (15 μ g) se separaron en geles desnaturalizantes con formaldehído y transfirieron a membranas de Nylon. Las membranas fueron hibridadas bien con la sonda específica frente al gen *AtCPK1*, o bien con la sonda frente al gen *ACT2*. La figura es representativa de 4 ensayos independientes. **C.** Cuantificación de los niveles de acumulación de los mRNAs *AtCPK1*. Los valores fueron normalizados frente al gen de expresión constitutiva *ACT2*. Los valores obtenidos se normalizaron frente al valor más alto (asignado valor 1). Se representa la media de cuatro ensayos con réplicas biológicas independientes. La barra de error corresponde al error estándar de la media (SEM).

También se analizó el perfil de expresión del gen *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con elicitores obtenidos a partir de *F. oxysporum*. El tratamiento con elicitores desencadena una respuesta en las plantas mucho más rápida a la observada por infección fúngica. Se realizaron cuatro experimentos independientes. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura R2**. Se observó una inducción rápida de la expresión de *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con elicitores en plántulas de *Arabidopsis*. La inducción máxima se detectó a los 30 min después del inicio del tratamiento. A tiempos posteriores se mantiene la inducción de su expresión, si bien no hay una respuesta tan fuerte como a los 30 min de tratamiento respecto a las plántulas controles no tratadas.

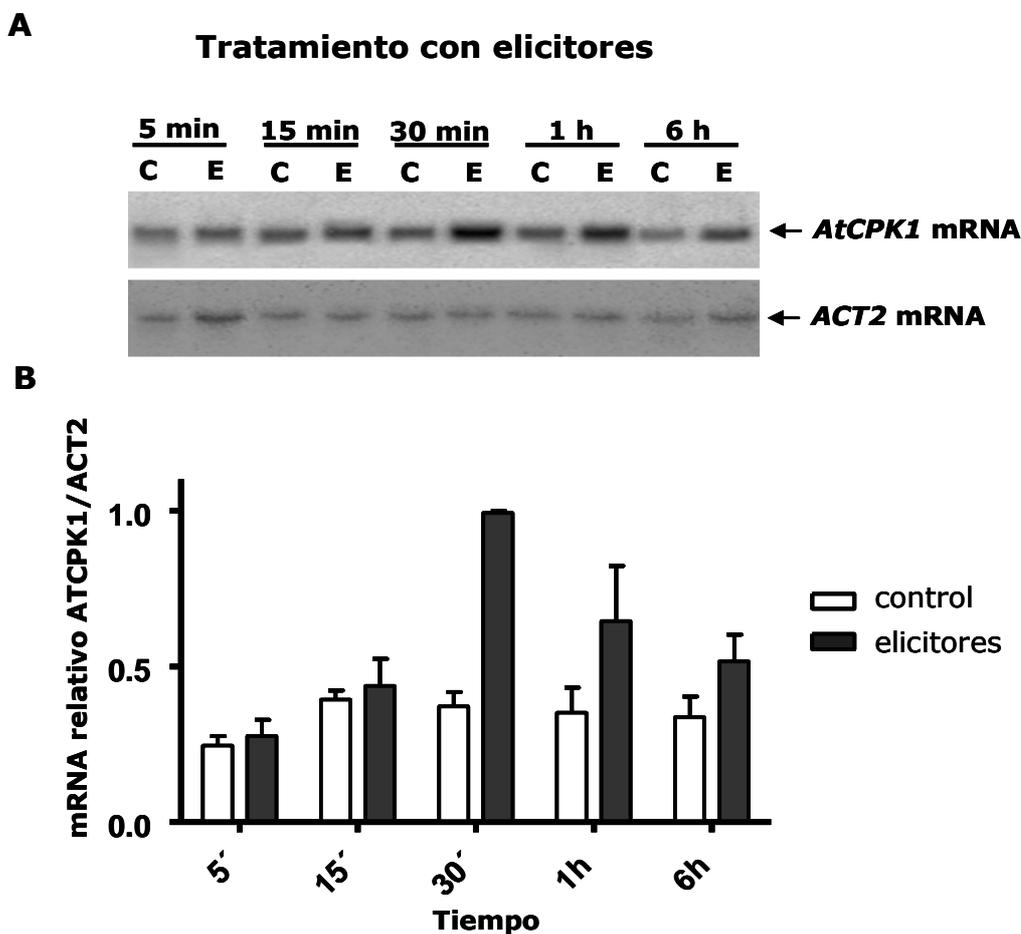


Figura R2. Expresión del gen *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con elicitores de *F. oxysporum*. **A.** Acumulación de los mRNAs *AtCPK1* en plántulas de *Arabidopsis* controles (C) o tratadas con elicitores (E) de *F. oxysporum* (concentración final 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a distintos tiempos de tratamiento (5 min, 15 min, 30 min, 1 h o 6 h). Las condiciones del análisis *Northern* son iguales a las descritas en la figura R1. **B.** Cuantificación de los niveles de acumulación de los mRNAs *AtCPK1*. Se representan el valor medio de 4 ensayos con réplicas biológicas independientes. La barra de error corresponde al error estándar de la media (SEM).

1.2. EXPRESIÓN DEL GEN *AtCPK1* EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HORMONAS

Tras observar la inducibilidad del gen *AtCPK1* en plántulas de *Arabidopsis* en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos y a la infección con el hongo *F. oxysporum*, se decidió analizar el efecto del tratamiento con hormonas señalizadoras de la defensa de las plantas. Las hormonas utilizadas fueron el ácido salicílico (SA), el metil jasmonato (MeJA), el ácido amino ciclopropano carboxílico (ACC), precursor del etileno, el ácido abscísico (ABA), así como las auxinas ácido diclorfenoxiacético (2,4D) y ácido indolacético (IAA). Los ensayos se realizaron con plántulas de *Arabidopsis* de 15 días (Col2) crecidas en condiciones estériles *in vitro*, que fueron tratadas con las hormonas antes indicadas. En paralelo, se prepararon las muestras controles con la correspondiente solución en la que estaban disueltas las hormonas (ver apartado 2.1 de Materiales y Métodos). Se tomaron muestras a distintos tiempos de tratamiento y se congelaron en N₂ líquido. La acumulación de los transcritos *AtCPK1* se analizó mediante ensayos *Northern-blot* utilizando la sonda específica frente *AtCPK1*. Se realizaron cuatro ensayos independientes. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura R3**. Se observó que el tratamiento con SA (**Figura R3A**), ACC (**Figura R3B**), MeJA (**Figura R3C**) y ABA (**Figura R3D**) induce pequeños cambios en los niveles de acumulación. En los cuatro casos el máximo de inducción se alcanza 1 hora después del inicio del tratamiento, retornando a niveles próximos a los de las plantas control en los tiempos posteriores.. En el caso de las auxinas, se observó también una ligera inducción con un máximo de inducción a la hora del tratamiento con 2,4D (**Figura R3E**) y una inducción mayor y algo más rápida (máximos de inducción a los 30 min) en respuesta al tratamiento con IAA (**Figura R3F**).

*En definitiva, los resultados mostrados indican que el tratamiento con las hormonas SA, ACC, MeJA, ABA, 2,4D y IAA induce una mayor acumulación de transcritos *AtCPK1*; si bien en todos los casos los cambios son suaves y transitorios, (30-60 min después del inicio del tratamiento).*

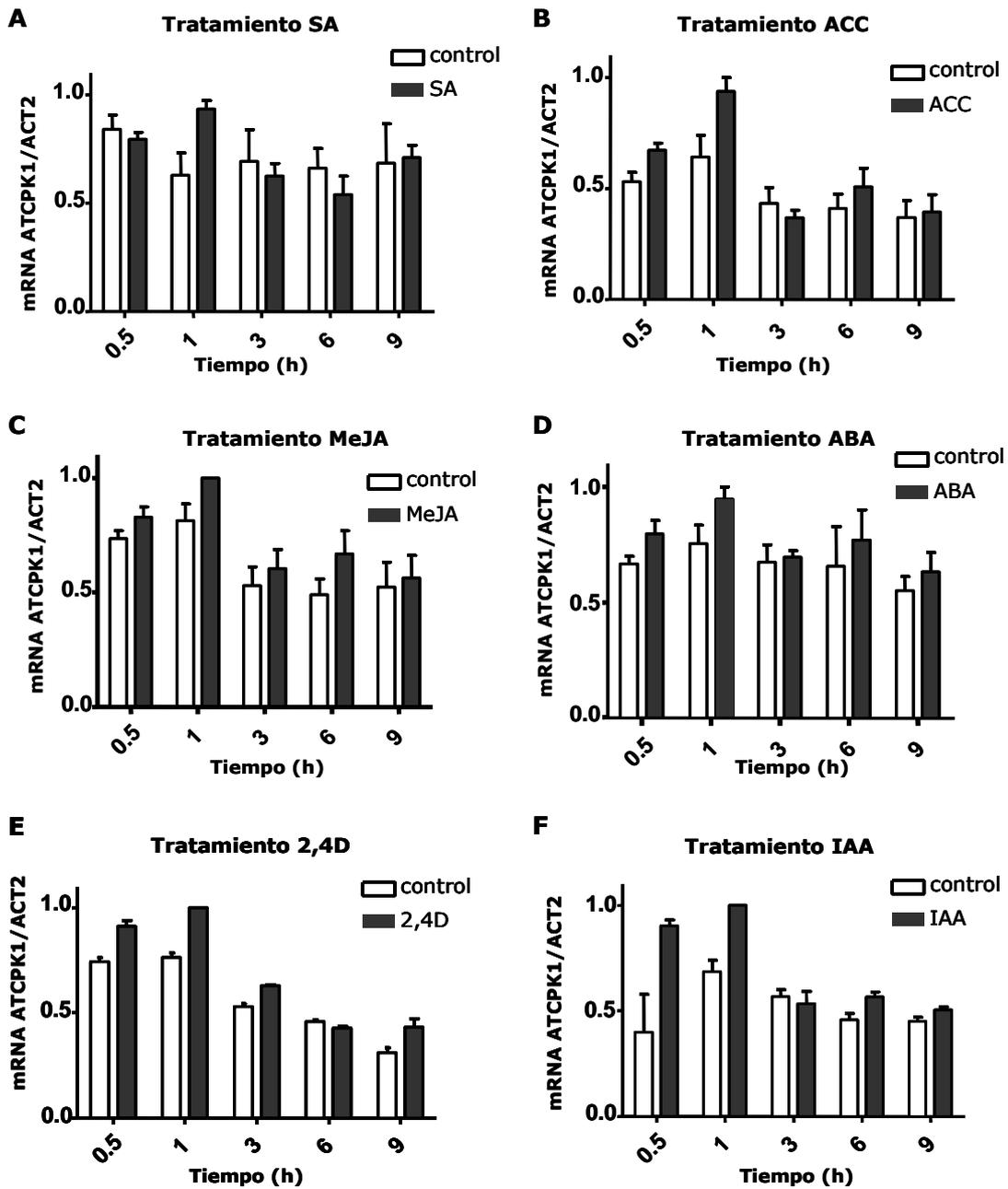


Figura R3. Expresión de *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con hormonas.

Cuantificación de los niveles de acumulación de los mRNAs *AtCPK1* en plántulas de 15 días de *Arabidopsis* control (barras blancas), o tratadas (barras negras) con las hormonas SA (10 mM, **A**), ACC (20 μ M, **B**) MeJA (100 μ M, **C**), ABA (100 μ M, **D**), 2,4D (50 μ M, **E**) y IAA (100 μ M, **F**) a los tiempos de tratamiento indicados. Condiciones del análisis *Northern* iguales a las descritas en la figura R1. Los valores fueron normalizados frente al gen de expresión constitutiva *ACT2* y frente al valor más alto (asignado valor 1). Se representan el valor medio de 4 ensayos con réplicas biológicas independientes. La barra de error corresponde al error estándar de la media (SEM).

1.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR *ATCPK1*.

1.3.1. Análisis *in silico* de la región promotora del gen *AtCPK1*.

Con el objetivo de identificar secuencias en la región promotora del gen *AtCPK1* que pudieran estar desempeñando una función reguladora de su expresión se realizó un análisis *in silico* de la secuencia del DNA situada 2000 pb antes del inicio de la traducción (**Figura R4**). Según se indica en la base de datos de Arabidopsis (TAIR: The Arabidopsis Information Resource: <http://www.arabidopsis.org>) el inicio de la transcripción está situado en la posición -461. Las secuencias 5' no traducidas (mostradas en azul en la figura R4) no se incluyeron en el análisis *in silico*. Los 388 pb anteriores al inicio de la transcripción corresponden a las secuencias intergénicas entre *AtCPK1* (At5g04870) y el gen anterior (At5g04880). El resto de las secuencias analizadas hasta la posición -1732 corresponden a las secuencias 3' del pseudogen At5g04880, orientado en el mismo sentido que *AtCPK1*. Estas secuencias se compararon con las secuencias depositadas en las siguientes bases de datos: PLACE (A database of plant cis-acting regulatory DNA elements <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>), PlantCare (A plant cis-acting regulatory element database <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), TFSEARCH (Searching transcription factor binding sites <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y AGRIS (Arabidopsis Gene Regulatory Information Service; <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>). Este análisis reveló la presencia de numerosos motivos en el promotor *AtCPK1* con homología a elementos reguladores en *cis* de la expresión de genes caracterizados y descritos en la literatura. En la figura R4 se indican algunos de estos motivos identificados, seleccionados por su potencial relevancia en la regulación de la expresión de *AtCPK1*. Señalar aquí que los elementos reguladores en *cis* funcionales se localizan cercanos a la secuencia codificante (Walther *et al.*, 2007). Así que los elementos identificados en los 500 pb proximales al inicio de la transcripción, básicamente los que corresponden a las secuencias intergénicas entre At5g04870 y At5g04880 probablemente tengan una mayor importancia reguladora.

-1732 TATTATGAAA GGTTGAGGCT CGTAAGTTTT TTGCTTATGA ACACATTTTT
 TCAAGGTAAG TTTCTCAATC TTCATGTTGT TGAAACATAT GATTCCTAGA
 -1632 GTATCTCTAC TCGTACCCCT CTCATAAATC ATTGTGTTTA AAGCCGAGCA
 TCTGCATGAT ATGTAAGGAT CTCTTGCGGT TCTCTTCTTG AGTCTCCAAA
 -1532 CTCCAGTTGA GATCCCTGGT GTTAGCAATA TGGTTTTCT CGAGAATATA
 GTATTTGATG CTAGGAACAG AAAACCTGGT CAGCCAAAGA TTGAGCCAAT
 -1432 GTAGGTGTCT TCGCGCATT GCAGTTAGA TGGTTTTGGA CTGTTACTTA
 GTTGATGGTG CACTCATA TATCTGATAT AGAATTGTGT TCATGCAGTT
 -1332 GGAGATTTA GAGGTGGCGA AAAGAAGCAT AAAGAGATT CTTCCATTTC
 AAGCGCAACA CATGATAAGA AAGGTGAGGG TTTTCTTACC TTATTTTCCC
 -1232 GTCAATGGAA GACACACACT TGAATACCGT CATTTCCCTT TCCACACTT
 GTTCTCTATT AGTGCATAA ACAGAATGCC GAATAGGTTA CTTTTCATTT
 -1132 TATAGTCATG ACTAGGAAAT TTGTTCCTC ATAGCAAGAT ATGAAACAG
TTGCAAATTT AATTTCGTCA TAGTGAAAAG GATCAATCAA GGAACAAGTA
 -1032 CGGAAAAGAT TGAGAATCTC TGTAATAAGG ATCATCTGTT TTTGGAGGTA
 CTTGGATGTT TACTTGATCA GGACGTGGCA GAGGCAATGA ACAGACTTTT
 -932 GTCACCAAAA AACGCTGTTG TGATGATTGA TAATCTACTA TCAGAACATA
 CTGCACTACA TCAAACCAAG TCTCATACAC ATCATAGTGA GCGTCTTTGC
 -832 CACAAATCAT ATCTTCTTAA ATACTGATT C AAACCACCAT CTCTTGATAA
 CAATAGTGAG CTTCGTTTTT GTTTTAGGCA AGCATTCTTT CCATATCAAA
 -732 TCAATAACAG AGTGTCCAGA GATTCATACC GTTCTATTGC AGTAGGGACA
 TCTCATTGGC TTATCTACTG GAAAAAGGAA GGGTGCTTGA GTGTTCCGTT
 -632 AGGACCAGCA AAAACAATGG AAAGTGGTGA TCATGATGTT TAGAACACCA
 AACTCGCCGT CTCTACAATA TTAGTCTGG TCTAGGTTTT GATCTTCAAT
 -532 AATAGCTGTG GTCGGAAGGA GTAATTAGGG TAAACATAA GGGCGAAGAC
 AAGAATGTGT AGAGCATGTG ATTTGTTCAA GCTTTAACAT GTGGATGTCT
 -432 TATTTTTAAT GACTGCTCTT TAATATGTGG GTTTGTTTG CGCATTTTTCT
 ACTTGCGGGT TATATTTTTTC AAAAGTAGTA AATGATGGGA CGATTATAAA
 -332 AAGGATGTTA TTAGGACTCC AGAAAGGAAA TTGATTTTAT GGAAATCACC
 CTTTTTACCT CAAAGTTTTA ATATATTACT AATTAAGTAC CCTTACATAA
 -232 GAAGCTGCGT TGCCAAGATT GAAGAGGGTG GTGGACTTTG TAATCAAAGA
 TTAATTAATAA AGAGAGTTAA GACAAATCTC AGCGGAAAAC TCGGCGGTGA
 -132 TAGATAATCA AAACAAAAGA AACGCGTTTT TCAAACTGGT TCAATCTTCT
 TCTTCGTCTT TCTTCATCGT CTCTTCTCT ATACAGACCT TGACTCTCTC
 -32 ATTAAATTAA CAAATGTCCC TACGGTTTAT GCAAGTGTAG TGCTATTAAA
CTATCCCTTT TATTTTCCCA CCCAACTCAA TTATTTTCT CATTCTTTCT
 +68 CTTACTCTT CTCAGATCT CTCTGTTCT TTCTTTGTTG TTGTTATCTG
GGGATGCTTT CTACTCTCTG TTTGGTTTCC TTCATTGTGA CTTCTATTT
 +168 TCTGGGTTTG TTCAAGTCA TGATTTTCC GATACCCTTT TGATTTTCT
TGCTATTTCT CACCTCTGTA TAAGCAAGCT CTCTGCTGTT TCTCCTCATC
 +268 CAAGTTGGGT TTATCAGTTC AGCTGTGTAG AAATTCAATC GTCTGAGAAG
TCCGAGGTTT GATGTCTGAT GGTTTTAAGA TCGAAAGGAT TGACTTTTTA
 +368 TCAGATTAGT AATGAGATTA GATTGTTTTT GAGTTATTG TAATCAGATC
TTGATGCTAT TTCTGGTGAA AGAGATTTAA GACAAGTTAG GGAATG GGT

Figura R4. Análisis *in silico* del promotor del gen *AtCPK1* (At5g04870). Se muestra la secuencia comprendida entre las posiciones -1732 y +461 respecto al inicio de la transcripción del gen *AtCPK1*. La región 5' no traducida se muestra en azul. La caja TATA se ha señalado en rosa y la caja CAAT en rojo. Las cajas coloreadas que se encuentran sobre la secuencia nucleotídica indican los elementos reguladores *in cis* identificados en el análisis *in silico*, según el código de colores indicado en la tabla I. Las secuencias mostradas en verde (subrayadas) corresponden a elementos de respuesta a luz. Las secuencias subrayadas en rojo corresponden a las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el clonaje del promotor *AtCPK1*.

Tabla RI. Elementos reguladores en *cis* identificados en la secuencia promotora del gen *AtCPK1*. Los motivos identificados se encuentran en orientación directa o inversa en una u otra cadena del DNA.

Elementos en <i>cis</i>	Secuencia	Función
Caja W	(T)TGAC(C/T)	Respuesta a elicitores, patógenos y herida
Motivo TGACG (as-1-like)	TGACG	Respuesta a SA
Sitio de unión a AtMYC2	CACATG	Respuesta a JA y patógenos
Caja GCC	AGCCGCC	Respuesta a etileno
Elemento ABRE	ACGTGGC	Respuesta a ABA
Elemento CE	AGCGT	Respuesta a ABA
NDESAUR	2 secuencias adyacentes TGTCTC y GGTCCTAT	Respuesta a auxinas
Motivo Wun	AAATTTCT	Respuesta a herida
Elemento GT-1	ATGGTGGTTGG	Respuesta a patógenos y estrés salino
Sitio de unión a MYB	TAACTG	Respuesta a sequía
Motivo GARE	AAACAGA	Respuesta a giberelinas
Caja GATA	TGATAG	Respuesta a luz
Elemento ARE	TGTTT	Respuesta a anoxia
Caja CAMTA	AACGCGT	Respuesta a calcio

En primer lugar identificamos **la caja TATA**, señalada en la secuencia en rosa. Este elemento encontrado en la mayoría de los genes eucarióticos es el sitio de unión de la RNA polimerasa II y determina el inicio de la transcripción. La secuencia consenso de este elemento es TATA y suele localizarse a 25-50 nucleótidos antes del inicio de la transcripción. En el caso del *AtCPK1*, la caja TATA se localiza en la posición - 49pb respecto al inicio de la transcripción (+1). También identificamos **una caja CAAT**, señalada en rojo sobre la secuencia del promotor *AtCPK1*, a unos 75 pb del inicio de la transcripción. Este elemento de secuencia consenso GGNCAATCT está conservado en la mayoría de los promotores, y parece ser un potenciador de la actividad transcripcional del promotor favoreciendo la unión de la RNA polimerasa.

Uno de los elementos más representado en el promotor *AtCPK1* es la **caja W** (señaladas en en la **figura R4** con sombreado rojo). Este elemento es el sitio de unión de los factores de transcripción WRKY (Eulgem *et al.*, 2000) Las proteínas WRKY son una familia de más de 100 miembros en Arabidopsis, implicados en la regulación de varios programas fisiológicos únicos en plantas, que incluyen defensa a patógenos, senescencia y desarrollo de tricomas. El dominio de unión a DNA está conservado entre los miembros de esta familia de factores de transcripción. Este dominio se une a la caja W de secuencia consenso (T)(T)TGAC(C/T). En el promotor *AtCPK1* se han encontrado 6 cajas W.

Varios de los elementos identificados en el promotor del gen *AtCPK1* corresponden a elementos de respuesta a hormonas mediadoras en la defensa frente a patógenos como son el SA, JA, ET o ABA (Lopez *et al.*, 2008). Entre ellos hemos identificado el **motivo TGACG**, localizado en duplicado en la cadena complementaria (secuencia con sombreado rosa, **figura R4**). Este motivo es conocido como motivo *as-1-like* por su relación con el elemento *as-1* encontrado originalmente en el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Qin *et al.*, 1994). El motivo TGACG se ha encontrado en los promotores de los genes *PR1a* de Arabidopsis y tabaco, y es el sitio de unión de los factores de transcripción de la familia TGA, factores del tipo cremallera de leucina (Gruner *et al.*, 2003). En Arabidopsis, tabaco y arroz los factores TGA interaccionan con la proteína NPR1 durante la respuesta SAR (Zhang *et al.*, 1999; Fan y Dong, 2002). En el caso del promotor del gen *AtCPK1*, se han encontrado dos elementos TGACG (posiciones -1063 pb y -1201 pb).

En el promotor *AtCPK1* también se ha encontrado un par de veces el motivo de unión del factor de transcripción **AtMYC2**, secuencia CACATG (indicados en la **figura R4** en lila). AtMYC2 es un activador transcripcional durante la señalización por ABA, y su motivo de unión se encuentra en muchos genes regulados por ABA (Abe *et al.*, 1997) y por JA durante la respuesta de defensa de Arabidopsis (Lorenzo *et al.*, 2004).

Otro elemento identificado corresponde a una **caja GCC** (secuencia sombreada en lila, en la **figura R4**). La caja GCC es un elemento encontrado en los promotores de genes inducibles por etileno que participan en la respuesta de la planta al ataque de patógenos, tales como los genes *PRs*. Además se ha demostrado que este elemento es necesario y suficiente para la regulación mediada por etileno de genes en una gran variedad de especies de plantas. Los factores de transcripción que se unen a las cajas GCC se conocen como ERFs (*Ethylene-Responsive Factors*) o proteínas EREBPs (*Ethylene-Responsive-Element-Binding-Proteins*) y median la regulación transcripcional tanto positiva como negativamente (Ohme-Takagi *et al.*, 2000).

Otro de los elementos presentes en la región promotora del gen *AtCPK1* es el **motivo ABRE** (*ABA Responsive Element*, se ha señalado en la **figura R4** con sombreado gris) con la secuencia ACGTGGC. Este motivo identificado en la región promotora de la mayoría de los genes que responden a la ácido abscísico (ABA), y es suficiente para conferir respuesta a ABA en un promotor mínimo. El motivo ABRE pertenece a la familia de las cajas G (G-box), posee un núcleo ACGT, secuencia reconocida por las proteínas bZIP de plantas, que contienen un dominio básico de

cremallera de leucina (Gomez-Porrás *et al.*, 2007). Se ha descrito que una única copia del elemento ABRE, como es el caso del promotor *AtCPK1*, no es suficiente para conferir inducibilidad por ABA. Así, se requieren múltiples motivos ABRE o combinaciones con elementos acopladores (**CE**, *coupling element*) para conferir respuesta a ABA en un promotor mínimo. En la secuencia del promotor *AtCPK1* se ha encontrado también un elemento CE. Cabe pues la posibilidad de que los motivos ABRE y CE podrían participar cooperativamente en la regulación de la expresión del gen *AtCPK1* por ABA.

En la zona proximal del promotor *AtCPK1* también se ha identificado un **elemento NDESAUR** formado por dos motivos adyacentes, el motivo TGTCTC y el motivo GGTCCCAT, este último localizado en la cadena complementaria (marcados en la **figura R4** con sombreado azul). Este elemento se ha localizado en los promotores de los genes SAUR (*Small auxine-up RNA*) y es el responsable de su inducibilidad por auxinas (Li *et al.*, 1994).

Además se han encontrado dos elementos de respuesta a calcio (secuencia AACGCGT, señalados con sombreado marrón en la **figura R4**). Estos elementos contienen el motivo de unión de factores **CAMTAs** (*CaM-binding transcription activators*). Los factores CAMTAs son factores de transcripción conservados evolutivamente que contienen varios dominios funcionales, un dominio de unión a DNA, un dominio calmodulina de unión a calcio y otros dominios implicados en la unión proteína-proteína (Galon *et al.*, 2010). El motivo CGCGTT, que contiene el núcleo del elemento CAMTA, encontrado en los elementos de unión a calcio del promotor *AtCPK1*, se ha descrito como elemento de respuesta rápida a estrés biótico y abiótico, por su capacidad de dirigir la expresión de genes reporteros en plantas transgénicas en respuesta a herida y a frío. Este elemento se ha encontrado en muchos genes que se inducen rápidamente en respuesta a estrés e implicados en la transducción de señales mediada por calcio de dicho estrés, tales como MAP quinasa 3 (MPK3) o la fosfatasa PP2C de Arabidopsis (Galon *et al.*, 2010).

También se ha identificado un **elemento Wun**, motivo AAATTTCTCT elemento de respuesta a herida (indicado en la **figura R4** con sombreado verde). Este elemento se describió originalmente en el promotor del gen *STH2* (*SALT TOLERANCE HOMOLOG 2*) de patata que codifica una proteína PR (Matton *et al.*, 1993).

Otro de los elementos encontrados en el promotor *AtCPK1* es un **elemento GT-1** (indicado en la **figura R4** con sombreado azul claro, secuencia ATGGTGGTTGG). Los elementos GT-1 fueron identificados originalmente en el promotor de la RubisCo de guisante como reguladores de la expresión en respuesta a luz, pero posteriormente se han encontrado en muchos promotores, muchos de ellos no

regulados por luz. La función reguladora de elementos GT en promotores de plantas aún no está claramente definida. A estos elementos *cis* se unen los factores GT, o proteínas de unión a DNA de triple hélice (*trihelix DNA-binding proteins*). Estas proteínas son específicas de plantas, lo que sugiere que están implicadas en la regulación de procesos específicos en plantas (Ayadi *et al.*, 2004). Se ha descrito como la interacción entre el motivo GT-1 y el factor de transcripción AtGT-3b activa la expresión rápida del gen *SCaM-4*, que codifica una calmodulina de soja, en respuesta al patógeno *P. syringae* y a estrés salino (Park *et al.*, 2004b).

Otros motivos encontrados en el promotor *AtCPK1* corresponden a **motivos MYB** (indicados en azul y subrayados en la **figura R4**), reconocidos por factores de transcripción del tipo MYB. La extensa familia de factores de transcripción MYB participa en la regulación del metabolismo secundario, el control de la morfogénesis celular, la regulación para la formación de meristemas, el desarrollo floral y el control del ciclo celular, entre otros procesos, aunque algunos de sus miembros fueron también implicados en defensa y en respuesta a estrés abiótico (Du *et al.*, 2009).

Se han identificado dos motivos con la secuencia AAACAGA correspondientes a elementos de respuesta a giberelinas, los **elementos GARE** (subrayados y resaltados en negrita en la secuencia del promotor *AtCPK1*). Estos elementos reguladores en *cis* son necesarios y suficientes para la regulación de la expresión del gen REP-1, que codifica una proteinasa de cisteínas de arroz por giberelinas (Sutoh y Yamauchi, 2003).

En el promotor del gen *AtCPK1* se encuentran varios elementos de respuesta a luz (**Figura R4**, indicados en verde y subrayados). Se destaca la **caja GATA** (marcada con sombreado verde en la **figura R4**) reconocida por los factores de transcripción tipo GATA y presente en muchos genes de expresión dependiente luz (Reyes *et al.*, 2004).

Finalmente, se han identificado los **elementos ARE** (señalados en marrón y subrayados en la **figura R4**) implicados en la respuesta a anoxia. Estos elementos se han encontrado mediante un análisis *in silico* de 13 genes anaeróbicos implicados en la ruta fermentativa (Mohanty *et al.*, 2005).

Así pues, el análisis in silico del promotor del gen AtCPK1 ha permitido identificar una serie de elementos en cis para los cuales se ha demostrado una función reguladora de la expresión en diferentes genes vegetales en condiciones de estrés ambiental, tanto de tipo biótico como de tipo abiótico, o en respuesta a hormonas.

1.3.2 Obtención y análisis de plantas transgénicas que expresan el gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*) bajo el control del promotor *AtCPK1*

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización funcional del promotor del gen *AtCPK1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Para ello, se preparó una fusión transcripcional del promotor del gen *AtCPK1* al gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*) a su vez fusionado al gen que codifica la proteína fluorescente GFP. A continuación se obtuvieron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen quimérico *promAtCPK1:GFP-GUS*.

Para la preparación del gen quimérico se obtuvo la secuencia de la región 5' flanqueante del gen *AtCPK1* y la región 5' no traducida (5'UT) en su totalidad (fragmento comprendido entre las posiciones -1732 y + 461, respecto al inicio de la transcripción, ver **figura R4**). El fragmento de DNA se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de plántulas de *Arabidopsis* del ecotipo Col2, utilizando los cebadores específicos señalados en la **figura R4**, extendidos en sus extremos con las secuencias del sitio de restricción *SmaI*. El fragmento de PCR se clonó en el vector pGeM-T easy y las secuencias fueron confirmadas mediante secuenciación. El fragmento liberado por digestión con la enzima de restricción *SmaI* se subclonó en el vector binario pCambia1304 previamente digerido con *SmaI* (la digestión *SmaI* del plásmido pCambia1304 elimina el fragmento correspondiente al promotor *CaMV-35S* que dirige la expresión del gen reportero de fusión *GFP-GUS*). Así, en el plásmido recombinante obtenido (pCAMBIA 1304: *promAtCPK1:GFP-GUS*), las secuencias del gen *AtCPK1* (-1732/+ 461) regulan la expresión del gen de fusión *GFP-GUS* (**Figura R5**). La construcción obtenida fue verificada mediante secuenciación con oligonucleótidos específicos.

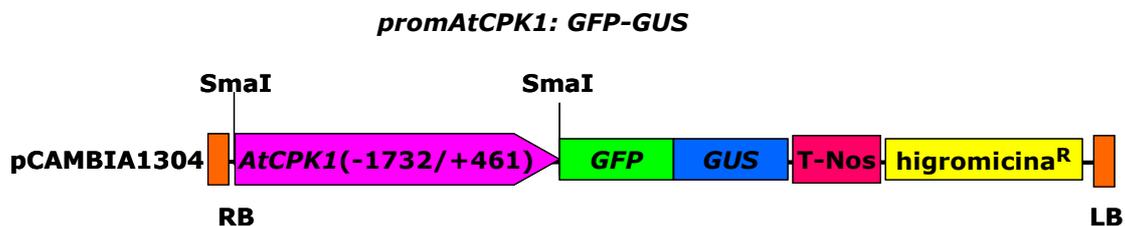


Figura R5. Representación esquemática de la construcción pCambia1304:*promAtCPK1:GFP-GUS* utilizada para la transformación de *Arabidopsis*. Se indican los extremos del T-DNA (RB y LB) y los sitios de restricción (*SmaI*) utilizados para la clonación del promotor y la región 5' no traducida del gen *AtCPK1* en el vector binario pCambia1304.



El plásmido obtenido se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis* de la variedad Col2 vía *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el método de agroinfiltración floral (Clough y Bent 1998). Las semillas recogidas de las plantas infiltradas se sembraron en medio selectivo con el antibiótico higromicina. Se recuperaron las plantas resistentes a higromicina. De ellas, se seleccionaron 6 líneas transformantes independientes (líneas 1, 2, 5, 8, 9 y 10) consideradas como representativas, para las que el carácter de resistencia al antibiótico seguía una segregación mendeliana 3:1, por lo que se estimó que solo habían integrado una copia del transgen. Se obtuvieron plantas homocigotas en la generación T2 para estas 6 líneas independientes, con las que se realizaron los estudios histoquímicos para detectar la actividad GUS que se presentan a continuación.

En primer lugar se analizó la actividad del promotor *AtCPK1* durante estadíos tempranos del desarrollo vegetativo en las 6 líneas transgénicas seleccionadas mediante detección de la actividad GUS con ensayos de tinción histoquímica. Se analizaron plántulas de 2, 4, 6, 9, 12 y 15 días crecidas en condiciones estériles. Se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en la **figura R6**, que corresponden a plántulas de la línea 10. No se detectó actividad GUS en tejidos de plántulas de 2 y 4 días (resultados no mostrados). A partir de los 6 días, se detecta un nivel bajo de actividad GUS que se mantiene a los 12 días y que aumenta ligeramente a los 15 días. Esta actividad GUS se detectó principalmente en los haces vasculares de las raíces. Solo se observaron pequeñas diferencias cuantitativas entre las distintas líneas transformantes analizadas, con niveles muy bajos de expresión en todos los casos y con el mismo patrón de expresión del gen reportero para el período de crecimiento analizado (hasta plántulas de 15 días).

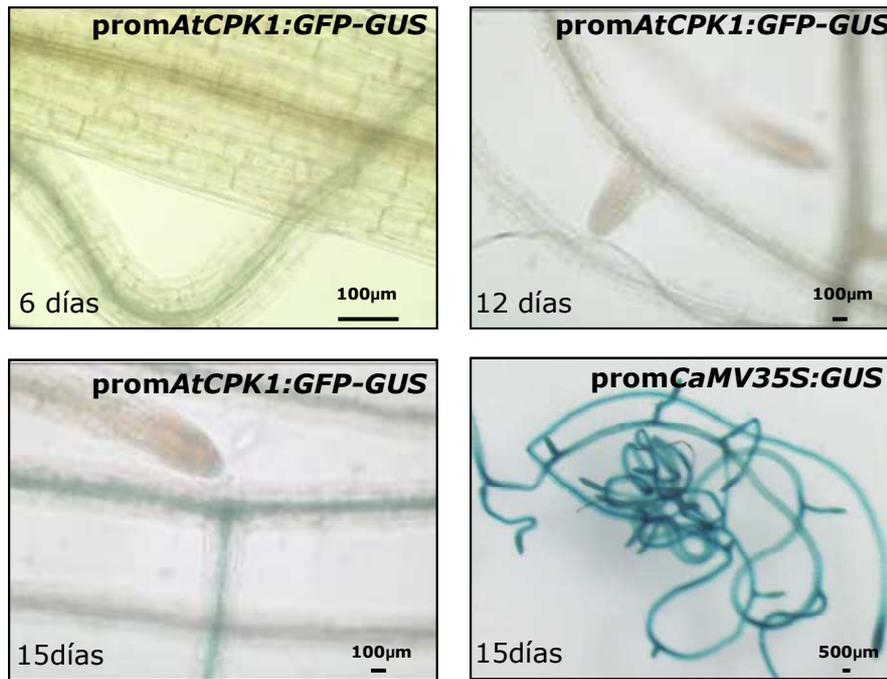


Figura R6. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plántulas de Arabidopsis portadoras del gen quimérico *promAtCPK1: GFP-GUS*. Las imágenes corresponden a plántulas (línea 10) crecidas *in vitro* durante 6, 12 y 15 días. En paralelo se utilizaron plantas transformadas con el vector pCambia 1304 como control positivo, que expresan el gen reportero *GFP-GUS* bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*. La actividad GUS se reveló histoquímicamente en plántulas fijadas en acetona fría mediante incubación con el sustrato X-Gluc durante 16 h, según se especifica en materiales y métodos. Las plántulas fueron visualizadas al microscopio (Microscopio vertical Axiophot, Zeiss, con cámara DP70 Olympus). La barra de escala corresponde a 100 µm y 500 µm.

En estas mismas líneas transgénicas se llevó a cabo una visualización con microscopia confocal para detectar la proteína fluorescente GFP. Sin embargo, la fluorescencia de la proteína GFP apenas podía detectarse en los estadíos y tejidos de las líneas transgénicas en las que detectamos la expresión GUS. Los estudios que se presentan a continuación para la caracterización funcional del promotor *AtCPK1* se llevaron a cabo mediante el análisis de la actividad GUS.

1.3.3. Actividad del promotor del gen *AtCPK1* en condiciones de infección con el hongo *F. oxysporum* o de tratamiento con elicitores fúngicos.

A continuación se procedió a analizar el patrón de expresión del promotor *AtCPK1* en respuesta a infección por patógenos en las plantas transgénicas portadoras del gen quimérico *promAtCPK1: GFP-GUS*. Para ello, se infectaron plántulas de 12 días crecidas en condiciones estériles (6 líneas transgénicas) mediante rociado con

esporas del hongo *F. oxysporum*. La actividad GUS fue analizada a las 3 h, 12 h y 24 h después de la infección. Los resultados obtenidos con la línea 2, representativos de todas las líneas analizadas, se presentan en la **figura R7**.

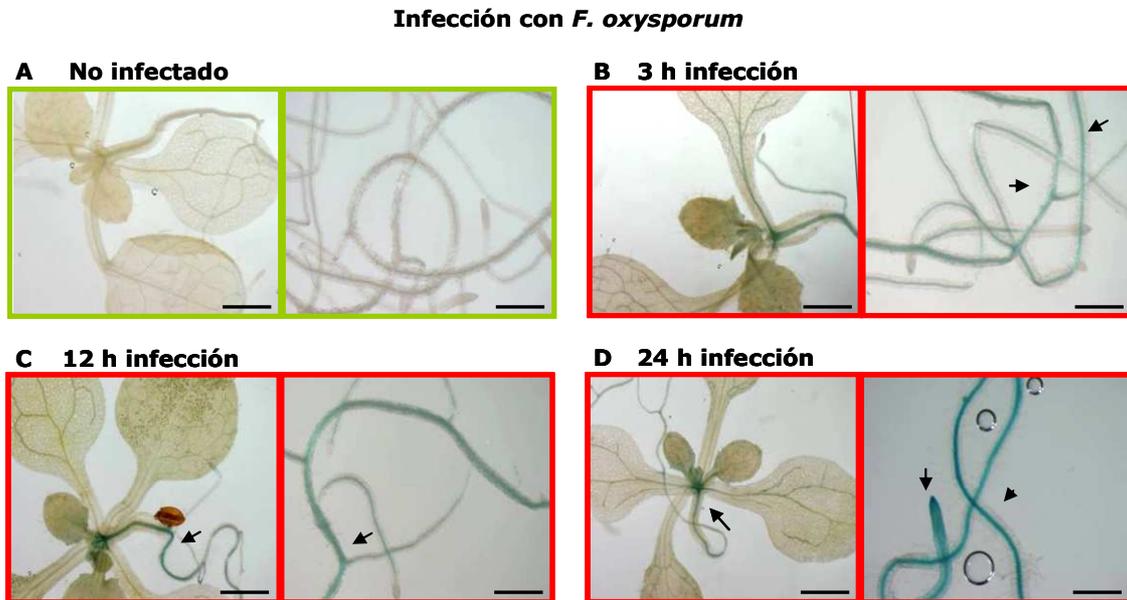


Figura R7. Análisis histoquímico de la actividad GUS en las plantas transgénicas portadoras del gen quimérico *promAtCPK1: GFP-GUS* infectadas con el hongo *F. oxysporum* en Las imágenes corresponden a plántulas transgénicas (línea 2) crecidas *in vitro* durante 12 días, controles (**A**) o infectadas (**B-D**) con una suspensión de esporas de *F. oxysporum* (10^5 esporas/ml). Las plántulas fueron analizadas a diferentes tiempos después de la infección 3 h (**B**), 12 h (**C**) y 24 h (**D**) mediante ensayo histoquímico de actividad GUS. Las imágenes fueron adquiridas con lupa (Microscopio estereoscópico SZX16 Olympus) y el objetivo 1x. Barra=200 μ m.

En las plantas control no infectadas únicamente se detecta una ligera actividad en las raíces, tal y como se había observado anteriormente. En las plantas infectadas, la actividad GUS es superior a las 3 h de infección con respecto a las plantas control (**Figura R7B**) y aumenta progresivamente a tiempos posteriores, a las 12 (**Figura R7C**) y 24 h (**Figura R7D**) después de la infección. La tinción GUS se localiza principalmente en la raíz y en la base de la roseta. Estos resultados indican que el promotor *AtCPK1* es inducible en la raíz de plántulas infectadas con el hongo *F. oxysporum* en estadios tempranos de la infección (hasta las 24 h, no se analizaron tiempos posteriores). Durante este periodo no se detectó actividad en otros tejidos de la plántula.

También se analizó la inducibilidad del promotor *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con elicitores en las plantas transgénicas portadoras de la fusión transcripcional del promotor al gen reportero *GUS*. Los resultados se muestran en la **figura R8** y corresponden a imágenes de la línea 10 (representativa de las 6 líneas independientes analizadas). Los ensayos se realizaron con plántulas en dos estadios de crecimiento, 7 y 12 días, con resultados similares. Los resultados mostrados en la **figura R8** corresponden a plántulas de 7 días. Como puede observarse no se detectó actividad *GUS* en las plántulas controles (**Figura R8** paneles superiores), acorde con los resultados mostrados previamente para plántulas jóvenes (**Figura R6**). En el caso de las plántulas tratadas con elicitores, la actividad *GUS* se detecta a tiempos muy tempranos de tratamiento (5 min) y continúa en los tiempos posteriores (hasta las 6 h, último tiempo analizado) (**Figura R8** paneles inferiores). La actividad *GUS* se detecta en las raíces, hipocótilos y cotiledones, así como en el primordio de la roseta. La tinción *GUS* se observó principalmente asociada a los haces vasculares de los cotiledones, hipocótilo y raíces, aunque se detecta una tinción basal en todos los tejidos.

Los resultados obtenidos muestran que el promotor del gen *AtCPK1* es capaz de dirigir la expresión inducible del gen reportero *GUS* en respuesta a infección por el patógeno *F. oxysporum* y al tratamiento con elicitores preparados a partir de este mismo hongo. En tejidos de la raíz, la actividad del promotor es más fuerte y más rápida en respuesta al tratamiento con elicitores (detectable a los 5 min después del tratamiento) con respecto a lo que se observa en respuesta a infección (detectable a las 3 h tras la infección). En cotiledones y hojas de la roseta no se detectó actividad en las primeras 24 h post-infección, aunque cabe la posibilidad de que a tiempos posteriores sí que se observe actividad del promotor en estos tejidos. Estos resultados están esencialmente de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos *Northern* (**Figuras R1 y R2**). La acumulación progresiva que se observa en el ensayo de actividad *GUS* a partir de las 3 h de infección, sin embargo, no va acompañada de la acumulación progresiva de transcritos *AtCPK1* a lo largo del tiempo (**Figura R1**). Ello podría explicarse por la estabilidad descrita la enzima *GUS* que se iría acumulando con el tiempo en tejidos de la planta transgénica. Además, los niveles de acumulación basal de los transcritos *AtCPK1* observados en los ensayos *Northern* son más elevados que los niveles de actividad *GUS* detectada en las plántulas control. Sin embargo, hay que indicar que los ensayos de actividad *GUS* se realizaron con plántulas más jóvenes (7 y 12 días) que las plántulas utilizadas de los ensayos *Northern* (15 días). Y tal como se

muestra en la **figura R6** la actividad del promotor *AtCPK1* aumenta con la edad de las plantas hasta el último tiempo analizado (15 días).

*En conclusión, estos resultados demuestran la activación transcripcional del gen *AtCPK1* en respuesta al ataque por el hongo *F. oxysporum*.*

Tratamiento con elicitores fúngicos

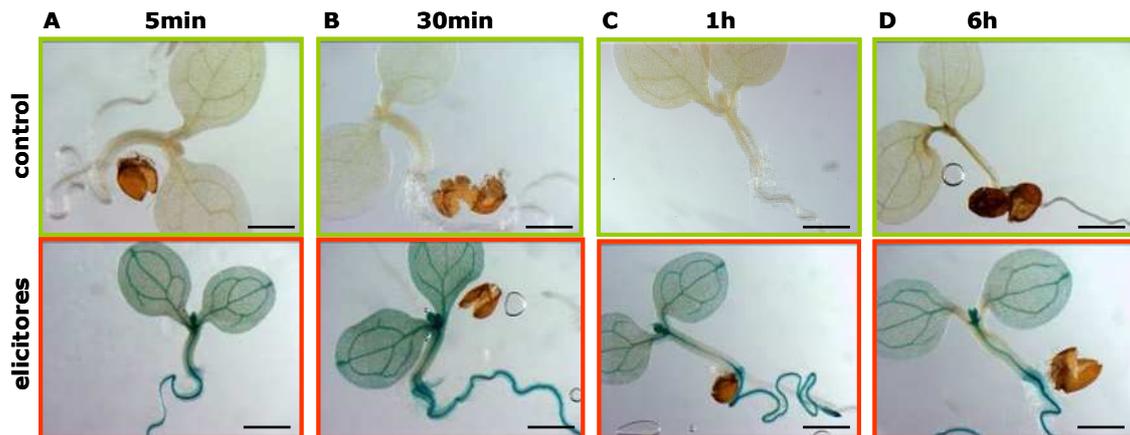


Figura R8. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras del gen quimérico *promAtCPK1*:GFP-GUS en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos. Las imágenes corresponden a plántulas transgénicas (línea 10) crecidas *in vitro* durante 7 días, controles (**paneles superiores**) o tratadas con elicitores del hongo *F. oxysporum* (300 $\mu\text{g/ml}$) (**paneles inferiores**) durante 5 min (**A**), 30 min (**B**), 1 hora (**C**) o 6 h (**D**). Las imágenes fueron adquiridas con lupa (Microscopio estereoscópico SZX16 Olympus) con el objetivo 1x. Barra=200 μm .

1.3.4. Actividad del promotor del gen *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con hormonas.

Se llevaron a cabo estudios para ensayar la actividad del promotor *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con hormonas en las plantas transgénicas *promAtCPK1*:GFP-GUS. Los tratamientos se realizaron en las mismas condiciones experimentales indicadas anteriormente para los ensayos *Northern-blot*. Los resultados de la tinción histoquímica de la actividad GUS se muestran en la **figura R9**. El patrón de tinción de la actividad GUS fue similar para las 6 líneas transgénicas analizadas, observándose solo diferencias cuantitativas en la intensidad de la tinción. Las imágenes mostradas en la figura R9 corresponden a la línea 2 y son representativas de los resultados obtenidos para las diferentes líneas. Como puede observarse en las plántulas controles (**Figuras 9A y B**, paneles

superiores) no se detecta actividad GUS. Tampoco se detectó actividad GUS en respuesta al tratamiento con SA, a ninguno de los tiempos ensayados (30 min ó 1 h, **figura 9A**) ni tampoco a las 3 h ó 6 h de tratamiento (datos no mostrados). En el caso del tratamiento con MeJA, ACC y ABA se detectó una débil actividad GUS asociada a raíces y a hipocótilos (**Figura 9 A y B**). El tratamiento con las auxinas, 2,4D o IAA (**Figura 9 B**) induce la actividad GUS a niveles más intensos que el resto de las hormonas estudiadas, asociada principalmente a raíces, hipocótilos y en el pedúnculo de cotiledones y hojas verdaderas. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en el análisis *Northern* de las plantas tratadas con MeJA, ACC, ABA y auxinas (**Figura R3**) donde se observó una acumulación, aunque no muy importante, del transcrito *AtCPK1* en respuesta al tratamiento con estas hormonas. Sin embargo en el caso del tratamiento SA se observó acumulación del transcrito *AtCPK1* pero no se ha detectado actividad GUS.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos con las plantas *promAtCPK1:GFP-GUS* se puede concluir que el promotor, incluida la secuencia 5' no traducida, del gen *AtCPK1* (fragmento comprendido entre las posiciones -1732 y +461, respecto al inicio de la transcripción) es funcional y dirige la expresión inducible del gen reportero *GUS* en respuesta al tratamiento con las hormonas MeJA, ACC, ABA, 2,4D e IAA, aunque los cambios de expresión no son muy fuertes. Además estos resultados sugieren que los elementos reguladores de respuesta a las hormonas JA, etileno, ABA o auxinas identificados en el análisis *in silico* de la región promotora del gen *AtCPK1* probablemente son funcionales. En el caso del SA puede pensarse que, además del motivo TGACG presente en las posiciones -1063pb y -1201pb, sean necesarios otros elementos situados más allá de la región promotora analizada en este estudio, ya que en el análisis de las plantas *promAtCPK1:GFP-GUS* tratadas con SA no se detectó actividad del promotor *AtCPK1*.

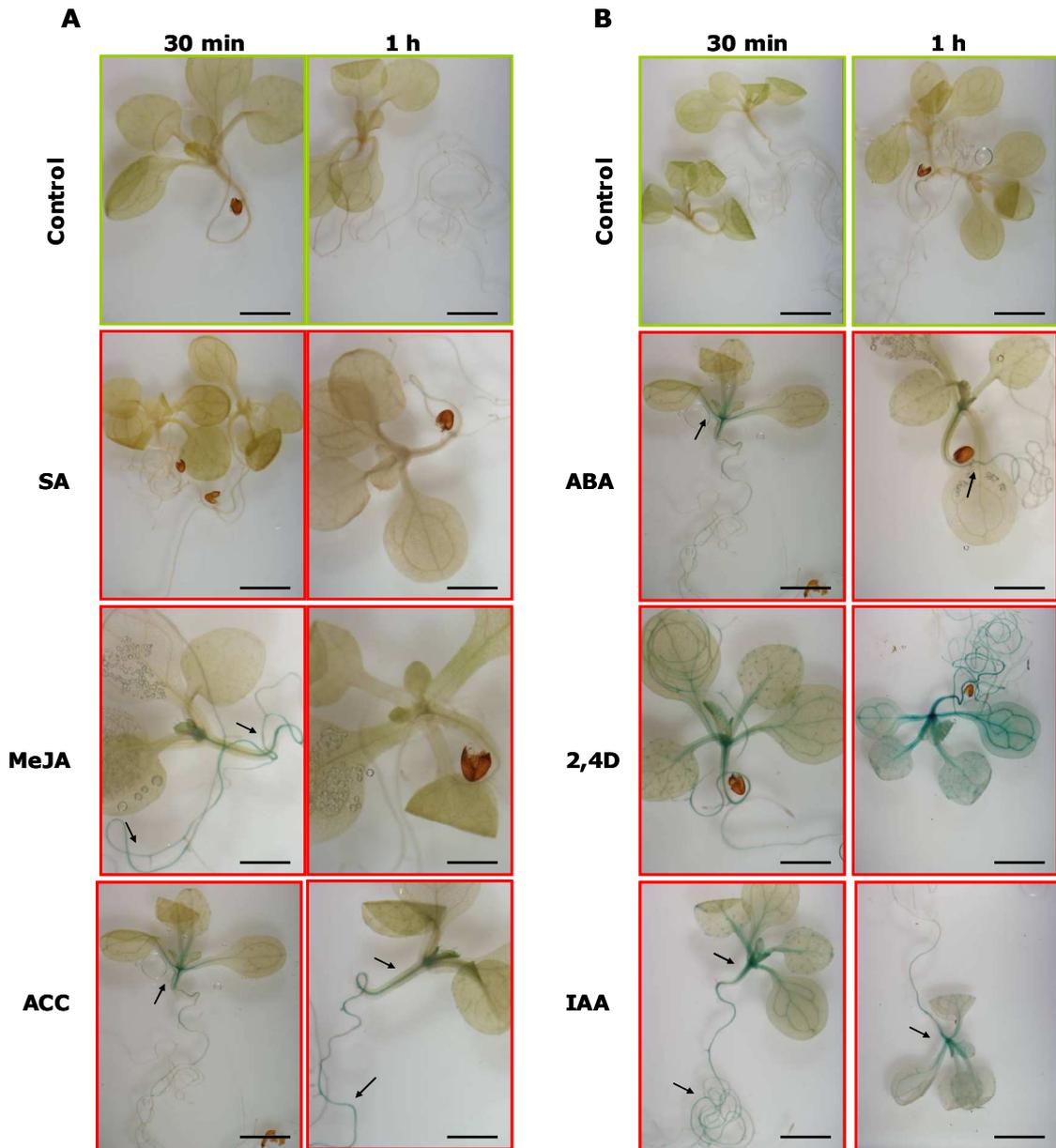


Figura R9. Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas transgénicas portadoras del gen quimérico *promAtCPK1: GFP-GUS* tratadas con hormonas. Las imágenes presentadas corresponden a plántulas transgénicas (línea 2) crecidas durante 12 días en condiciones estériles *in vitro* tratadas durante 30 min o 1 hora con MS-suplementado con la hormona estudiada. **A.** Tratamiento con agua esteril (control para los tratamientos con SA, MeJA y ACC), SA (100 mM), MeJA (100 μ M), y ACC (20 μ M). **B.** Tratamiento con etanol diluido (control para los tratamientos con ABA, 2,4D e IAA), ABA (100 μ M), 2,4D (50 μ M), IAA (100 μ M). Se han señalado con flechas los tejidos de mayor intensidad de tinción GUS. Las imágenes fueron adquiridas con lupa (Microscopio estereoscópico SZX16 Olympus) y el objetivo 1x. Barra:200 μ m.

2. ACUMULACIÓN DE LA PROTEÍNA AtCPK1 EN RESPUESTA A INFECCIÓN POR EL HONGO *F. OXYSPORUM* Y AL TRATAMIENTO CON ELICITORES FÚNGICOS.

Tras caracterizar la expresión del gen *AtCPK1* en respuesta a la infección fúngica en plantas de *Arabidopsis*, se procedió a la detección de la proteína AtCPK1 tejidos de *Arabidopsis* infectados o no con el hongo *F. oxysporum*. Para ello se obtuvieron anticuerpos frente a la proteína AtCPK1 que se usaron para su inmunodetección en extractos proteicos de plantas de *Arabidopsis*.

Según se indicó en la introducción, el gen *AtCPK1* forma parte de una familia multigénica muy conservada en *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2002). Las principales diferencias entre los 34 miembros de la familia CPKs de *Arabidopsis* se localizan en las secuencias aminoacídicas de los dominios N-terminal y C-terminal. Por ello, se utilizó la región N-terminal de AtCPK1 para la producción de anticuerpos policlonales frente a esta isoforma en conejo.

La región N-terminal de la proteína AtCPK1 se clonó en un vector de expresión en *E. coli*. Para ello, las secuencias codificantes del dominio N-terminal (comprendidas entre la glutamina-15 y la treonina 143) se amplificaron por PCR a partir del plásmido pBSK-AtCPK1 (que contiene el cDNA completo de AtCPK1), utilizando oligonucleótidos N-termAtCPK1_directo y N-termAtCPK1_reverso (Tabla M1 de Materiales y Métodos). El producto de la PCR se clonó en el vector pGEM-Teasy y se verificó la secuencia. A partir de este plásmido recombinante, mediante restricción con el enzima EcoRI, se purificó el fragmento de cDNA codificante del N-terminal y se clonó en el sitio EcoRI del vector pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech). Este vector permite la producción de proteínas en *E. coli* como fusión C-terminal a la proteína glutatión-S-transferasa (GST). Las proteínas quedan unidas por una secuencia de aminoácidos reconocida por la proteasa trombina, que permite su liberación (**Figura R10A**). La secuencia del plásmido obtenido (pGEX4T1-N-term AtCPK1) se comprobó mediante secuenciación.

La expresión del gen de fusión se realizó en la cepa BL21 de *E. coli*, tras la inducción con IPTG (0.1 mM) durante 2 h. A partir de los cultivos bacterianos inducidos se purificó la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad (glutatión ligado a sefarosa 4B) (**Figura R10B**, carriles 1-4). El fragmento N-terminal AtCPK1 se liberó de la proteína de fusión mediante digestión con trombina

y se purificó mediante cromatografía de afinidad (retención de la GST) (**Figura R10B**, carril 6).

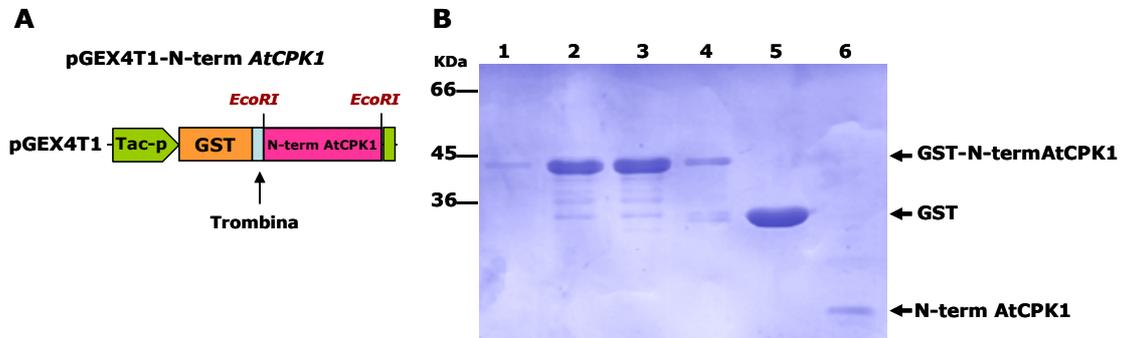


Figura R10. Producción en *E. coli* de la proteína fusión GST-N-terminalAtCPK1 y purificación del fragmento N-terminal AtCPK1. **A.** Esquema de la construcción pGEX4T1-N-termAtCPK1 utilizada para la producción del fragmento N-terminal AtCPK1 en *E. coli* **B.** Análisis mediante electroforesis (SDS-PAGE) de los productos obtenidos en las distintas etapas de la purificación del fragmento N-terminal AtCPK1: carriles 1-4, fracciones 1 a 4 eluidas de la cromatografía de afinidad, correspondientes a la proteína de fusión GST-N-termAtCPK1; carril 5, fracción eluida tras la cromatografía de afinidad de los productos de digestión con trombina de la proteína de fusión, correspondiente a la GST; carril 6, fracción no retenida en la cromatografía de afinidad de los productos de la digestión con trombina de la proteína de fusión, correspondiente al fragmento N-terminal AtCPK1.

El fragmento N-terminal AtCPK1 purificado y emulsionado con el coadyuvante de Freund (Sigma) se utilizó para inmunizar 2 conejos, mediante aplicaciones subcutáneas. Se aplicaron 3 inyecciones (50 μ g de proteína por aplicación, de los cuales 25 μ g se desnaturalizaron por calor) en intervalos de 3 semanas. Los conejos se sangraron 8 días después de la última aplicación. El suero preinmune se obtuvo de los mismos conejos una semana antes de comenzar el programa de inmunizaciones.

Se ensayó la capacidad del suero obtenido de los conejos para reconocer a la proteína AtCPK1, por fijación de la proteína de fusión GST-N-termAtCPK1 a una membrana de nitrocelulosa (*dot-blot*) e inmunodetección. Este ensayo reveló que el suero inmune detectaba al menos 25 ng de proteína recombinante GST-N-termAtCPK1 a una dilución 1/1000 (**Figura R11 A**). No se detectó reacción serológica del anticuerpo con la proteína GST. El suero inmune también reconoce a la proteína AtCPK1 completa producida en *E. coli* (la producción de la proteína AtCPK1 en *E. coli* se describe posteriormente, apartado 4.2.1).

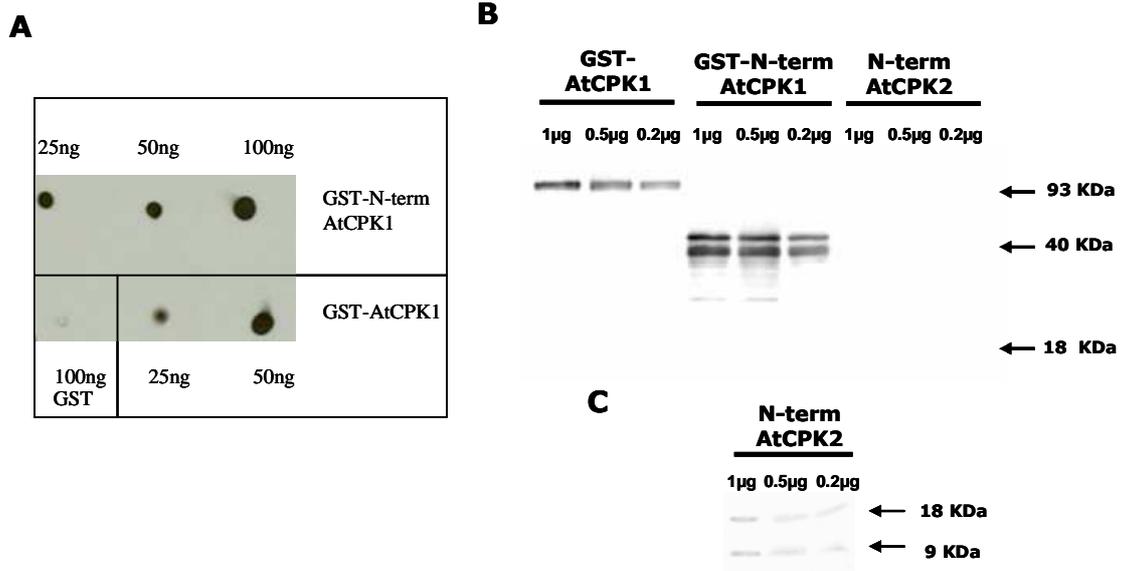


Figura R11. Especificidad del suero inmune anti-AtCPK1. **A.** Detección de AtCPK1 con el suero inmune anti-AtCPK1 mediante ensayo dot-blot. Se fijaron diferentes cantidades (25ng, 50ng y 100ng) de las proteínas GST-N-termAtCPK1, GST-AtCPK1 y GST sobre una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el suero inmune purificado (dilución 1/1000). **B.** Inmunodetección de la proteína GST-AtCPK1 y GST-N-termAtCPK1 (1, 0.5 y 0.2µg) con el suero inmune anti-AtCPK1 obtenido (dilución 1/1000). Se analizaron también muestras del fragmento N-terminal-AtCPK2-His (mismas cantidades que para AtCPK1) que no fueron detectadas por el suero anti-AtCPK1. **C.** Inmunodetección del péptido N-term-AtCPK2-His con el anticuerpo comercial Anti-His (Novagen, dilución 1/1000), para confirmar la presencia del péptido N-term-AtCPK2-His.

Como paso previo a la utilización del suero inmune frente AtCPK1 con extractos proteicos de *Arabidopsis* y debido a la alta homología que existe entre los miembros de la familia de las CPKs, se hacía necesario comprobar que el anticuerpo obtenido reconocía específicamente a la proteína AtCPK1 y no otras proteínas CPKs relacionadas con AtCPK1. Entre las 34 CPKs de *Arabidopsis*, la proteína que presenta una mayor homología con AtCPK1 es AtCPK2. La secuencia codificante del dominio N-terminal de AtCPK2 (nucleótidos de 1 al 413) se amplificó por PCR a partir de cDNA de plántulas de *Arabidopsis*, utilizando los oligonucleótidos N-termAtCPK2_directo y N-termAtCPK2_reverso (Tabla M1 de Material y Métodos), y se clonó en el vector pET14 (Novagen). Este vector permite la producción de proteínas en *E. coli* con una extensión en C-terminal de 6 residuos de histidina. Para comprobar la especificidad del anticuerpo anti-N-termAtCPK1, el péptido N-terminal- AtCPK2-His purificado (18 KDa) se analizó por electroforesis en SDS y ensayos de inmunotransferencia. En este ensayo se incluyeron además las proteínas GST-AtCPK1 y GST-N-termAtCPK1. Como se muestra en la **Figura R11B**,

el suero anti-AtCPK1 reconoce a las proteínas de fusión GST-AtCPK1 y GST-N-termAtCPK1, pero no a la proteína N-termAtCPK2-His. Mediante la utilización del anticuerpo anti-His se confirmó la presencia de la proteína fusión N-termAtCPK2-His de 18 KDa, banda de peso molecular esperado, y una banda de menor peso molecular, posible subproducto truncado de expresión en *E. coli* (**Figura R11C**).

A continuación se estudió el efecto de la infección y el tratamiento con elicitores fúngicos en el nivel de acumulación de la proteína AtCPK1 en tejidos de *Arabidopsis*. En primer lugar se determinó el nivel de acumulación de la proteína en respuesta a infección por el patógeno *F. oxysporum* mediante inmunotransferencia de extractos proteicos de *Arabidopsis*. Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis* de 15 días crecidas en condiciones estériles, que se rociaron con una suspensión de esporas del hongo *F. oxysporum*. Se recogieron muestras a las 6 h y 24h post-infección.

Para la preparación de los extractos proteicos se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio que mostraban que la proteína AtCPK1 se localiza en organelos citoplasmáticos (peroxisomas y cuerpos lipídicos) y que una mutación en su secuencia N-terminal de miristoilación impide su localización en dichos organelos (Coca y San Segundo, 2010). La secuencia N-terminal de miristoilación se encuentra en proteínas asociadas a membrana (Sorek *et al.*, 2009). Por este motivo se utilizó un protocolo de extracción de proteínas que permite un enriquecimiento en proteínas de membrana. Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis monodimensional, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectaron con el suero inmune anti-AtCPK1. El resultado obtenido se muestra en la **figura R12A**, donde se puede observar un ligero aumento en el nivel de acumulación de la proteína AtCPK1 en respuesta a infección a las 6 h post-infección, en tiempos anteriores (3 h) no se detectaron diferencias (datos no mostrados). Estas diferencias se mantienen a las 24 h post-infección en comparación con la respectiva muestra control. Los resultados obtenidos previamente mediante análisis *Northern* (**Figura R1**) mostraron la activación transcripcional de *AtCPK1* a partir de las 3 h de infección, sugiriendo que la inducción transcripcional del gen *AtCPK1* resulta en un aumento en el nivel de acumulación de la correspondiente proteína. En los ensayos de actividad GUS dirigida por el promotor *AtCPK1* (**Figura R7**) también se detectó la inducción de la actividad a partir de las 3 h post-infección. A las 24 h después de la infección, la acumulación de transcritos *AtCPK1* se encuentra próxima al nivel basal (**Figura R1**) mientras que a nivel de proteína se encuentra mayor acumulación en plántulas

infectadas con respecto a plántulas control (**Figura R12**). En el transcurso de este trabajo se ha observado que la acumulación diferencial de AtCPK1 en extractos de plantas control e infectadas es bastante variable, se ha presentado uno de los ensayos en el que las diferencias fueron más acusadas.

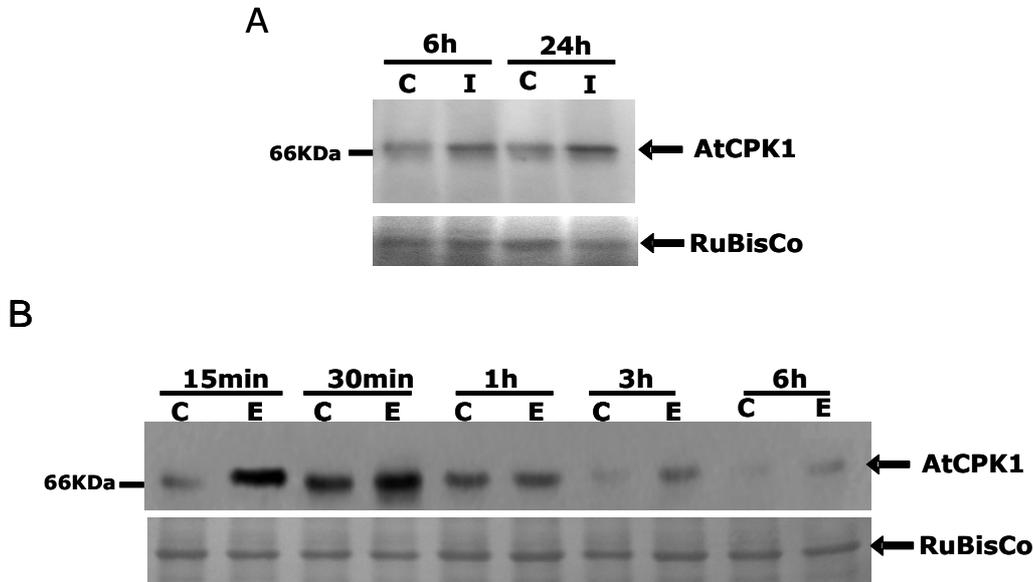


Figura R12. Acumulación de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos de plantas de Arabidopsis en respuesta a infección por *F. oxysporum* (A) y al tratamiento con elicitores (B). Análisis de inmunotransferencia de extractos proteicos (25µg) de plantas de Arabidopsis crecidas *in vitro* durante 15 días controles (C), infectadas (I) con esporas de *F. oxysporum* (10^5 esporas/ml) o tratadas con elicitores (E) del mismo hongo (300µg/ml) a los tiempos indicados. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (7.5%), se transfirieron a membrana de nitrocelulosa e inmunodetectaron con el suero inmune anti-AtCPK1 (dilución 1/1000) y se revelaron mediante quimioluminiscencia (Pierce SuperSignal best Femto kit). Como control de carga se muestra la tinción de las proteínas en la membrana con el colorante rojo Ponceau, donde se visualiza la proteína mayoritaria Rubisco con una intensidad similar en todos los carriles. Se señala a la izquierda de los paneles la posición del marcador de peso molecular de 66 KDa y a la derecha con una flecha las proteínas AtCPK1 y RuBisCo.

Posteriormente se analizó la acumulación de proteína AtCPK1 en respuesta al tratamiento con elicitores (**Figura R12B**). En este caso se observa un aumento importante en el nivel de acumulación de la proteína, a los 15 min después del tratamiento que se mantiene superior al nivel basal a los 30 min de infección. A partir de este tiempo, se mantiene la inducibilidad por elicitores si bien la respuesta no es tan acentuada. La inducción transcripcional del gen *AtCPK1* analizada

mediante *Northern-blot* (**Figura R2**) también es más rápida en respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos que a la infección.

Estos resultados muestran que la inducción transcripcional del gen AtCPK1 en respuesta a la infección por el hongo F. oxysporum o al tratamiento con elicitores fúngicos va acompañada de un aumento en los niveles de acumulación de la proteína.

3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE AtCPK1.

Muchas proteínas sufren cambios post-traduccionales que son determinantes de la regulación de su función y propiedades bioquímicas. Las características estructurales de las proteínas CPKs, así como datos bioquímicos y funcionales descritos en la literatura, indican que existen modificaciones postraduccionales y cofactores que pueden modular la actividad enzimática de las proteínas CPK. Así, la activación de las CPKs está regulada por la unión de calcio, que conduce a la liberación del dominio autoinhibidor del sitio activo. Para CPKs concretas (p.e. NtCPK2 de tabaco) se ha descrito modificaciones por fosforilación y/o autofosforilación (Hegeman *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2010). Por otra parte, algunas CPKs presentan secuencias consenso de miristoilación y/o palmitoilación en el dominio N-terminal determinante de su asociación a membrana (Batistic *et al.*, 2008; Sorek *et al.*, 2009). Además se ha demostrado que la actividad de proteínas CPKs también está regulada por fosfolípidos específicos (Cheng *et al.*, 2002).

A



B



Figura R13. Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la proteína AtCPK1.

Los distintos dominios de la proteína se resaltan en color: dominio N-terminal en rosa, dominio quinasa en azul, dominio de unión en verde y dominio calmodulina en naranja donde se resaltan en naranja oscuro los motivos de unión a calcio. Se indican los posibles sitios de fosforilación en los residuos Ser y Thr (marcados con círculos naranja) identificados con el programa NetPHos 2.0 server con un score igual o mayor de 0.9 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>). Se señalan con recuadros negros los sitios de autofosforilación identificados por mapeo fosfoproteómico *in vitro* de la proteína AtCPK1 (Hegeman *et al.*, 2006). También se indica el sitio de miristoilación (Gly 2) y de palmitoilación (Cys 5), con flechas de color verde. La predicción de motivos PEST realizada con el programa *PESTfind analysis* (<http://www.at.embnet.org/toolbox/pestfind>) ha identificado un motivo con score alto (+ 6.09) marcado en gris (+) y otro con un score más bajo (+ 4.42) que se han marcado en azul oscuro (-).

Para continuar el estudio de la proteína AtCPK1 se realizó un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de AtCPK1 que se presenta en la **figura R13**. La proteína AtCPK1 presenta la estructura típica de las CPKs, con un dominio N-terminal variable, un dominio catalítico quinasa de proteínas, un dominio autoinhibitorio y un dominio de unión a calcio, con cuatro sitios de unión a calcio (**Figura 13A**). En el dominio N-terminal de AtCPK1 se encuentra un sitio consenso de miristoilación (**Figura 13B**). Resultados obtenidos en el grupo de investigación han demostrado que el residuo Gly en la posición 2 es determinante para la correcta localización subcelular de AtCPK1 en los peroxisomas y cuerpos lipídicos, muy probablemente anclada a la membrana de estos organelos (Coca y San Segundo, 2010). El análisis de la secuencia predice además un sitio de palmitoilación en la posición Cys 5 (**Figura 13B**). La palmitoilación de una proteína, unión de un grupo palmitato (ácido graso saturado de 16-carbonos) vía un enlace tioéster a un residuo de cisteína, puede modular la interacción con otras proteínas o membranas y regular el tráfico celular de la proteína y su actividad enzimática. La predicción del sitio de palmitoilación en AtCPK1 es teórica y no se ha demostrado que tenga lugar.

También hemos realizado una búsqueda de posibles sitios de fosforilación en la secuencia aminoacídica de la proteína AtCPK1 utilizando el programa NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>). Este análisis predice un total de 31 sitios potencialmente fosforilables, correspondientes a 24 serinas y 7 treoninas (**Figura R13B**). La mayoría de los sitios de fosforilación se encuentran en el dominio N-terminal variable. Según se ha descrito en la literatura (Hegeman *et al.*, 2006), el mapeo fosfoproteómico de los sitios de autofosforilación *in vitro* de la proteína AtCPK1 identificó 5 residuos autofosforilados, 4 de ellos se encuentran en la región N-terminal y el quinto en el dominio quinasa (Hegeman *et al.*, 2006). Estos sitios se han señalado en la secuencia aminoacídica de AtCPK1 (**Figura 13B**), tan solo la Ser en la posición 64 ha sido identificada con ambos estudios.

Por otra parte, la actividad de una proteína implicada en señalización puede estar regulada por la estabilidad de dicha proteína. En la literatura se ha descrito la presencia de secuencias PEST (prolina-glutámico-serina-treonina) en muchas proteínas, incluidas algunas proteínas CPKs. Esta secuencia peptídica PEST se ha asociado a proteínas de vida media corta, puesto que es la diana de degradación proteolítica por la subunidad 26S del proteasoma (Rechsteiner y Rogers, 1996). Así pues, se decidió analizar la posible regulación por proteasoma de la proteína AtCPK1. Para ello, se realizó una búsqueda de motivos PEST en la secuencia aminoacídica de la proteína AtCPK1 utilizando el programa *PESTfind analysis* (<http://www.at.embnnet.org/toolbox/pestfind>). Este análisis ha identificado un

potencial motivo PEST (posiciones 84-96), con una probabilidad alta (score + 6.09), y otro (posiciones 364-382) menos probable (score +4.42) en la secuencia AtCPK1 (**Figura 13B**).

En resumen, el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína AtCPK1 ha permitido identificar posibles sitios de fosforilación y motivos asociados a la degradación de proteínas por el proteasoma, sugiriendo que tanto la fosforilación como la degradación vía proteasoma de la proteína AtCPK1 podrían modular su actividad y/o estabilidad en la célula.

3.1. FOSFORILACIÓN

Con el fin de obtener una mejor caracterización bioquímica de la proteína AtCPK1, se procedió a analizar si AtCPK1 es susceptible de modificación por fosforilación/defosforilación en relación a la infección por el hongo *F. oxysporum*. Estas modificaciones post-traduccionales pueden ser detectadas a través de cambios en su peso molecular y/o en su punto isoeléctrico (la unión de grupos fosfatos introduce carga negativa a la proteína). Para analizar si la infección por patógenos resulta en cambios post-traduccionales en la proteína AtCPK1 se realizaron electroforesis bidimensionales de extractos proteicos obtenidos de plantas de *Arabidopsis* no infectadas o infectadas con *F. oxysporum* que fueron posteriormente analizados mediante inmunotransferencia con el anticuerpo anti-AtCPK1 preparado en este trabajo (**Figura R14A**). Se detectaron varios polipéptidos del mismo peso molecular y con diferentes puntos isoeléctricos, tanto en los extractos de plantas controles como en los extractos de plantas infectadas. Los polipéptidos predominantes en las muestras controles se sitúan en torno al pH 5.8, en tanto que en las muestras infectadas los polipéptidos predominantes se sitúan en torno al pH 5.6. Estos resultados, si bien no demuestran, si que apuntan a posibles cambios en el estado de fosforilación de AtCPK1 en respuesta a infección.

Para determinar si efectivamente los cambios de movilidad observados en la proteína AtCPK1 en respuesta a la infección por *F. oxysporum* corresponden a diferentes estados de fosforilación, se realizaron ensayos de fosforilación-defosforilación. Para ello, los extractos proteicos fueron sometidos bien a defosforilación por la fosfatasa alcalina, o bien a fosforilación tras incubación con un exceso de ATP. Se prepararon extractos proteicos de plántulas de 15 días, control e infectadas con *F. oxysporum* (**Figura R14A**). Una alícuota de cada extracto proteico se incubó con fosfatasa alcalina (**Figura R14B**). En paralelo otra alícuota de extractos proteicos se incubó con un exceso de ATP (**Figura R14C**). Una vez

realizados los tratamientos las proteínas se separaron mediante electroforesis bidimensionales, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunodetectaron con el suero inmune anti-AtCPK1. Cuando los extractos proteicos provenientes de plantas infectadas se tratan con fosfatasa alcalina, los péptidos inmunodetectados migran hacia el extremo básico (desde pH aproximado a 5,6 a pH aproximado a 5,8, **figuras R14 A y B**), presentando por tanto un patrón similar al que se observa en plantas control (no tratadas con fosfatasa alcalina). Los extractos de plántulas control no se ven afectados por el tratamiento con fosfatasa alcalina. Por el contrario, cuando los extractos se incuban con un exceso de ATP (**Figura 14C**), los péptidos inmunodetectados en extractos de plantas control migran hacia el extremo ácido, con un patrón similar al que se observa en extractos provenientes de plantas infectadas (no incubadas con ATP, **figuras 14 A y C**).

Estos resultados indican que existen diferentes isoformas de AtCPK1 que corresponden a diferentes estados de fosforilación de la proteína. Probablemente la proteína AtCPK1 se fosforila en respuesta a la infección por el hongo *F. oxysporum*. Esta fosforilación de AtCPK1 podría estar mediada bien por otra quinasa o bien podría tratarse de un proceso de autofosforilación. Para aclarar este aspecto será necesario realizar nuevos estudios, p.e. ensayos de autofosforilación con la proteína AtCPK1 producida en *E. coli*.

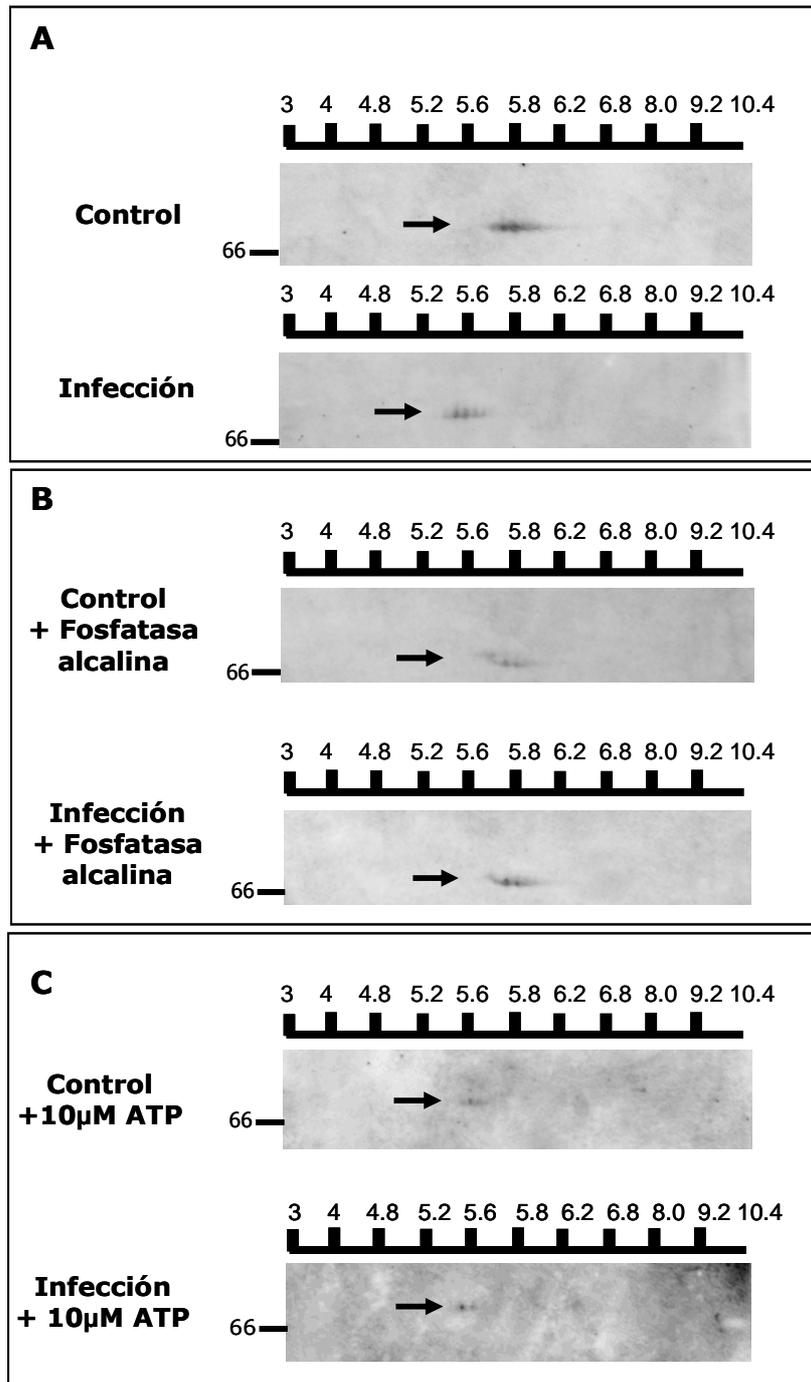


Figura R14. Inmunodetección de AtCPK1 en extractos proteicos de plantas de *Arabidopsis* infectadas mediante electroforesis bidimensional. Extractos proteicos (50 μ g) purificados de plántulas controles o infectadas 24 h con esporas de *F. oxysporum* (10⁶ esporas/mL) se separaron mediante electroforesis bidimensional (isoelectroenfoco pI 3-11, SDS-PAGE 10%), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, e inmunodetectaron con el suero anti-AtCPK1 (dil 1/1000) y revelado quimioluminiscente (Pierce SuperSignal best Femto kit). Se comparan extractos proteicos no tratados (**A**), incubados con fosfatasa alcalina (**B**) e incubados con exceso de ATP a una concentración 10 μ M (**C**).

3.2 REGULACIÓN POR EL PROTEASOMA

En la literatura se ha descrito que determinadas proteínas son susceptibles de degradación por el proteasoma cuando se modifica su estado de fosforilación (Perales *et al.*, 2006). Dado que en este trabajo se habían obtenido evidencias de cambios en el estado de fosforilación de la proteína AtCPK1 en respuesta a infección, y teniendo en cuenta que su secuencia polipeptídica contiene motivos PEST, se procedió a estudiar si la estabilidad de AtCPK1 y por tanto su acumulación se encuentra regulada por el proteasoma. Para ello se analizó la acumulación de la proteína AtCPK1 en presencia y ausencia del inhibidor específico del proteasoma 26S, MG132. Los ensayos se realizaron con extractos proteicos totales purificados de plántulas estériles o infectadas con el hongo *F. oxysporum* durante 24h. Las muestras proteicas se extrajeron en presencia de inhibidores de proteasas para evitar la degradación inespecífica por proteasas celulares. Los extractos proteicos obtenidos fueron incubados con el inhibidor del proteasoma MG132 durante 1 h y 2 h a 30°C. Seguidamente se determinó el nivel de acumulación de la proteína AtCPK1 mediante inmunotransferencia con el suero anti-AtCPK1. El nivel de acumulación de AtCPK1 se normalizó con respecto a la acumulación de la proteína RuBisCo de cada muestra. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura R15**. Como puede observarse, la acumulación de AtCPK1 disminuye gradualmente en los extractos proteicos en ausencia del inhibidor del proteasoma. Por el contrario, en los extractos mantenidos en presencia del inhibidor del proteasoma la acumulación de AtCPK1 se mantiene estable en el periodo de tiempo analizado. Este efecto no es dependiente de infección, puesto que la disminución en el nivel de acumulación de AtCPK1 en los extractos sin MG132 va paralela en las muestras de plantas controles e infectadas.

Estos resultados sugieren que el nivel de acumulación de la proteína AtCPK1 está controlado por la vía de degradación de proteínas dependiente del proteasoma

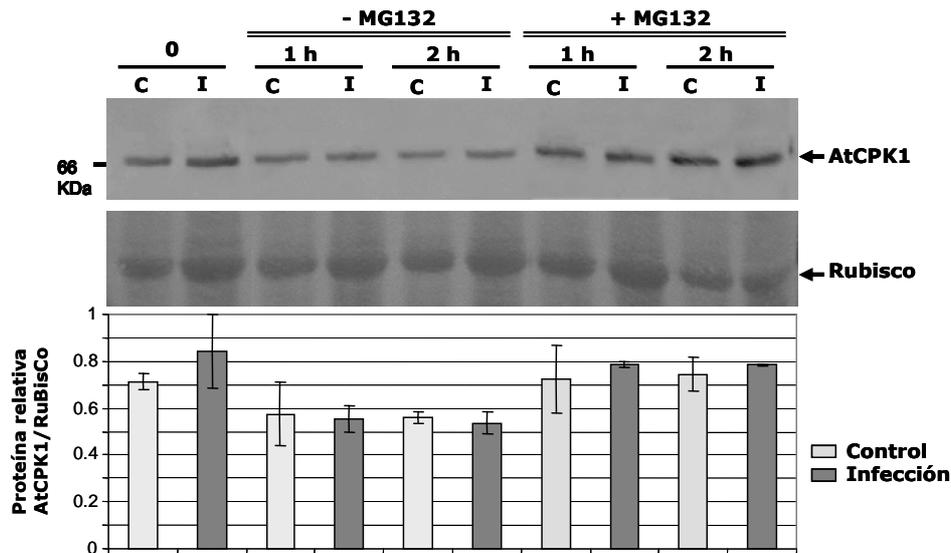


Figura R15. Estabilidad de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos de Arabidopsis en ausencia o presencia del inhibidor del proteasoma MG132. Análisis de inmunotransferencia de AtCPK1 en extractos de proteicos (25 μ g) de plántulas control (C) e infectados (I) con *F. oxysporum* durante 24 h. Los extractos proteicos fueron incubados a 30°C en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de proteasoma MG132 (concentración final 50 μ M) durante 1 h o 2 h. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (7.5%), transfirieron a nitrocelulosa, inmunodetectaron con el suero anti-AtCPK1 (dil 1/1000) y revelaron mediante quimioluminiscencia. En el panel intermedio se muestra la tinción con el colorante rojo Ponceau de la proteína mayoritaria Rubisco como control de carga. En el panel inferior la cuantificación de los niveles de acumulación de la proteína AtCPK1 relativos a la proteína RubisCo, normalizados frente al valor más alto (asignado valor 1). Se representa el valor medio de dos ensayos con réplicas biológicas independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM).

4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN, O FORMAN PARTE DE COMPLEJOS, CON AtCPK1.

Para conocer en mayor detalle la función de la proteína quinasa AtCPK1 en la respuesta de defensa de la planta de Arabidopsis, se procedió a la identificación de las proteínas con las que AtCPK1 interacciona o de los componentes de los complejos proteicos en los que esta proteína participa. Se siguieron tres aproximaciones experimentales independientes. La primera consistió en la captura *in vitro* mediante afinidad de las proteínas que interaccionan con la proteína recombinante GST-AtCPK1. La segunda aproximación seguida fue la inmunoprecipitación de complejos proteicos en los que está presente la proteína

AtCPK1 utilizando el anticuerpo específico frente a AtCPK1. Finalmente, en la tercera aproximación se purificaron los complejos proteicos en los que participa la proteína AtCPK1 utilizando el sistema TAP (*Tandem Affinity Purification*). Para ello, la proteína AtCPK1 se fusionó en c-terminal al epítipo TAPa y se obtuvieron plantas transgénicas que expresan el gen de fusión (*AtCPK1-TAPa*), a partir de las cuales se purificaron los complejos proteicos. Previamente a la realización de estos estudios, se analizó si la presencia de iones Ca^{+2} afecta a la capacidad de AtCPK1 para interactuar con otras proteínas.

4.1. EFECTO DE LA PRESENCIA DE IONES CALCIO EN LA INTERACCIÓN DE AtCPK1 CON OTRAS PROTEÍNAS.

El calcio es el principal regulador de la actividad de las CPKs. La unión de iones calcio al dominio calmodulina de las proteínas CPKs desplaza al dominio autorregulador, dejando libre y disponible el dominio quinasa para ejercer su actividad (Harper y Harmon, 2005). Basándonos en esta propiedad de las CPKs, se diseñó un ensayo para analizar si hay variaciones en los complejos proteicos en los que participa AtCPK1 dependientes de la presencia/ausencia de iones calcio. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-AtCPK1 a partir de extractos de plantas de *Arabidopsis*, en presencia de iones Ca^{+2} a una concentración final 1 μM , concentración a la cual se ha descrito que las CPKs se encuentran en un estado activado (Christodoulou *et al.*, 2004; Hegeman *et al.*, 2006). Se realizó el mismo ensayo en ausencia de Ca^{+2} . A nivel comparativo, se realizó también una inmunoprecipitación de extractos de plantas infectadas con *F. oxysporum* durante 24h. Los complejos proteicos inmunoprecipitados se separaron en geles bidimensionales y visualizaron mediante tinción con plata. Los resultados se presentan en la **figura R16**. El análisis de las imágenes obtenidas tras la digitalización de los geles mediante el programa Image Master 2D Platinum (Amersham Biosciences), reveló cambios importantes entre los perfiles proteicos de los inmunoprecipitados. En los inmunoprecipitados de muestras controles se detectaron 26 proteínas, mientras que en las muestras infectadas se detectaron 44 proteínas. En los inmunoprecipitados de muestras suplementadas con 1 μM Ca^{+2} presentan una complejidad similar a las muestras infectadas, detectándose 47 proteínas.

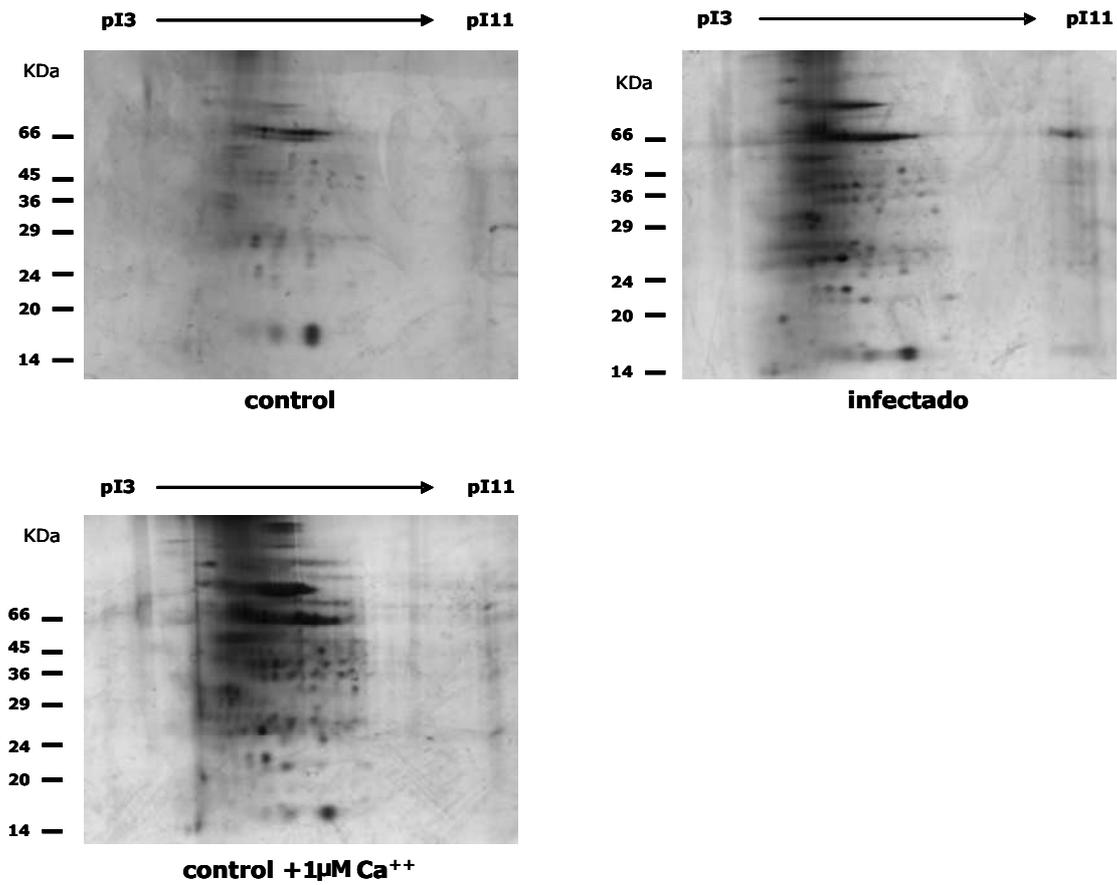


Figura 16. Perfil de proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-AtCPK1.

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron a partir de extractos proteicos (1 mg) enriquecidos en proteínas de membrana de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días controles o infectadas con *F. oxysporum* durante 24h. Una de las muestras controles fue suplementada con CaCl_2 a una concentración de $1 \mu\text{M}$ antes de la fijación con formaldehído y seguido de inmunoprecipitación. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron en geles bidimensionales, donde la primera dimensión se realizó en tiras de isoelectroenfoque de 7cm en un rango de pI 3 a 11 y la segunda dimensión en geles SDS-PAGE (10%) y se visualizaron mediante tinción con plata.

Así pues los resultados obtenidos demuestran que la proteína AtCPK1 en presencia de calcio muestra un perfil de interacción con proteínas más complejo que en ausencia de calcio. Este perfil de interacción con proteínas en presencia de calcio muestra una complejidad y movilidad similar al detectado en muestras infectadas (las diferencias observadas son cuantitativas). Los resultados sugieren que la interacción de la proteína AtCPK1 con otras proteínas es dependiente de calcio y que la presencia de Ca^{+2} ($1\mu\text{M}$) tiene efectos similares a los que se observan en condiciones de infección fúngica en la interacción de AtCPK1 con otras proteínas celulares.

4.2. CAPTURA DE PROTEINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-AtCPK1.

Una de las técnicas ampliamente utilizadas en la literatura para la identificación de interacciones proteína-proteína es la captura mediante afinidad en ensayos *in vitro*. Para este fin se expresó el gen recombinante *GST-AtCPK1* en *E. coli*, se purificó e inmovilizó en una matriz de sefarosa y se realizaron ensayos de captura con extractos proteicos obtenidos a partir de plantas de Arabidopsis.

4.2.1. Expresión en *E. coli* y purificación de la proteína GST-AtCPK1.

Para la expresión en *E. Coli* del gen fusión *GST-AtCPK1* se obtuvo el cDNA codificante de AtCPK1 a partir del plásmido pBSK-AtCPK1 cedido por el Prof. J. Harper (Harper *et al.*, 1993) mediante PCR utilizando los oligonucleótidos FL_AtCPK1_directo y FL_AtCPK1_reverso (indicados en la **Tabla M1** de Materiales y Métodos).

Una vez purificado el fragmento de cDNA, se clonó en el vector pGEM-Teasy y se verificó la secuencia. A partir de este plásmido recombinante y mediante restricción con los enzimas BglII/XhoI se purificó el fragmento de cDNA codificante y se clonó en vector pGEX4T3 (Pharmacia Biotech) en los sitios de restricción BamHI/XhoI (el sitio de corte BglII es compatible con BamHI). La construcción utilizada para la expresión en *E. coli* de la proteína AtCPK1 como fusión a la GST, así como el análisis de los productos obtenidos en las distintas etapas de purificación de la proteína recombinante se muestra en la **figura R17**.

Destacar que la proteína de fusión GST-AtCPK1 es insoluble, por lo que se realizaron algunas modificaciones sobre el protocolo estándar de purificación para favorecer la solubilidad de la proteína fusión. Así, la inducción del gen de fusión con IPTG (0,1 mM) se realizó durante 16 horas, a 20°C. La proteína de fusión soluble fue purificada mediante cromatografía de afinidad (glutación ligado a sefarosa 4B). En la **figura R17B** (carriles 5-6) se muestra el análisis mediante electroforesis de la proteína GST-AtCPK1 purificada, esta presenta un peso molecular de aproximadamente 94 KDa, que corresponde a 68KDa de la proteína AtCPK1 más 26 KDa de la GST.

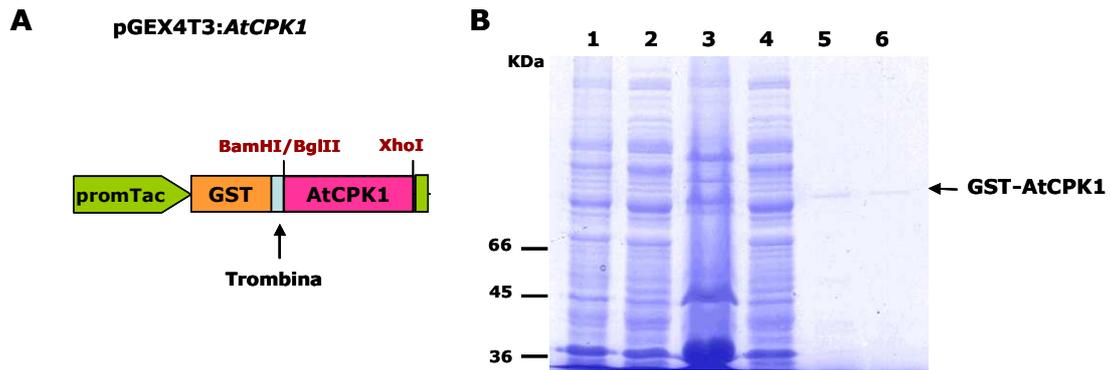


Figura R17. Esquema del clonaje y purificación de la proteína de fusión GST-AtCPK1. **A.** El cDNA completo AtCPK1 se clonó en las dianas BamHI y XhoI del vector de expresión en bacterias pGEX4T-3, como fragmento BglII- XhoI. **B.** Purificación de la proteína GST-AtCPK1 producida en *E. coli* (cepa BL21). Electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie de las fracciones (10 μ l) obtenidas en las distintas etapas de purificación de la proteína de fusión GST-AtCPK1: carril 1, extracto proteico total del cultivo bacteriano antes de la inducción; carril 2, extracto proteico total del cultivo inducido durante 16 h a 20 °C; carril 3, proteínas insolubles correspondientes a los cuerpos de inclusión y a proteínas asociadas a membranas obtenidas por centrifugación a partir del extracto total inducido; carril 4, proteínas solubles de extracto total inducido; carril 5-6, fracciones eluidas (1-2, respectivamente) de la cromatografía de afinidad, correspondientes a la proteína de fusión GST-AtCPK1.

4.2.2. Purificación de proteínas que interactúan con la proteína de fusión GST-AtCPK1.

La purificación de proteínas que interactúan con la proteína de fusión GST-AtCPK1 se realizó mediante cromatografía de afinidad. Para ello, la proteína de fusión GST-AtCPK1 se unió covalentemente a una matriz de sefarosa. La matriz que utilizamos fue la sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno que permite la inmovilización de ligandos que contengan grupos amino. De acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado 4.1, una vez unida la proteína GST-AtCPK1 a la sefarosa, la matriz se equilibró con un tampón conteniendo CaCl_2 (1.1mM). La cromatografía se llevó a cabo con extractos proteicos totales obtenidos de plantas crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad (control) o infectadas con *F. oxysporum* (24 h). Los extractos proteicos se incubaron con formaldehído (1%) durante 10 min, para fijar las uniones entre los complejos proteicos, se dializaron frente a PBS1x para eliminar el exceso de formaldehído y se sometieron a cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa-GST-AtCPK1. A modo de control, alícuotas de estos mismos extractos (control e infectado) se sometieron a

cromatografía de afinidad sobre una matriz de sefarosa a la que se había unido la proteína GST.

Las proteínas retenidas por afinidad a la proteína recombinante GST-AtCPK1, fueron eluidas y analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE (**Figura R18**). Se observa un perfil complejo de proteínas capturadas por la GST-AtCPK1, en el que se detectan diferencias cuantitativas entre proteínas capturadas en los extractos proteicos de plántulas infectadas respecto a los de plántulas controles no infectadas (indicadas con una flecha en la **figura R18**). La mayoría de estas proteínas no se observan cuando se utiliza la proteína GST como cebo.

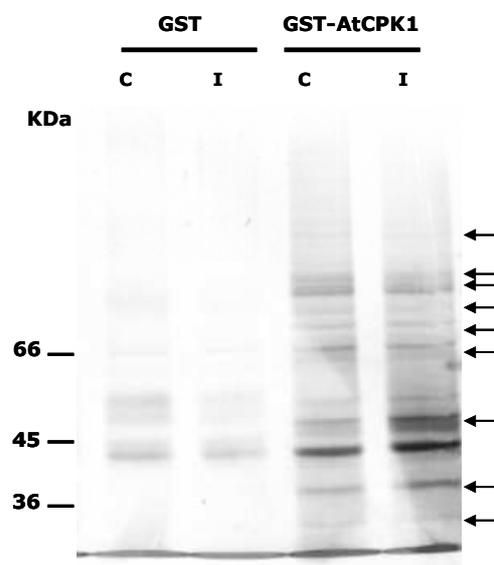


Figura R18. Perfil de proteínas capturadas por cromatografía de afinidad con la proteína de fusión GST-AtCPK1. Extractos proteicos totales (500µg) obtenidos de plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de esterilidad (C) o infectadas durante 24 h con el hongo *F. oxysporum* (I), se sometieron a cromatografía de afinidad sobre una matriz de sefarosa 4B (1 ml) a la que se unió la proteína GST-AtCPK1 (9 mg) o a la proteína GST (3 mg). Las proteínas eluidas se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE (10%) y se visualizaron mediante tinción con plata. Las flechas señalan las proteínas diferencialmente eluidas de la cromatografía de afinidad con GST-AtCPK1 en comparación con las eluidas en la cromatografía con GST. A la izquierda de la imagen se indican los marcadores de peso molecular en KDa.

En la literatura está descrito que la proteína AtCPK1 interacciona *in vitro* con proteínas de la familia de las 14-3-3 de *Arabidopsis* (Camoni *et al.*, 1998). Así pues se determinó si entre las proteínas capturadas por GST-AtCPK1 se encontraba alguna proteína 14-3-3. Dado que la familia de proteínas 14-3-3 está muy

conservada en plantas (Yao *et al.*, 2007), se utilizó un anticuerpo generado en el laboratorio frente a una proteína 14-3-3 de maíz (Campo, resultados no publicados). Además de las proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad, en el análisis se analizaron también los extractos proteicos de partida en los ensayos de captura. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R19**.

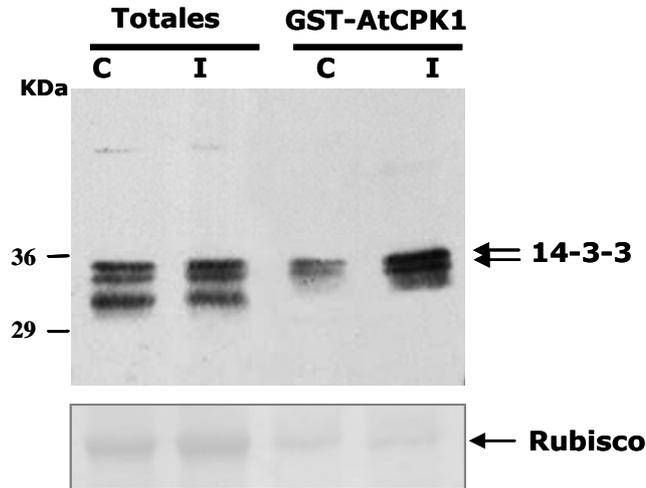


Figura R19. Interacción *in vitro* entre la proteína AtCPK1 con proteínas de la familia 14-3-3. Análisis por inmunotransferencia de extractos proteicos totales (50µg) purificados de plántulas de *Arabidopsis* controles (C) o infectadas (I) durante 24h con esporas de *F. oxysporum*, y de las proteínas capturadas por la proteína GST-AtCPK1 a partir de estos mismos extractos. Se partió de alícuotas iguales (500µg) de cada extracto. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó con el suero anti-Zm14-3-3 (dilución 1/1000) y reveló mediante quimioluminiscencia. Se marcan con flechas las proteínas 14-3-3 que interaccionan con GST-AtCPK1 *in vitro*. La imagen inferior corresponde a la tinción de proteínas con Ponceau de la membrana tras la transferencia, donde se visualiza la banda correspondiente a la Rubisco. A la izquierda de la imagen se indican los marcadores de peso molecular en KDa.

Como se puede observar, en los extractos totales se inmunodetectaron 3 bandas de pesos moleculares estimados entre 30,5-35 KDa, con una acumulación similar en las muestras controles e infectadas. El peso molecular teórico de las proteínas 14-3-3 es variable dependiendo de la isoforma, aunque la mayor parte de los miembros de esta familia se encuentra en el rango entre 27-32 KDa (Chang *et al.*, 2009). Entre las proteínas retenidas por la proteína GST-AtCPK1, se inmunodetectaron dos isoformas 14-3-3 mayoritarias que mostraban una mayor acumulación en las muestras provenientes de plantas infectadas respecto a plantas no infectadas. Estos datos sugieren que el anticuerpo reconoce tres isoformas diferentes de proteínas 14-3-3, cuyos niveles de acumulación no cambian en

respuesta a infección. Tan solo dos de estas isoformas se unen a AtCPK1. En este ensayo se procesaron cantidades de proteína iguales provenientes de plantas control y plantas infectadas lo que hace pensar que la mayor acumulación que se observa de las dos isoformas 14-3-3 tras la purificación por cromatografía de afinidad a partir de plantas infectadas podría deberse a una mayor afinidad de las mismas a AtCPK1 en condiciones de infección.

Por otra parte resultados obtenidos en nuestro grupo (Coca y San Segundo, 2010) y resultados disponibles en la literatura (Dammann *et al.*, 2003) indican que la proteína AtCPK1 se localiza en peroxisomas. Además, se sabe que la proteína APX3, una proteína de la familia de las ascorbato peroxidasas (APX) de Arabidopsis, implicada en la protección frente a estrés oxidativo, se localiza en el peroxisoma (Narendra *et al.*, 2006). Así pues se decidió analizar si AtCPK1 pudiera estar interaccionando con la proteína APX3. Con el objetivo de verificar esta hipótesis, se utilizaron anticuerpos frente a la proteína APX3 (disponibles en el laboratorio) en ensayos de inmunodetección de las proteínas capturadas con la cromatografía de afinidad a GST-AtCPK1. Los resultados se presentan en la **Figura R20**. Los anticuerpos frente a APX3 reconocen a una única proteína de aproximadamente 30 KDa que se encuentra presente en las muestras procedentes de plantas infectadas y plantas control sin infectar. La proteína APX3 también se detecta entre las proteínas capturadas por afinidad a GST-AtCPK1, observándose un ligero enriquecimiento en APX3 en la muestra de plantas infectadas en comparación con la de plantas controles. Para este ensayo se procesaron cantidades iguales de proteína en las muestras control e infectada, lo que sugiere que hay una mayor acumulación en APX3 en las muestras de plantas infectadas respecto a las controles. Estos resultados indican que la proteína AtCPK1 interacciona con la proteína APX3.

En conjunto, los resultados obtenidos con los ensayos de captura de complejos proteicos con la proteína GST-AtCPK1 indican que la proteína AtCPK1 interacciona in vitro con proteínas de la familia 14-3-3 y con la proteína ascorbato peroxidasa 3 (APX3) de Arabidopsis.

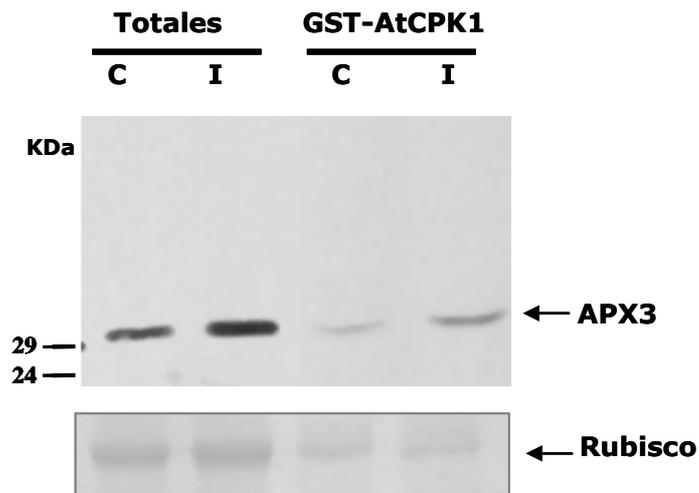


Figura R20. Interacción *in vitro* entre la proteína AtCPK1 con la proteína APX3.

Análisis de inmunotransferencia de extractos proteicos totales (50 μ g) purificados de plántulas de *Arabidopsis* controles (C) o infectadas (I) durante 24h con esporas de *F. oxysporum*, y de las proteínas capturadas por la proteína GST-AtCPK1 a partir de estos extractos. Se partió de alícuotas iguales (500 μ g) de cada extracto. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó con el suero anti-APX3 (dilución 1/1000) y reveló mediante quimioluminiscencia. La imagen inferior corresponde a la tinción de proteínas con Ponceau de la membrana tras la transferencia, donde se visualiza la banda correspondiente a la Rubisco. A la izquierda de la imagen se indican los marcadores de peso molecular en KDa.

4.3. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON AtCPK1 MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE INMUNOAFINIDAD.

La segunda aproximación seguida para la identificación de interactores de la proteína AtCPK1 se basó en la cromatografía en soporte de sefarosa al cual se había unido covalentemente el suero anti-AtCPK1 para la captura de AtCPK1 y de las proteínas que interaccionan con AtCPK1. Las proteínas capturadas se analizaron por electroforesis bidimensional y visualizaron mediante tinción de plata. Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas.

4.3.1. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad a escala analítica.

Se partió de extractos proteicos enriquecidos en proteínas de membranas, obtenidos de plantas crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad, controles o infectadas con *F. oxysporum* (24h). Los extractos proteicos fueron incubados

durante 10 min con formaldehído (1%) para fijar las interacciones entre las proteínas componentes de complejos proteicos. Los extractos proteicos fueron dializados tras la fijación frente a PBS1x para eliminar el exceso de formaldehído. El soporte para la cromatografía de afinidad se preparó tal y como se indica en el apartado 6.7 de Material y Métodos para la unión covalente de los anticuerpos anti-AtCPK1 a una matriz de sefarosa 4B previamente activada con bromuro de cianógeno. Para poner a punto el método se realizaron varios ensayos de cromatografía de inmunoafinidad a escala analítica. Se determinó el rendimiento de la cromatografía de inmunoafinidad como la cantidad de proteína eluída respecto al máximo teórico calculado y se obtuvo una eficiencia del 23,4% (tal y como se indica en el apartado 6.4 de Material y Métodos).

Las proteínas eluídas de la cromatografía de inmunoafinidad (Sefarosa-Anti-AtCPK1) se separaron por electroforesis en SDS y visualizaron mediante tinción con plata. Se observó un perfil de proteínas inmunopurificadas similar en las muestras provenientes de plantas control o de plantas infectadas (**Figura R21A**). En experimentos posteriores, las proteínas inmunopurificadas se analizaron mediante inmunotransferencia con el suero anti-AtCPK1 junto a muestras de los extractos iniciales (extractos totales), utilizándose en todos los casos la misma cantidad de extracto proteico (5 µg). AtCPK1 se detectó en los extractos sometidos a cromatografía de afinidad, mientras que no era detectable en los extractos totales (**Figura R21B**). Así pues se concluye que hay un enriquecimiento de la proteína AtCPK1 en las muestras obtenidas tras la cromatografía de inmunoafinidad, tanto en las muestras de plantas controles como infectadas, respecto a esa misma cantidad de extractos proteicos iniciales.

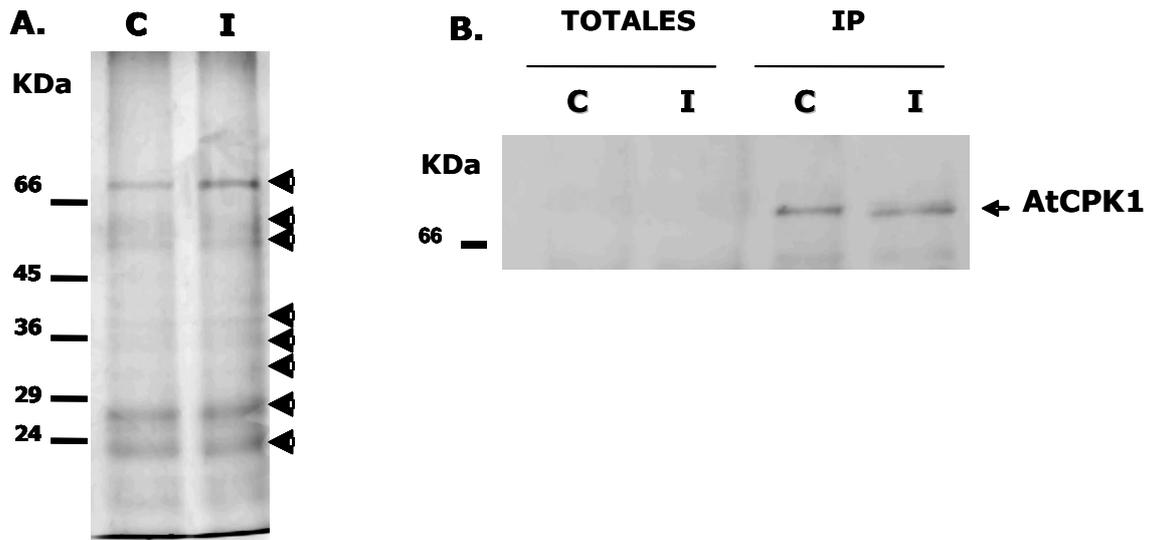


Figura R21. Análisis de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoadinidad a partir de extractos proteicos de plántulas de Arabidopsis (cromatografía analítica). **A.** Perfil de proteínas purificadas de extractos proteicos totales (1 mg) de plántulas de Arabidopsis (15 días) controles(C) e infectadas (I) mediante cromatografía de inmunoadinidad con el suero anti-AtCPK1. Las proteínas inmunopurificadas se separaron en geles de SDS-PAGE (10%) de 18cm y se visualizaron mediante tinción con plata. **B.** Inmunodetección de AtCPK1 en las muestras provenientes de la cromatografía de afinidad. Cantidades iguales (5µg) de extractos totales y de proteínas inmunopurificadas (IP) controles (C) e infectados (I) se separaron en geles SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a nitrocelulosa. La inmunodetección se llevo a cabo con el suero anti-AtCPK1 (dilución 1/1000) y revelado quimioluminiscente (Pierce SuperSignal best Femto kit). A la izquierda de la imagen se indican los marcadores de peso molecular en KDa.

Como se ha mostrado anteriormente, los ensayos de captura de proteínas mediante afinidad a la proteína GST-AtCPK1 (apartado 4.2) permitieron identificar a la proteína APX3 y dos isoformas de la familia de proteínas 14-3-3 como interactores de AtCPK1. Por tanto, se procedió a determinar si estas mismas proteínas se encuentran presentes entre las proteínas que habían sido purificadas mediante cromatografía de inmunoadinidad. El resultado de este experimento se presenta en la **Figura R22**, y muestra la presencia de las isoformas 14-3-3 y APX3 entre las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoadinidad. Al igual que se observó en los ensayos de captura con la proteína recombinante GST-AtCPK1, de las tres isoformas 14-3-3 reconocidas por los anticuerpos anti-Zm14-3-3 en los extractos totales de plántulas de Arabidopsis, solo dos de ellas se encuentran entre las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoadinidad con el anticuerpo

anti-AtCPK1, sugiriendo la asociación específica de AtCPK1 con dos isoformas concretas de proteínas 14-3-3.

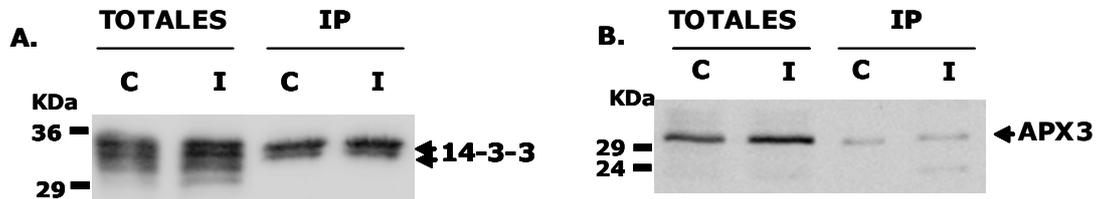


Figura R22. Inmunodetección de proteínas 14-3-3 y APX3 en las muestras purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1.

Análisis de inmunotransferencia de cantidades iguales (5µg) de extractos totales y proteínas inmunopurificadas (IP) por cromatografía de inmunoafinidad de plantas controles (C) e infectadas (I). Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a nitrocelulosa, la inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-Zm14-3-3 (A) y anti-APX3 (B), ambos a una dilución 1/1000, y revelado quimioluminiscente (Pierce SuperSignal best Femto kit). Las proteínas 14-3-3 y APX3, aparecen señaladas con una flecha. A la izquierda de la imagen se indican los marcadores de peso molecular en KDa.

*En definitiva estos resultados demuestran la interacción de la proteína AtCPK1 con las proteínas 14-3-3, así como también con la proteína APX3 tanto en plantas controles como en plantas infectadas con *F. oxysporum*.*

4.3.2. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad a escala preparativa.

Una vez puesto a punto el método a nivel analítico y realizada la validación del mismo (apartado 4.3.1), se realizaron nuevos experimentos a nivel preparativo con el fin de identificar nuevas proteínas que forman parte de los complejos proteicos en los que participa AtCPK1. En estos ensayos, las proteínas purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad se separaron en geles bidimensionales de alta resolución (24 cm de recorrido). Se analizaron 3 réplicas biológicas independientes (**Figura R23**). Al comparar los perfiles de las muestras controles y las muestras infectadas, se aprecian cambios tanto cualitativos como cuantitativos. Destacar que se observa una señal intensa en torno a 68 KDa, con un pI 4.9-5.6, que pudiera corresponder a la proteína AtCPK1, principal proteína esperada en la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-AtCPK1.

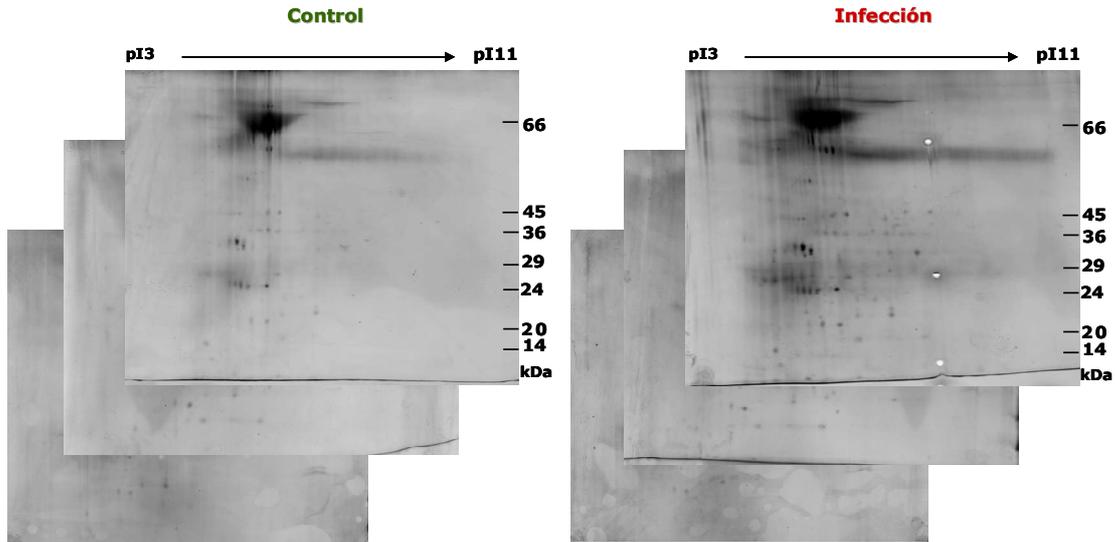


Figura R23. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos anti-AtCPK1 (cromatografía preparativa). Las proteínas se inmunopurificaron a partir de extractos proteicos (10 mg) enriquecidos en proteínas de membrana de plántulas de *Arabidopsis* no infectadas de 15 días (controles) o infectadas con *F. oxysporum* durante 24h. Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles bidimensionales y visualizaron mediante tinción con plata. La primera dimensión se realizó en tiras de isoelectroenfoque de 24 cm, pI 3-11. La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE (10%) de 24 cm. Se analizaron tres réplicas biológicas independientes de cada condición.

El análisis de las imágenes digitalizadas de los geles obtenidos con las tres réplicas biológicas independientes se realizó con el programa Image Master 2D Platinum (Amersham Biosciences). Los parámetros analíticos usados fueron muy restrictivos y solo se consideraron aquellos *spots* presentes en las tres réplicas biológicas. En la **Figura R24** se muestra el resultado del análisis de las imágenes correspondientes a los 3 geles bidimensionales de cada muestra biológica (control e infectada). Se presentan los geles virtuales generados por el programa que representan los *spots* seleccionados a partir de los 3 geles de cada muestra biológica (**Figura R24A**). El análisis de las imágenes representado en forma de diagrama de Venn reveló la presencia de 22 *spots* en las muestras controles, frente a 49 en las muestras infectadas (**Figura R24B**). Un total de 19 *spots* eran comunes entre las muestras controles y las infectadas. Se detectaron 3 *spots* específicos que se encontraban únicamente en las muestras controles y 30 *spots* presentes únicamente en las muestras infectadas.

Así pues, este análisis confirma la capacidad de AtCPK1 para interactuar con diferentes proteínas en respuesta a infección por el hongo *F. oxysporum*.

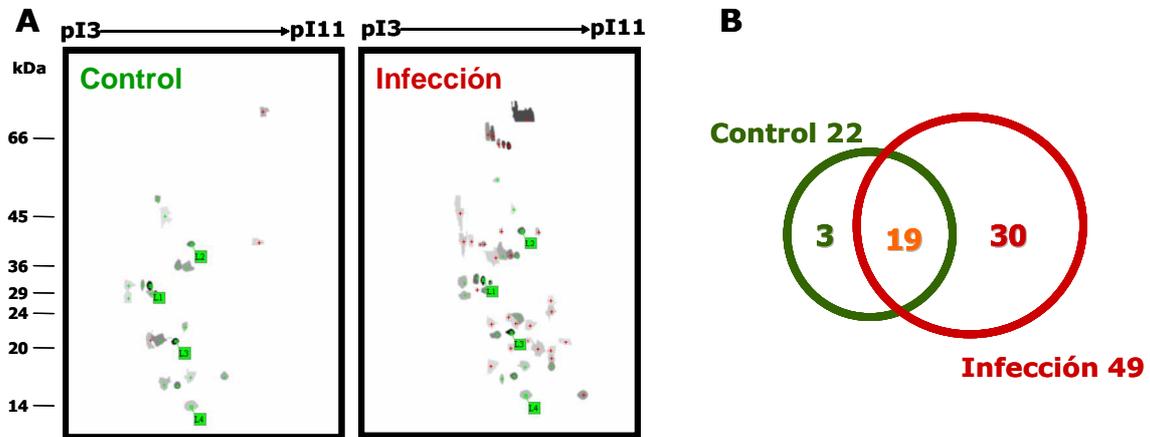


Figura R24. Geles virtuales obtenidos tras el análisis electroforético de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1 a partir de plantas control y plantas infectadas con *F. oxysporum*. **A** Geles virtuales generados con el programa Image Master 2D Platinum representativos del patrón de proteínas inmunopurificadas, donde solo se consideran los *spots* presentes en los tres geles digitalizados correspondientes a las muestras de plantas no infectadas (control) o de plantas infectadas (tres replicas biológicas en cada caso). **B** Diagrama de Venn resumen del análisis de imágenes, donde se indica el número de *spots* seleccionados por su presencia en las 3 réplicas biológicas controles e infectadas. El número total de proteínas consideradas para las muestras controles o infectadas fue de 22 y 49, respectivamente, de las cuales 19 son comunes en ambas condiciones, 3 se encuentran únicamente en las muestras controles y 30 en las muestras infectadas.

4.3.3. Identificación de las proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad mediante mapeo peptídico y secuenciación.

Una vez obtenidos los perfiles mediante electroforesis bidimensional de proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1, se procedió a la identificación de proteínas por mapeo peptídico y secuenciación. Para ello se seleccionaron y recortaron las proteínas a partir del gel correspondiente a muestras infectadas, utilizando como plantilla el gel virtual generado con el análisis de las imágenes. En la **Figura R25**, se muestra el gel virtual de las proteínas inmunopurificadas a partir de plántulas infectadas y se indica el *spot* al que corresponden las diferentes proteínas seleccionadas. Las proteínas seleccionadas fueron sometidas a digestión con tripsina. Los péptidos obtenidos se utilizaron para

análisis MALDI-TOF MS. Para la identificación de las proteínas se utilizaron los programas Protein Prospects v 3.4.1 (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) y MASCOT (ver Material y Métodos, apartado 4.18). El resultado obtenido de la secuenciación de las proteínas seleccionadas se muestra en la **tabla RII**.

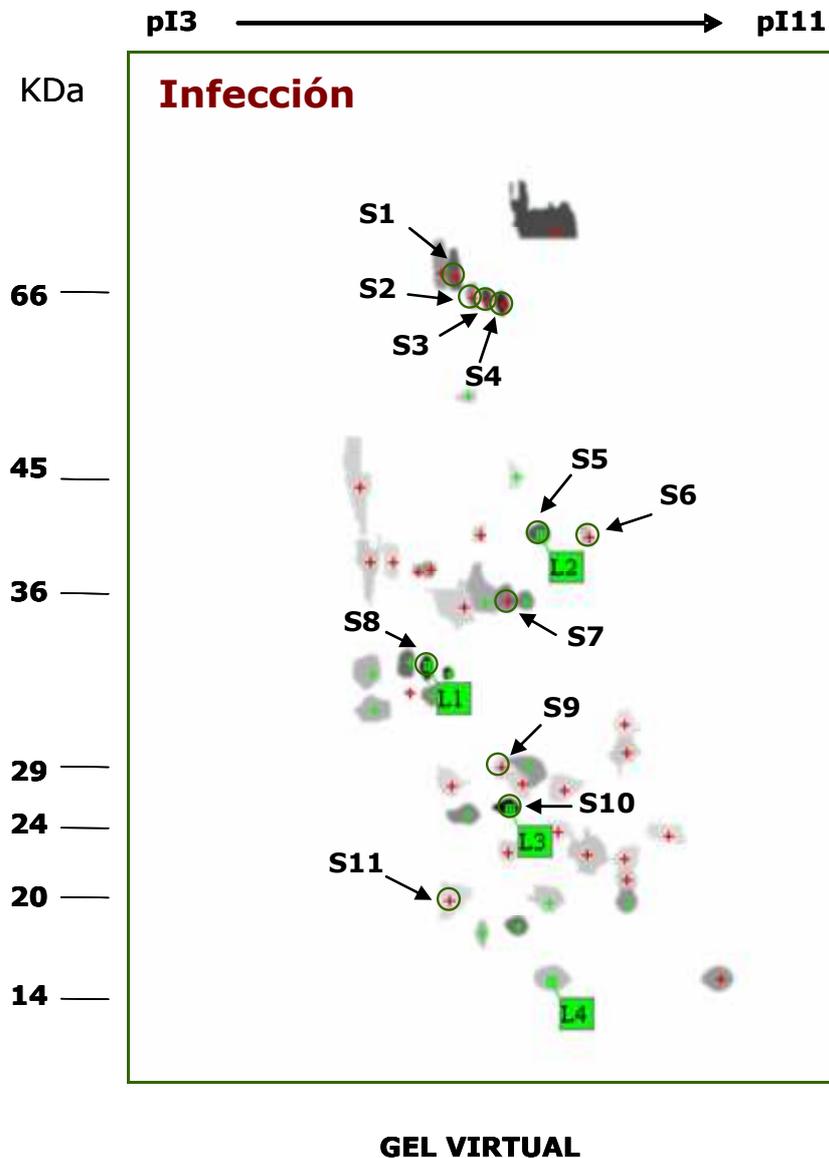


Figura R25. Gel virtual representativo del perfil de proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad a partir de plantas de Arabidopsis infectadas con *F. oxysporum*. Este gel fue utilizado como plantilla para recortar las proteínas de los gels bidimensionales. Se señalan con círculos las proteínas seleccionadas (S1-S11) e identificadas por mapeo peptídico, indicadas en la tabla RII. También se marcan los *spots* L1-L4 (encuadrados en verde) utilizados como referencias para alinear las imágenes de los gels.

Tabla RII. Proteínas purificadas por cromatografía de inmunoafinidad. Las proteínas seleccionadas e indicados en la figura R25, (S1-S11), se analizaron mediante mapeo peptídico e identificaron utilizando el programa "Protein Prospects v3.4.1" y MASCOT

Spot	Proteína	PM (KDa)	pI	Número de acceso	Péptidos identificados	Localización subcelular
S1	Subunidad A H ⁺ ATPasa tipo V	69,1	5,11	gi 15219234	R.ISGDVYIPR.G K.LAADTPLLTGQR.V	Vacuola
S2	Catalasa 3	57,0	8,31	gi 2347178	R.LNVRPSI.- R.IFAYGDTQR.H K.TNIQEYWR.I K.IWPEDILPLQPVGR.L K.QVQIMGTR.Q + Oxidation (M)	Cloroplasto, peroxisoma
S3	Subunidad alfa H ⁺ ATPasa tipo F	55,3	5,19	gi 7525018	R.VINALANPIDGR.G K.IAQIPVSEAYLGR.V	Cloroplasto
S4	Subunidad beta H ⁺ ATPasa tipo F	53,9	5,38	gi 7525040	K.LSIFETGIK.V K.SAPAFIELDTK.L K.AHGGVSVFGGVGER.T R.FVQAGSEVSALLGR.M R.VGLTALTMAEYFR.D R.VGLTALTMAEYFR.D + Oxidation (M) K.VALVYGQMNPPGAR.M K.VALVYGQMNPPGAR.M + Oxidation (M) R.IVGEEHYETAQQVK.Q R.IAQIIGPVLDAFPPGK.M R.IFNVLGEPVDNLGPVDTR.T R.MPSAVGYQPTLSTEMGLQER.I R.DTLGQEINVTCEVQQLGNRR.V	Cloroplasto
S5	Precursor subunidad gamma H ⁺ ATPasa tipo F	41,1	8,13	gi 18412632	K.SLSMVYNR.K + Oxidation (M) K.GLGLTYVISVGK.K R.GLCGGFNNFIK.K R.ALQESLASELAAR.M	Cloroplasto
S6	Fructosa bifosfato aldolasa	43,1	6,78	gi 18420348	R.TAAYYQQGAR.F R.ATPEQVAAYTLK.L R.TVVSIPNGPSALAVK.E	Cloroplasto
S7	PSBO-1 (<i>PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX 1</i>)	35,3	5,55	gi 15240013	R.VPFLFTVK.Q K.NAPPEFQNTK.L K.IQGVWYQLE.- K.RLTYDEIQSK.T K.FCFEPTSFTVK.A R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G K.EEDGIDYAAVTVQLPGER.V K.GTGTANQCPTIDGGSETFSFKPGK.Y R.GGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELVK.E K.SKPETGEVIGVFESLQPSDSDLGAK.V K.CSDAVKIAGFALATSALVVS GASAE GAPK.R K.VTKSKPETGEVIGVFESLQPSDSDLGAK.V	Cloroplasto
S8	Subunidad gamma H ⁺ ATPasa tipo F	33,4	6,12	gi 5708095	K.SLSMVYNR.K + Oxidation (M) K.GLGLTYVISVGK.K R.GLCGGFNNFIK.K R.ALQESLASELAAR.M	Cloroplasto
S9	LHCB 2 (Proteína de unión a clorofilas a/b)	28,6	5,48	gi 4741944	R.ELEVIHSR.W K.FGEAVWFK.A K.STPQSIWYGPDRPK.Y	Cloroplasto
S10	LHCP AB 180 (Proteína de unión a clorofilas a/b)	25,0	5,12	gi 16374	R.ELEVIHSR.W K.FGEAVWFK.A K.GPSGSPWYGS DR.V	Cloroplasto
S11	Proteína del fotosistema II de 22 kDa	16,3	4,59	gi 6006279	K.EQGPLFGFTK.A K.ANELFVGR.L	Cloroplasto

Entre las proteínas identificadas se ha encontrado la subunidad A de la **H⁺-ATP sintasa tipo V** (proteína S1). Las proteínas V-ATPasas forman un complejo multienzimático compuesto por el subcomplejo citosólico ATP-V1 (subunidades A a H) y el subcomplejo transmembrana de translocación de protones V0 (subunidades a, d, c, c' y c''). Esta bomba de protones está asociada a membranas de vacuolas

o vesículas de transporte intracelular. Entre las funciones de las V-ATPasas esta transporte de iones de hidrógeno y síntesis de ATP, actividad hidrolasa y cataliza el movimiento transmembrana de moléculas (Nishi y Forgac, 2002; Nelson, 2003).

También se ha encontrado la **catalasa 3** (proteína S2) que participan en la detoxificación del exceso de intermediarios reactivos de oxígeno durante procesos de estrés y fotosíntesis.

Sorprendentemente, la mayoría de las proteínas identificadas en este estudio participan en procesos que tienen lugar en el cloroplasto. Así, se han identificado **la cadena alfa, la cadena beta y la cadena gamma del complejo F1 de la ATP sintasa o ATPasa cloroplástica** (proteínas S3, S4 y S5, respectivamente) implicadas en la síntesis/hidrólisis de ATP. Este complejo enzimático se localiza en la membrana del tilacoide y funciona acoplado la síntesis y/o hidrólisis de ATP con el flujo de protones a través de la membrana, los cuales son generados durante la fotosíntesis.

También se ha identificado diferentes componentes de los fotosistemas, tales como **la proteína de unión a clorofilas a/b AB 180** (LHCP AB180, proteína S10). Esta proteína está implicada en la transferencia de la energía de excitación de la luz al centro de reacción del fotosistema II (PSII) donde los electrones procedentes de la molécula de agua son elevados a un nivel energético superior. Otra de las proteínas identificadas es la **LHCB2** (proteína S9), que al igual que LHCP AB 180 pertenece a la familia LHC, y funciona como antena para ambos fotosistemas (Jackowski *et al.*, 2001). También hemos encontrado la proteína **PSBP-1** (proteína S7) que codifica una proteína de 23 kDa que forma parte del fotosistema II y participa en la regulación de la evolución de oxígeno (Yi *et al.*, 2007). Además se han identificado la **proteína de 22 KDa del PSII** (S11).

Otra de las proteínas identificadas es la **fructosa-bifosfato aldolasa** (proteína S6) localizada en el cloroplasto. Esta enzima está implicada en la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis (Tsutsumi *et al.*, 1994).

Resumiendo, la purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos anti-AtCPK1 ha permitido identificar varias proteínas asociadas a AtCPK1 o a los complejos de los que forma parte AtCPK1. Estas proteínas se localizan mayoritariamente en el cloroplasto y han sido asociadas a la síntesis de ATP y estrés oxidativo.

4.4. PURIFICACIÓN DE COMPLEJOS EN LOS QUE PARTICIPA AtCPK1 MEDIANTE EL SISTEMA TAP (TANDEM AFFINITY PURIFICATION)

La tercera estrategia seguida para identificar las proteínas con las que interacciona AtCPK1 se basó en el sistema de purificación TAP, basado en la expresión en plantas transgénicas de genes de fusión que codifican proteínas marcadas con epítomos que permiten la purificación secuencial por afinidad de complejos proteicos. La ventaja del sistema de purificación TAP radica en que permite la purificación de complejos proteicos que se forman *in vivo*. El sistema TAP que hemos utilizado es una versión mejorada para sistemas vegetales (Rubio *et al.*, 2005). La extensión que se añade a las proteínas contiene 9 repeticiones del epítomo myc, una cola de 6 histidinas (6xHis), seguidas de un sitio de reconocimiento por la endoproteasa 3C, y dos copias del dominio de unión a inmunoglobulinas G (2xIgGBD) de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (ver **Figura R26**). Ello permite la purificación secuencial por afinidad a IgG, por cromatografía de afinidad a metales y por inmunoafinidad al epítomo myc. Posteriormente, las proteínas purificadas a partir del complejo TAP fueron identificadas mediante espectrometría de masas.

4.4.1. Obtención de plantas transgénicas que expresan el gen de fusión AtCPK1-TAPa

En primer lugar se preparó un vector para la expresión en plantas del gen que codifica la proteína de fusión en la que la extensión cTAPa se ha fusionado al extremo C-terminal de AtCPK1 (**Figura R26**). Se eligió la fusión en C-terminal, para así dejar el dominio N-terminal variable de AtCPK1 libre y evitar interferencias en la funcionalidad de la proteína, puesto que este dominio determina su localización subcelular (resultados del grupo de investigación). La expresión del gen fusión se realizó bajo el control del promotor 35Sx2 (CaMV35Sx2) y el terminador *nos*. El vector se preparó a partir del plásmido pC-TAPa proporcionado por Ohio State University Stock Center y descrito en Rubio *et al.*, 2005. Este vector está basado en el sistema de clonación GATEWAY mediado por recombinación.

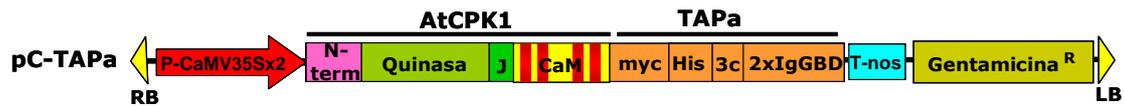


Figura R26. Esquema de la construcción pC:AtCPK1-TAPa utilizada para la transformación de plantas de Arabidopsis. El vector obtenido deriva del plásmido pC-TAPa, en el cual se han insertado las secuencias del cDNA AtCPK1 mediante recombinación con el sistema GATEWAY. La expresión del gen de fusión *AtCPK1-TAPa* está dirigida por el promotor CaMV35Sx2 (P-CaMV35Sx2) y el terminador *nos* (T-nos). La extensión TAPa contiene el epítipo c-myc, 6 residuos de His, el sitio de reconocimiento de la endoproteasa 3C (3C) y el dominio de unión a inmunoglobulinas G duplicado (2xIgGBD). El T-DNA del plásmido pC-TAPa contiene el gen de resistencia al antibiótico gentamicina. RB y LB corresponden a las secuencias del *right border* y *left border* que delimitan el T-DNA.

La construcción se preparó a partir de la secuencia del cDNA de AtCPK1 amplificada por PCR a partir del plásmido pGEM-Teasy-AtCPK1 utilizando los oligonucleotidos AtCPK1_KpnI_directo y AtCPK1_NotI_reverso (ver tabla M1 de Material y métodos). El fragmento de PCR se clonó en el plásmido pGEM-Teasy (Promega) y se verificó la secuencia por secuenciación. A partir del plásmido obtenido se purificó el fragmento de cDNA codificante mediante restricción con los enzimas KpnI/NotI y se clonó en el vector pENTR3C (Invitrogen) en estos mismos sitios de restricción. La secuencia del plásmido obtenido (pENTR3C-AtCPK1) se comprobó mediante secuenciación. A partir de este plásmido y mediante recombinación con el sistema GATEWAY, el cDNA de AtCPK1 se clonó en el vector plásmido pC-TAPa. Este vector binario se utilizó para la transformación de plantas de Arabidopsis (ecotipo Col2) vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Las líneas transgénicas de Arabidopsis se seleccionaron en medio con el antibiótico gentamicina, cuya resistencia es conferida por el gen de selección del T-DNA. Se obtuvieron un total de 12 líneas independientes. Se analizó la acumulación de la proteína de fusión AtCPK1-cTAPa en la generación T1 (líneas heterocigotas). Este análisis se hizo mediante ensayos de inmunotransferencia con anticuerpos específicos bien frente al epítipo myc (**Figura R27A**) o bien frente a AtCPK1 (**Figura R27B**). En la mayoría de las líneas se pudo detectar la acumulación de la proteína de fusión de un tamaño aproximado de 90KDa, acompañada de otros polipéptidos de menor intensidad y tamaño, probablemente productos de degradación o versiones truncadas de la proteína fusión. En la **figura R27** se muestra el resultado obtenido para dos de las líneas transgénicas (L2 y L6), seleccionadas por que acumulan niveles elevados de la proteína de fusión. Estas

líneas se utilizaron para la purificación de las proteínas que interaccionan con AtCPK1-TAPa.

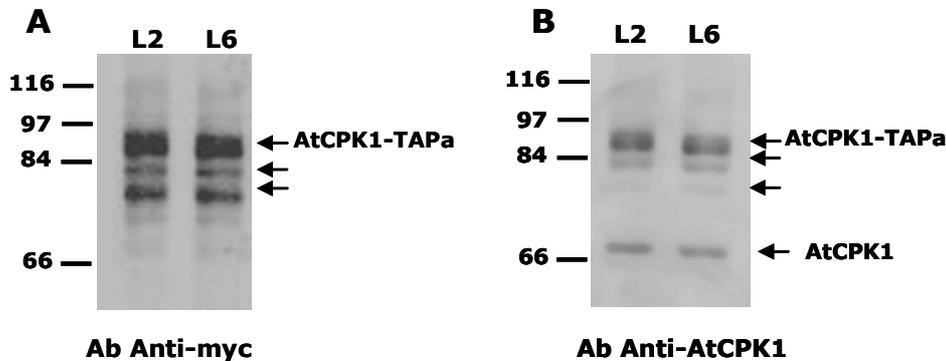


Figura R27. Acumulación de la proteína fusión AtCPK1-TAPa en plantas transgénicas de Arabidopsis. Inmunodetección de la proteína AtCPK1-TAPa en extractos de proteínas enriquecidos en proteínas de membrana (15µg de proteína) obtenidos a partir de las líneas transgénicas L2 y L6. Se utilizaron anticuerpos específicos frente al epítipo myc (A) o frente a AtCPK1 (B). Se detecta la presencia de la proteína de fusión (A y B). En B, se detecta además la proteína AtCPK1 endógena.

4.4.2. Purificación de complejos proteicos mediante el sistema TAP.

La purificación de los complejos proteicos con el sistema TAP se realizó a partir de plántulas transgénicas de la generación T1 crecidas en medio de cultivo suplementado con el antibiótico gentamicina. Las plantas se infiltraron con una solución de formaldehído (1%) para fijar las uniones entre las proteínas de los complejos durante el proceso de purificación. Una vez fijadas, se realizó la purificación de los complejos siguiendo el método esquematizado en la **figura R28** que consiste en la purificación secuencial de los complejos AtCPK1-TAPa por afinidad a IgG, digestión con proteasa 3C y purificación por afinidad a cromatografía de níquel. Tras la purificación de los complejos, las muestras son tratadas con DTT a altas temperaturas para liberar las proteínas previamente fijadas por el tratamiento con formaldehído. Finalmente las proteínas se analizaron por SDS-PAGE para su posterior identificación mediante espectrometría de masas.

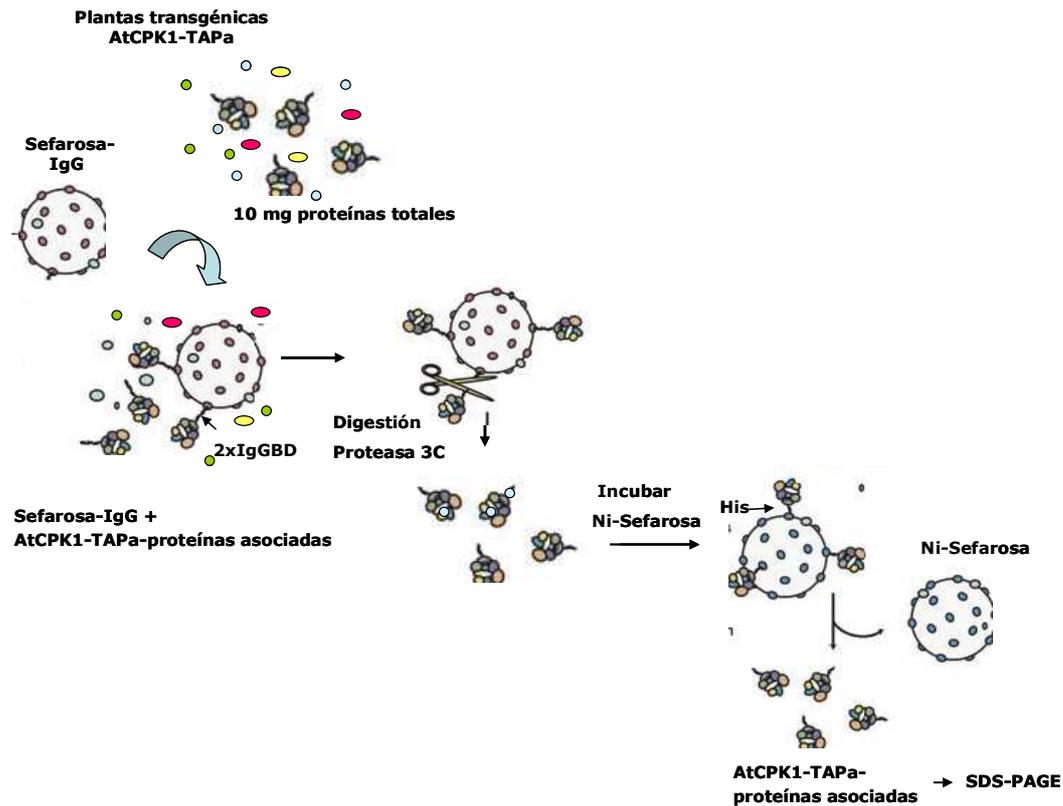


Figura R28. Esquema del proceso de purificación de los complejos proteicos en los que participa AtCPK1 con el sistema TAP (*Tandem Affinity Purification*). La purificación se realizó a partir de extractos de proteínas (10 mg) de plántulas (línea L6) crecidas *in vitro* (5 días). Estos extractos totales se incubaron con una matriz de Sefarosa-IgG (*IgG-Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare), a la cual queda unida la proteína AtCPK1-TAPa por el motivo 2xIgGBD, situado en la parte más distal de la proteína fusión. Los complejos retenidos en la matriz se incubaron con la proteasa 3C, liberando a la proteína AtCPK1-cTAPa del dominio 2xIgGBD, resultando así en la proteína de fusión AtCPK1-myc-His. La proteína eluida es purificada por afinidad a una matriz de níquel (*Ni-Sepharose*, GE Healthcare) a la cual se unen los complejos a través del motivo de His de la proteína de fusión. Los complejos retenidos en esta matriz se eluyeron y analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE.

En la **figura R29** se muestra el perfil electroforético de las proteínas obtenidas en el ensayo de purificación con el sistema TAP. Como puede observarse es un perfil complejo. Se seleccionaron 7 zonas del perfil de proteínas obtenido (señaladas de la A1-A7 en la **figura R29**) para su posterior identificación mediante espectrometría de masas. En paralelo, debería haberse seguido el proceso de purificación con plantas transformadas con el gen que codifica la extensión TAPa, sin la proteína AtCPK1, para poder discriminar las bandas proteicas purificadas por afinidad al TAPa de aquellas que interactúan específicamente con AtCPK1. Estas

proteínas están sin embargo descritas en la literatura (Chang *et al.*, 2009), por lo que no se hizo necesario realizar este control.

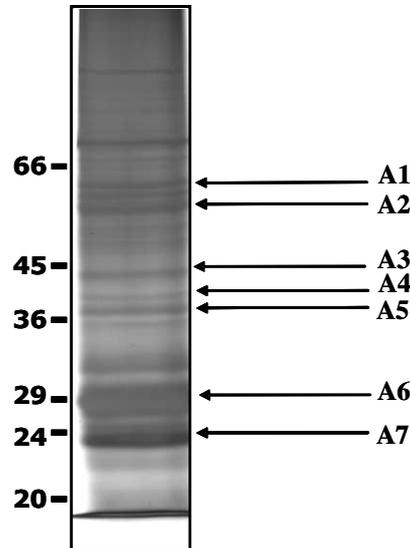


Figura R29. Análisis electroforético de las proteínas purificadas mediante el sistema TAP. La purificación se realizó a partir de plántulas de Arabidopsis (línea L6) que acumulan la proteína AtCPK1-TAPa. Las proteínas obtenidas se separaron en geles SDS-PAGE (7,5%) de 18cm y se visualizaron mediante tinción con plata. Las zonas del perfil electroforético que se seleccionaron para la posterior identificación de proteínas mediante espectrometría de masas se indican con flechas (A1-A7).

4.4.3. Identificación de proteínas presentes en complejos proteicos purificados mediante el sistema TAP por espectrometría de masas.

Las proteínas purificadas con el sistema TAP, y separadas electroforéticamente fueron recortadas del gel, digeridas con tripsina y analizadas mediante MALDI-HPLC. Las proteínas se identificaron con ayuda de los programas *Protein Prospector v 3.4.1* (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) y el MASCOT (*Matrix Science Inc*). Las proteínas identificadas en este estudio se muestran en la **tabla RIII**.

Tabla RIII. Proteínas identificadas en el complejo proteico purificado por el sistema TAP. Las zonas del perfil electroforético seleccionadas (A1-A7 en la Figura R29) se analizaron mediante MALDI-HPLC. Los programas Protein Prospects v3.4.1 y MASCOT se utilizaron para identificar las proteínas.

Spot	Proteína	PM (KDa)	pI	Número de acceso	Péptidos identificados	Localización subcelular
A1	Subunidad beta H ⁺ ATPasa tipo F	59,8	6,18	gi 18415911	R.DAEGQDVLLFIDNIFR.F R.DAPALVDLATGQEILATGIK.V	Mitocondria
	Posible glutamina amidotransferasa	59,6	6,08	gi 15222505	R.SLNVFSLVISGTSSLK.S	-
	Catalasa 3	57,0	8,31	gi 2347178	K.TNIQEYWR.I R.APGVQTPVIVR.F K.VPTPTNSYTGIR.T R.LGPNYLQLPVNAPK.C R.GPVLLEDYHLIEK.V R.EGNFDLVGNNTPVFFIR.D	Peroxisoma, cloroplasto
	Subunidad alfa H ⁺ ATPasa tipo F	55,2	6,23	gi 26557005	R.EVAFAQFGSDLDAATQALLNR.G	Cloroplasto
	Subunidad B1 H ⁺ ATPasa tipo V	54,8	4,90	gi 166627	K.YQEIWNIR.L R.GQVLEVDGEK.A K.TPVSIDMLGR.I + Oxidation (M) K.FVMQGYDTR.N + Oxidation (M) R.TVSGVAGPLVILDK.V K.FTTVQFTGEVLK.T R ₂ QIYPPINVLPSLSR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QIYPPINVLPSLSR.L R.NIFQSLDLAWTLR.I R.IALTTAEYLAYECGK.H R.VTLFLNLANDPYIER.I K.IPLFSAAGLPHNEIAAQICR.Q K.DHSDVSNQLYANYAIGKDVQAMK.A + Oxidation (M) K.AVVGEEALSSDLYLEFLDKFER.K	Vacuola
	Lipoamida dehidrogenasa 1 (F21D18.28)	54,0	6,56	gi 8778521	K.FPFMANSR.A + Oxidation (M) K.HSFANHGK.V K.AIDNAEGLVK.I K.SLPGITIDEK.K K.HIIVATGSDVK.S R.TPFTSGLDLEK.I R.GALGGTCLNVGCIPSK.A K.FISPNEVSVETIDGGNTIVK.G R.FLSNVPGVYAIGDVIPGPMIAHK.A + Oxidation (M)	Mitocondria
	Lipoamida dehidrogenasa 2 (LPD2)	54,2	6,55	gi 30684419	K.FPFMANSR.A + Oxidation (M) K.HSFANHGK.V K.AIDNAEGLVK.I K.SLPGITIDEK.K K.HIIVATGSDVK.S R.TPFTSGLDLEK.I R.GALGGTCLNVGCIPSK.A K.FISPNEVSVETIDGGNTIVK.G R.FLSNVPGVYAIGDVIPGPMIAHK.A + Oxidation (M)	Mitocondria, cloroplasto
	Posible proteína de unión a selenio	54,4	5,37	gi 15236385	K ₂ QLIDLGPTGLLPLEIR.F + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	-
	Subunidad alfa H ⁺ ATPasa tipo F	50,0	5,99	gi 153799734	R.EVAFAQFGSDLDAATQALLNR.G	Cloroplasto
A2	Catalasa	57,1	6,75	gi 16215	R.APGVQTPVIVR.F R.LGPNYLQLPVNAPK.C R.EGNFDLVGNNTPVFFIR.D	-
	Proteína similar a aminotransferasas	51,2	6,33	gi 11994739	R.TTKPSLDLAK.V K.AFFTSGGSDANDTQVK.L K.KYDILFIADEVICAFGR.L K.YLDSLGLWCTALGGNEPR.L	Cloroplasto
	Proteína similar a glicina hidroximetil-transferasas	50,9	8,13	gi 4049354	R.IGSPAMTTR.G + Oxidation (M) K.LIIAGASAYS.R.D	Mitocondria
	PTAC17 (<i>Plastid Transcriptionally Active 17</i>)	49,7	5,67	gi 15220146	K.TINSMAQMTR.T + 2 Oxidation (M) R.IPATITIGFLGSGK.T R.IAVIENEFGEVDIDGSLVASK.S	Cloroplasto

A3	Catalasa 3	57,0	8,31	gi 2347178	K.NLTDEEAK.V K.VPTPTNSYTGIR.T R.LGPNYLQLPVNAPK.C K.IWPEDILPLQPVGR.L R.APGVQTPVIVR.F K.IWPEDILPLQPVGR.L R.EGNFDLVGNNTPVFFIR.D	Peroxisoma, cloroplasto
	Subunidad E3 de la 2-oxoglutarato dehidrogenasa	50,2	6,00	gi 4210334	R.GVEGLFKK.N K.EGVSYNVVGK.F K.FPFMANSR.A + Oxidation (M) K.AIDTAEGMVK.I + Oxidation (M) K.SLPGITIDEK.K K.HIIVATGSDVK.S R.TPFTSGLDLEK.I K.IVSSTGALSLEIPK.K R.GALGGTCLNVGCIPSK.A K.KIVSSTGALSLEIPK.K	Mitocondria
	GDH2 (Glutamato dehidrogenasa 2)	45,0	6,07	gi 15240793	R.DLSLSELER.L K.VVAVSDITGAIR.N R.NPEGIDINALIK.H K.DDGTLSVYIGFR.V K.VECTIPKDDGTLVSYIGFR.V K.FIVEAANHPTDPDAEILSK.K K.SIQGLTFVIQGFNGVGTWAAK.L	Mitocondria
	AGT (Alanina; glioxilato aminotransferasa)	44,4	7,69	gi 15225026	K.ALSLPTGLGIVCASPK.A R.AALDLIFEEGLENIIAR.H	Peroxisoma
	Proteína similar a alcohol dehidrogenasas	41,5	6,64	gi 10177043	K.LAESGIFNLNAVSSK.Y	-
A4	GAPA-2 (Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa)	43,1	8,16	gi 15222111	R.AAALNIVPTSTGAAK.A R.VVDLADIVANNWK.- K.GTMTTTHSYTGDQR.L + Oxidation (M) K.DSPLDVVINDTGGVK.Q R.VPTPNVSVVLDLVVQVSK.K	Cloroplasto
	Posible Glicolato oxidasa peroxisomal	40,3	9,16	gi 15231850	K.NFEGLDLGK.M K.AIALTVDTPR.L R.IPVFLDGGVR.R R.FFQLYVYK.N R.FTLPPNLTLK.N R.QLDYVPATISALEEVK.A + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLDYVPATISALEEVK.A R.AASAAGTIMTLSSWATSSVEEVASTGPGI R.F + Oxidation (M)	Peroxisoma
A5	NAD-MDH (Malato dehidrogenasa cloroplástica dependiente de NAD)	42,6	8,48	gi 3256066	K.LFGVTTLDVVR.A R.IQNAGTEVVDAK.A	Cloroplasto
	Catalasa 2	57,0	6,63	gi 1246399	R.EGNFDIVGNFVFFIR.D R.APGVQTPVIVR.F R.LGPNYLQLPVNAPK.C R.GPILLEDYHLVEK.L	Peroxisoma
	Nitrilasa I	38,5	5,78	gi 16400	R.KSVTFVTK.V K.LMPTSLER.C + Oxidation (M) R.KLMPTSLER.C + Oxidation (M) K.LGAAICWENR.M K.YHASAIHVPGVEVAR.L K.GAELVLFPEFGGYPR.G K.EGYTLYCTVLFSPQGQFLGK.H	-
	Nitrilasa 2	37,5	5,35	gi 6624886	K.FIVEAASK.G K.LMPTSLER.C + Oxidation (M) R.KLMPTSLER.C + Oxidation (M) K.LGAAICWENR.M K.YHASAIKVPGVEVK.L K.GSELVVFPEAFIGGYPR.G K.DGYTLYCTALFFSPQGQFLGK.H	-
	Nitrilasa 3	38,3	5,62	gi 15229936	K.FIVEAASK.G K.IGAAICWENR.M K.DGYTLYCTALFFSPQGQFLGK.H	-
	PMDH1 (Malato dehidrogenasa 1 peroxisomal dependiente de NAD)	37,8	8,11	gi 15227752	R.IQNGGTEVVEAK.A R.DDLFNINAGIVR.T K.AIVNIISNPVNSTVPIAAEVFK.K	Peroxisoma
A6	Subunidad D H ⁺ ATPasa tipo V	29,1	9,52	gi 5360953	R.SRTENIAGVK.L K.TSSFALTEVK.Y R.NFLVGAEKDSDIIF.-	Vacuola

	Proteína de la familia de las USPs (<i>Universal Stress Proteins</i>)	28,3	5,70	gi 18416966	R.LNLSAVIMGSR.G + Oxidation (M)	Citoplasma
	Subunidad de 24 KDa de la NADH dehidrogenasa	27,5	7,55	gi 3892051	R.DIESALLDHLGVK.R	Mitocondria
A7	CA1 (<i>CARBONIC ANHYDRASE 1</i>)	29,8	5,54	gi 30678347	K.AFDPVETIK.Q K.YMVFACSDSR.V + Oxidation (M) K.YETNPALYGELAK.G K.YGGVGAIEYAVLHLK.V R.EAVNVSLANLLTYPFVR.E	Cloroplasto
	GAMMA CAL2 (<i>GAMMA Carbonic Anhydrase-Like 2</i>)	28,1	8,88	gi 15228424	R ₁ QIIPLGQWLPK.V + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.ITVGFCSNVQER.C	Mitocondria, cloroplasto, membrana plasmática
	LHCP AB 180 (Proteína de unión a clorofila a/b)	25,0	5,12	gi 16374	R.NRELEVIHSR.W K.GPSGSPWYGS DR.V	Cloroplasto
	CLPP2 (<i>Caseinolytic Protease Proteolytic subunit 2</i>)	26,3	6,71	gi 18420643	R.VWDALNELYVK.H	Cloroplasto Mitocondria
	Proteína relacionada con nodulinas	19,6	7,25	gi 15227642	K.VAGATADILDAASR.Y K.KPESSDPEPNHNK.N	-

Resaltar que entre las proteínas identificadas se encuentran proteínas que fueron también identificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1 (Tabla RII). Las proteínas identificadas mediante las dos aproximaciones que pudieran interactuar con AtCPK1 o formar parte de complejos multiproteicos con AtCPK1 son la proteína de unión a las clorofilas a/b, la catalasa 3 y la subunidad alfa de la ATPasa cloroplástica (correspondientes a las fracciones A7, A3 y A1, respectivamente).

Las proteínas identificadas mediante el sistema TAP se pueden agrupar en las siguientes categorías funcionales:

- i) Proteínas que participan en la fotosíntesis.
- ii) Proteínas implicadas en el estrés oxidativo y la detoxificación.
- iii) Proteínas con función en la fotorespiración.
- iv) Proteínas implicadas en metabolismo y respuesta frente a estrés.
- v) Otras proteínas.

i) Proteínas que participan en la fotosíntesis.

Entre las proteínas agrupadas en esta categoría funcional se encuentran las proteínas asociadas al fotosistema II (proteínas de unión a las clorofilas a/b, LHCP AB 180), e implicadas en la síntesis de ATP y transporte de protones al estroma del cloroplasto (subunidad alfa de la H⁺-ATPasa cloroplástica). Estas mismas proteínas fueron identificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad. Entre las nuevas proteínas identificadas con el sistema TAP tenemos a la anhidrasa carbónica 1

(**CA1**), enzima cloroplástica implicada en la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis. Esta proteína también se ha implicado en la defensa frente a bacterias y en la respuesta a frío (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). La anhidrasa carbónica se une al SA (Slaymaker *et al.*, 2002).

ii) **Proteínas implicadas en el estrés oxidativo y detoxificación.**

Durante la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa en la mitocondria se producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, el estrés ambiental y la infección por patógenos activan la producción de ROS, que actúan simultáneamente como mecanismo protector y señalizador de las respuestas de defensa. Estas moléculas son altamente reactivas y pueden causar el deterioro y la oxidación de biomoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por ello, los niveles de ROS está finamente regulados y diversas proteínas participan en la detoxificación de las ROS, tales como las proteínas ascorbato peroxidasa (APX) y las catalasas. Mediante el sistema TAP se ha identificado a las catalasas 2 y 3. Los ensayos de purificación de proteínas por cromatografía de inmunoafinidad con el suero inmune anti-AtCPK1 también identificaron la catalasa 3 y a la proteína APX3.

También se han identificado 3 proteínas nitrilasas (NIT1, NIT2 y NIT3) de las 4 nitrilasas descritas en *Arabidopsis* (Janowitz *et al.*, 2009). Las proteínas nitrilasas 1-3 son bastante similares entre ellas, pero considerablemente diferentes a la NIT4. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de grupos nitrilos (cianidas orgánicas) de sus grupos carboxilos liberando un grupo amonio. Las nitrilasas están implicadas en la detoxificación de cianidas y el reciclaje del nitrógeno (Piotrowski, 2008).

iii) **Proteínas con función en la fotorespiración.**

Se han identificado varias proteínas implicadas en la fotorespiración tales como la **S-2-hidroxi-oxidasa**, una **oxidasa de glicolato**, una **aminotransferasa de glyoxilato**, una **gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa**, la **glutamato deshidrogenasa 2**, una **oxidoreductasa**, la **2-oxoglutarato deshidrogenasa** y la **lipoamida deshidrogenada 2**. Esta ruta está implicada en la obtención de O₂ y fijación de moléculas de carbono.

iv) **Proteínas implicadas en metabolismo y respuesta frente a estrés**

Aunque muchas de estas proteínas se conocen por su implicación en el metabolismo, para algunas de ellas se ha descrito una función adicional en respuesta a distintos estreses, como por ejemplo la **glicina hidroximetiltransferasa** que se ha implicado en el control de daño celular

provocado por estrés abiótico y en la muerte celular inducida por patógenos (Moreno *et al.*, 2005). La **aminotransferasa**, ha sido descrita como uno de los genes regulados por cambios en el estado redox de los transportadores de electrones fotosintéticos (por ejemplo, el pool de plastoquinona) e inducidos por el estrés lumínico o en la aclimatación sistémica adquirida (SAA) (Muhlenbock *et al.*, 2008). La expresión de **glutamato dehidrogenasa (GDH)** es inducida por el ataque de patógenos y elicitores; su inducción por *Pseudomonas syringae* está asociada a la respuesta hipersensible. La GDH es considerada un marcador de senescencia por su implicación en la movilización de nitrógeno en hojas senescentes (Pageau *et al.*, 2006).

v) Otras proteínas.

Otra de las proteínas identificadas es la proteína **CLPP2**, subunidad 2 del complejo CLP proteolítico dependiente de ATP localizado en mitocondrias y cloroplastos (Peltier *et al.*, 2004). También se han encontrado dos subunidades de la **H⁺-ATPasa vacuolar**, las subunidades D y la B, enzima que controla el gradiente electroquímico de protones a través de las endomembranas eucarióticas. Esta enzima está implicada funcionalmente en el mantenimiento de la homeostasis de iones y el tráfico de intracelular de membranas (Dettmer *et al.*, 2005). La subunidad A de esta protón ATPasa se identificó en los ensayos de cromatografía de inmunoafinidad.

Así pues la aproximación seguida en este trabajo basada en el sistema TAP ha permitido identificar a un grupo de proteínas potencialmente candidatas a interaccionar con AtCPK1 o a formar parte de los complejos proteicos en los que participa la proteína AtCPK1 en condiciones de crecimiento normal de la planta de Arabidopsis. Sin embargo, no hay que olvidar que las proteínas han sido identificadas en una situación de sobreexpresión de AtCPK1. Al ser agrupadas en categorías funcionales se distingue una implicación importante de estas proteínas en la fotosíntesis, la fotorespiración, detoxificación y protección frente a estrés oxidativo. Funciones de gran importancia en el metabolismo pero también puntos clave a la hora de proteger la célula frente a un estrés tanto abiótico como biótico.

4.5. ENSAYOS *PULL-DOWN* PARA LA VALIDACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON AtCPK1.

Con el fin de validar alguna de las interacciones identificadas bien mediante cromatografía de inmunoafinidad, bien con el sistema TAP, se decidió analizar algunas de estas interacciones mediante la técnica de *pull-down*. No obstante, esta técnica tiene sus limitaciones puesto que se trata de un sistema *in vitro* (algunas interacciones solo se producen en un ambiente celular determinado), y solo permite analizar la interacción directa entre dos proteínas (los componentes del complejo proteico que no interaccionan directamente entre sí no se detectarían con este sistema). La técnica de *pull-down* se basa en analizar la unión de proteínas marcadas radiactivamente a la proteína bajo estudio, en nuestro caso AtCPK1, la cual se encuentra anclada a una matriz. En estos ensayos se emplearon: 1) la proteína de fusión GST-N-termAtCPK1, utilizada para la producción de anticuerpos; 2) la proteína AtCPK1-GST-His; y 3) la proteína GST como control. Cada una de estas proteínas se unió de forma covalente a una matriz de sefarosa-4B, que previamente se había equilibrado en el tampón de unión suplementado con CaCl₂ (1.1mM CaCl₂). Las proteínas seleccionadas para realizar el ensayo de *pull-down* fueron la Zm14-3-3 y la APX3 (identificadas mediante las estrategias de captura y cromatografía de inmunoafinidad), la ATPasa subunidades alfa y beta (identificadas en los ensayos de cromatografía de inmunoafinidad y con el sistema TAP), las catalasas 2 y 3, y las nitrilasas 1, 2 y 3 (identificadas mediante el sistema TAP).

Para el marcaje de estas proteínas se utilizó el sistema de transcripción-traducción *in vitro* en reticulocitos de conejo (kit comercial *TnT^R coupled reticulocyte lysate system*, Promega) en presencia de metionina marcada con ³⁵S. La síntesis se realizó a partir de vectores derivados de pCRII (Invitrogen) que contienen las secuencias codificantes de estas proteínas bajo el control del promotor T7 de la RNA polimerasa. Para ello, las secuencias codificantes de estas proteínas se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos detallados en materiales y métodos (Tabla M1), a partir del cDNA generado por retrotranscripción *in vitro* de RNA total extraído de plántulas de Arabidopsis. Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) y se verificaron las secuencias.

Las proteínas marcadas radiactivamente se incubaron con las proteínas de fusión GST-N-termAtCPK1, AtCPK1-GST o la proteína GST, previamente acopladas a la matriz de sefarosa. Aquellas proteínas que interaccionan directamente con las proteínas de fusión quedan retenidas en la columna. Tras su elución, estas proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE. Los resultados obtenidos con estos ensayos de *pull-down* se presentan en la **Figura**

R30. En ella, se muestra únicamente los resultados de los ensayos en los que se detectó interacción: proteína 14-3-3, APX3, ATPasa subunidad alfa, nitrilasa 2 y nitrilasa 3. En los ensayos realizados con la ATPasa subunidad beta, las catalasas 2 y 3, y la nitrilasa 1 no se detectó interacción, lo cual pudiera ser debido a que estas cuatro proteínas pudieran formar parte del complejo proteico pero no interaccionar directamente con AtCPK1.

La interacción observada entre AtCPK1-GST y GST-N-termAtCPK1 con las proteínas Zm14-3-3, APX3, ATPasa subunidad alfa, nitrilasa 2 y nitrilasa 3 es específica de AtCPK1, puesto que en ningún caso se observa interacción con la proteína GST (**Figura R30 A-E**). Las proteínas 14-3-3, APX3 y la ATPasa subunidad alfa interaccionan tanto con la proteína AtCPK1 completa (AtCPK1-GST) como con el dominio N-terminal AtCPK1 (GST-N-termAtCPK1) (**Figura R30 A-C**). En el caso de las nitrilasas (nitrilasa 2 y nitrilasa 3) esta interacción solo se detecta con la proteína AtCPK1 completa y no con el dominio N-terminal de AtCPK1 (**Figura R30 D-E**).

Los ensayos de pull-down demuestran la interacción directa de la proteína AtCPK1 con las proteínas 14-3-3, APX3, la subunidad alfa de la ATPasa y las nitrilasas 2 y 3.

En la tabla RIV se muestra un resumen de las proteínas identificadas que interaccionan con AtCPK1 o forman parte de complejos proteicos junto a AtCPK1 a través de las diferentes aproximaciones seguidas en este trabajo.

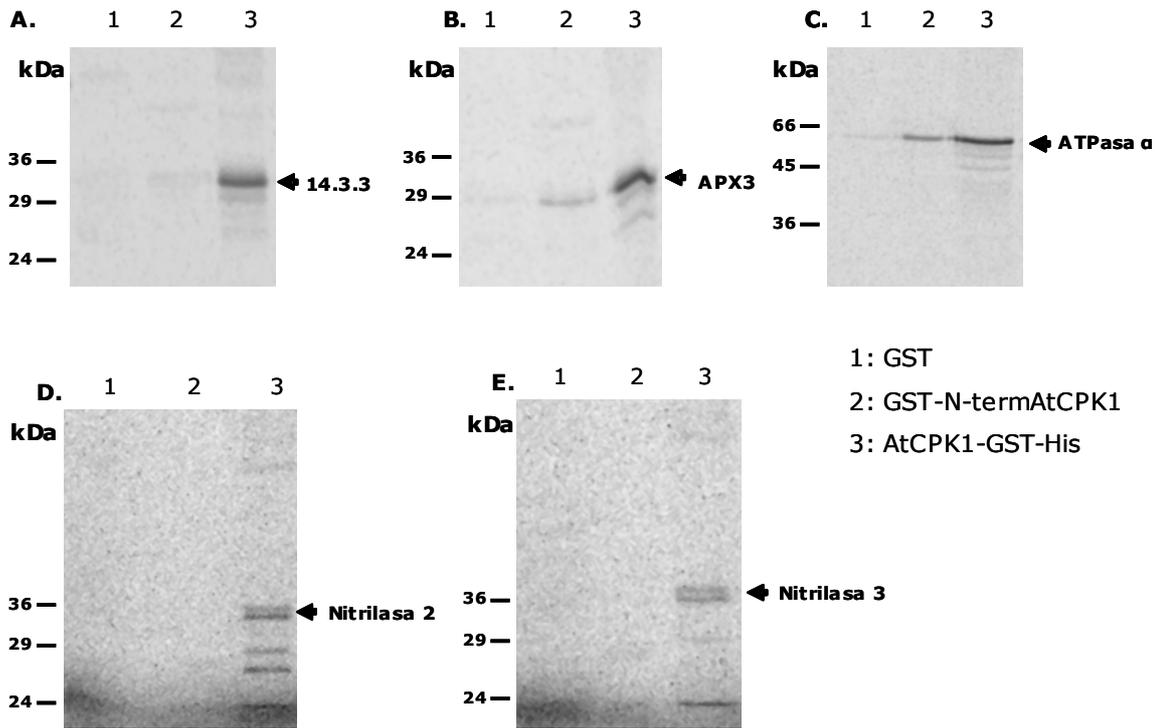


Figura R30. Interacción de la proteína AtCPK1 con las proteínas 14-3-3 (A), APX3 (B), ATPasa alpha (C), Nitrilasa 2 (D) y Nitrilasa 3 (E) mediante ensayos de pull-down. Las proteínas (5µg) GST (1), GST-N-termAtCPK1(2) y AtCPK1-GST-His (3) covalentemente unidas a la matriz de sefarosa-4B se incubaron con las proteínas indicadas que habían sido previamente marcadas con ³⁵S. Las proteínas retenidas en la matriz por su interacción con las proteínas de fusión se eluyeron y se separaron en electroforesis SDS-PAGE. Las imágenes mostradas fueron obtenidas con el *PhosphoImager* (Amersham). Se indican los marcadores de peso molecular a la izquierda de las imágenes en KDa. Las flechas a la derecha de las imágenes señalan las proteínas retenidas por su interacción con AtCPK1.

Tabla RIV: Proteínas identificadas que interaccionan con AtCPK1 o forman parte de los complejos proteicos en los que participa AtCPK1. Se indican solo aquellas proteínas identificadas por más de una de la metodologías utilizadas en este trabajo.

Proteína	Cromatografía de afinidad a la proteína fusión GST-AtCPK1	Cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo anti-AtCPK1	Sistema TAP	Ensayos pull-down
14.3.3	X	X		X
APX3	X	X		X
Catalasa 3		X	X	
LHCP AB 180 (Proteína de unión a clorofilas a/b)		X	X	
Nitrilasa 2			X	X
Nitrilasa 3			X	X
Subunidad alfa H ⁺ ATPasa tipo F		X	X	X

5. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA AtCPK1.

Uno de los aspectos determinantes de la función biológica de una proteína es su localización subcelular. En el caso de familias multigénicas como las CPKs, se postula que las distintas isoformas están especializadas funcionalmente, y muestran una regulación de su expresión en respuesta a diversos estímulos, que pueden ser además dependiente de tejido y/o estado de desarrollo. Además se han descrito diversas localizaciones subcelulares para distintas CPKs lo cual estaría directamente relacionado con la función que desempeña cada una de estas proteínas. Por este motivo, se decidió abordar el estudio la localización subcelular de AtCPK1. Para ello, se tuvo en cuenta que los resultados obtenidos en este trabajo, mediante ensayos de cromatografía de inmunoafinidad y purificación de complejos con el sistema TAP mostraron la asociación preferencial de AtCPK1 con proteínas del cloroplasto sugiriendo una posible localización cloroplástica de AtCPK1. Así pues, se realizaron experimentos dirigidos a determinar si la proteína AtCPK1 se encuentra asociada a este orgánulo. Se llevó a cabo una purificación de cloroplastos intactos a partir de homogenizados de plántulas de Arabidopsis seguidos de la inmunodetección de la proteína AtCPK1 en los extractos proteicos derivados de estos cloroplastos. Los cloroplastos se purificaron tanto de plántulas de Arabidopsis controles no infectadas, como de plántulas infectadas con el hongo *F. oxysporum* (24h). Los cloroplastos obtenidos, se visualizaron por microscopia de fluorescencia para comprobar la pureza de la preparación (las clorofilas presentes en los cloroplastos emiten a 622-700 nm). En la **Figura R31** se muestran las imágenes obtenidas a partir de los cloroplastos purificados de plántulas control y de plántulas infectadas (microscopia de transmisión y de fluorescencia). El 100% de los orgánulos mostraban fluorescencia confirmando la pureza de la preparación.

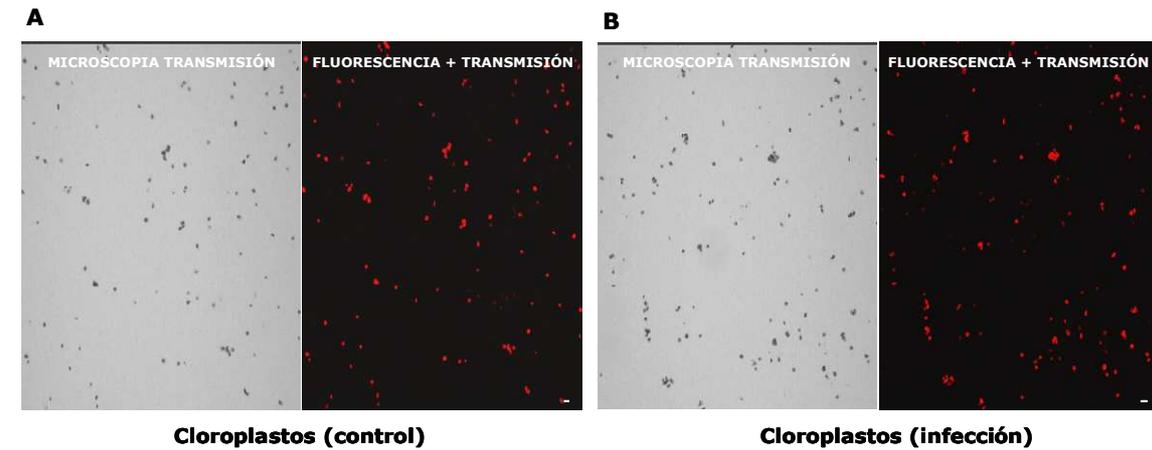


Figura R31. Imágenes de microscopia de preparaciones de cloroplastos obtenidos a partir de plántulas de Arabidopsis control (A) o infectadas con *F. oxysporum* (B). Imágenes de microscopia de transmisión (paneles izquierdos) y el solapamiento con la imagen de autofluorescencia (622-700 nm) (paneles derechos). Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

Una vez comprobada la pureza de las preparaciones, se realizó una extracción de proteínas cloroplásticas e inmunodetección de AtCPK1. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura R32**, donde se puede observar un enriquecimiento de proteína AtCPK1 en los extractos cloroplásticos frente a los extractos totales. Ello sugiere que efectivamente la proteína AtCPK1 se encuentra asociada a los cloroplastos en células de Arabidopsis, tanto en plantas control como plantas infectadas con el hongo *F. oxysporum*. Se aprecia un ligero aumento en los niveles de acumulación de la proteína AtCPK1 en cloroplastos provenientes de plantas infectadas respecto a las plantas control sin infectar.

*Los resultados obtenidos por inmunodetección de AtCPK1 en extractos proteicos provenientes de cloroplastos purificados muestran que la proteína AtCPK1 se encuentra asociada a los cloroplastos en plántulas de Arabidopsis en condiciones control y en respuesta a infección por *F. oxysporum*. Por tanto, estos resultados apoyan los anteriormente obtenidos mediante cromatografía de inmunoafinidad y purificación de complejos proteicos con el sistema TAP, que indicaban que AtCPK1 se asocia a proteínas cloroplásticas.*

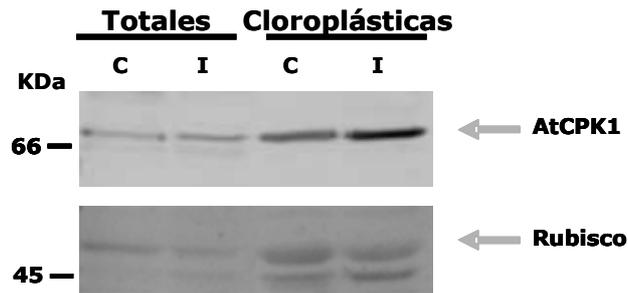


Figura R32. Inmunodetección de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos derivados de cloroplastos. Los extractos de proteínas totales (50 μ g) o de cloroplastos (50 μ g) purificados de plántulas de *Arabidopsis* control (C) o infectadas con *F oxysporum* durante 24h (I) se separaron en geles SDS-PAGE (7.5%) y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La proteína AtCPK1 (indicada con una flecha) se inmunodetectó con el suero anti-AtCPK1 (dilución 1/1000) y revelado quimioluminiscente. La imagen inferior muestra la tinción de proteínas con rojo Ponceau como control de carga.



Resultados

Discusión



DISCUSIÓN

La célula vegetal en situación de infección por un patógeno activa una compleja red de vías de transducción de señales y una reprogramación transcripcional que conduce a cambios estructurales y bioquímicos para evitar que el patógeno penetre e invada la planta. En plantas, el calcio es un mensajero secundario implicado en la propagación y amplificación de multitud de señales en procesos del desarrollo normal de la planta y en la respuesta a estímulos ambientales. Los cambios que se observan en los niveles de calcio intracelular son dependientes de estímulo de tal manera que la duración e intensidad y el compartimento subcelular en el que se producen dichas alteraciones contienen la información necesaria para que se produzca la respuesta más apropiada a cada tipo de estímulo. Mientras que es bien conocida la relación que existe entre los cambios de concentración de calcio (citoplásmico, y en organelos celulares como vacuolas o retículo endoplasmático), se conoce muy poco sobre los mecanismos que decodifican dichos cambios y que desencadenan las respuestas posteriores. En el caso de la respuesta inmune de las plantas, la información disponible sobre estos aspectos es todavía más limitada. Por otra parte, la fosforilación/defosforilación de proteínas es también uno de los mecanismos más ampliamente utilizados en eucariotas para la percepción y transducción de señales en numerosos procesos fisiológicos. En el caso concreto de la respuesta inmune de las plantas, ya hace tiempo se describió la implicación de procesos de fosforilación/defosforilación de proteínas que eran dependientes de calcio (Blume *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2000), si bien la naturaleza de dichos procesos todavía está por determinar.

En plantas existen tres importantes grupos de proteínas sensoras de calcio: las calmodulinas o proteínas relacionadas (CaM), las proteínas similares a la calcineurina-B (CBL) y las CPKs (DeFalco *et al.*, 2010; Dodd *et al.*, 2010; Kudla *et al.*, 2010). Las proteínas CPKs son a la vez sensores de los niveles de calcio y transductores de estos cambios en procesos de fosforilación de proteínas por lo que constituyen candidatos idóneos para mediar la transducción de señales en procesos fisiológicos y en respuesta a estímulos ambientales.

Las proteínas CPKs son miembros de familias multigénicas que presentan una diversificación funcional muy importante, de manera que las distintas isoformas pueden estar implicadas en diferentes procesos de transducción de señales dependientes de alteraciones en los niveles de calcio. Estudios previos en el grupo de investigación habían implicado funcionalmente al gen *AtCPK1* en la respuesta de defensa de la planta de *Arabidopsis* frente al hongo patógeno *F. oxysporum* (Coca y

San Segundo, 2010). Resultaba por tanto de interés profundizar en el conocimiento de la función de AtCPK1 como componente de la ruta de transducción de la señal de defensa en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en su interacción con el hongo patógeno *F. oxysporum*.

Activación transcripcional del gen AtCPK1 en respuesta a la infección fúngica

En primer lugar, se determinó el patrón de expresión del gen *AtCPK1* en respuesta a la infección por el hongo *F. oxysporum*, o al tratamiento con elicitores derivados del mismo, encontrándose una activación transcripcional de *AtCPK1* en plántulas de *Arabidopsis*. Estos resultados fueron obtenidos mediante ensayos de hibridación de RNA (*Northern blot*), y confirmados mediante ensayos funcionales del promotor *AtCPK1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. A su vez, los ensayos de actividad GUS en plantas transgénicas mostraron una expresión basal del gen *AtCPK1*, principalmente asociada a los haces vasculares de las raíces de las plantas de *Arabidopsis* (**Figura R7**). De acuerdo con estos resultados, la información disponible en la base de datos Genevestigator sobre la expresión del gen *AtCPK1* (At5g04870), obtenidos a partir de la compilación de análisis de expresión global por hibridación de micromatrices, indica una mayor expresión de *AtCPK1* en raíz que en los otros tejidos de la planta (**Figura D1**).

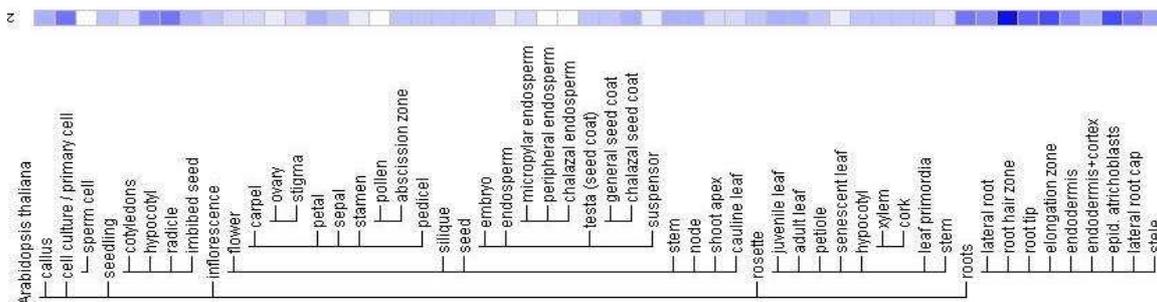


Figura D1. Visualización de la expresión del gen *AtCPK1* (At5g04870) en los distintos tejidos de la planta *Arabidopsis*. Gráfica obtenida utilizando la herramienta de análisis (*Meta-Profile Analysis*) disponible en la base de datos Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>), donde se compilan los datos de expresión global por hibridación de micromatrices. Los valores de expresión se representan con una gradación de color de blanco a azul, correspondiendo el azul oscuro a los valores más altos de expresión del gen *AtCPK1* (sonda 246955_at).

La activación transcripcional del gen *AtCPK1* es muy rápida, pero transitoria. Así, el nivel de acumulación de transcritos *AtCPK1* se encuentra aumentado ya a los 5 minutos del tratamiento con elicitores fúngicos, o a las 3h tras el rociado con esporas del hongo *F. oxysporum*. En este último caso, la respuesta en la planta se produce en un tiempo anterior a la penetración del hongo en los tejidos de la planta como consecuencia del reconocimiento molecular del patógeno por la célula vegetal (como lo demuestra el hecho de que su expresión sea inducida por elicitores fúngicos). La rápida respuesta al tratamiento con elicitores fúngicos (en relación a la infección con esporas) se justifica por las características intrínsecas del estímulo inductor: mientras que los elicitores entran en contacto rápidamente con las células vegetales, los conidios del hongo requieren un tiempo para germinar e iniciar el proceso de infección. Además la concentración de moléculas "elicitoras" es superior en el caso del tratamiento con elicitores con respecto a la que se puede encontrar en los estadios iniciales de la infección con esporas del hongo. Las características del estímulo también justifican la distribución más generalizada que se observa en los tejidos y órganos de las plantas que expresan el gen reportero *GUS* bajo control del promotor *AtCPK1* cuando se someten a tratamiento con elicitores fúngicos respecto a las plantas infectadas con esporas de *F. oxysporum* (en las cuales se detectó principalmente asociada a los haces vasculares de las raíces).

Una activación transcripcional rápida del gen *AtCPK1* apunta a que probablemente desempeña un papel en las respuestas tempranas de defensa de la planta. La detección temprana de la presencia del agente agresor y la activación rápida de los mecanismos de defensa son los factores determinantes de la resistencia de la planta ante la agresión. A priori, una activación transcripcional rápida de *AtCPK1*, aunque no sea muy intensa, podría ser suficiente para la puesta en marcha de una cascada de señalización mediada por procesos de fosforilación/defosforilación de proteínas, siendo *AtCPK1* un componente de dicha cascada de señalización. También se ha descrito la inducción transcripcional rápida del gen *NtCDPK2* y *NtCDPK3* de tabaco durante la respuesta específica de huésped, tras la detección del efector producto del gen de avirulencia *Avr9* (Romeis *et al.*, 2001). Nuestro grupo de investigación ha descrito la inducción transcripcional rápida y transitoria del gen *ZmCPK10* en embriones de maíz en respuesta a infección por hongos o al tratamiento con elicitores fúngicos (Murillo *et al.*, 2001). En el caso de las MAP quinasas también se ha descrito una activación rápida pero transitoria en respuesta a estrés (Zhang y Klessig, 1998). Además de una rápida activación transcripcional, el recambio de las proteínas implicadas mediante degradación controlada es también una estrategia bastante generalizada en los procesos de transducción de

señales en plantas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, efectivamente, la acumulación de la proteína AtCPK1 se encuentra regulada por el proteasoma.

Por otra parte, la activación transcripcional del gen *AtCPK1* en respuesta a la infección por el hongo *F. oxysporum* que establece una interacción con la planta huésped de tipo compatible sugiere la participación de *AtCPK1* en la defensa basal, o inmunidad dependiente de PAMPs (PTI, *PAMP-triggered immunity*). En cambio, el gen *NtCPK2* (gen ortólogo de *AtCPK1* en tabaco) se ha implicado en los procesos de inmunidad dependiente de efectores (ETI, *Effector-triggered immunity*) (Romeis *et al.*, 2001). Muchos de los procesos defensivos están conservados entre los dos sistemas inmunitarios, con las principales diferencias a nivel de percepción del patógeno. Sería interesante ahora determinar si *AtCPK1*, además de participar en la respuesta a PAMPs participa también en la respuesta inmune activada por el reconocimiento de efectores microbianos.

En este trabajo se ha analizado el efecto en la expresión de *AtCPK1* de diferentes hormonas para las cuales se ha descrito una función señalizadora en la defensa de la planta. Si bien, el SA, ET y JA son las hormonas tradicionalmente asociadas a la defensa, más recientemente se ha demostrado que auxinas y el ABA también modulan estas respuestas (revisado en Bari y Jones, 2009). Se observa que el tratamiento con las diferentes hormonas promueve un ligero aumento en la acumulación de los mensajeros *AtCPK1*, con una respuesta que es detectable entre los 30-60 minutos de tratamiento, pero que no se mantiene a lo largo del tiempo (**Figura R3**). Además, los ensayos realizados en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen reportero *GUS* bajo control del promotor *AtCPK1* confirman que este promotor responde al tratamiento con las hormonas ensayadas, siendo más acusada la respuesta a auxinas (**Figura R9**). Sin embargo, el efecto de las hormonas en la expresión del gen *AtCPK1*, al menos en las condiciones analizadas, es muy ligero. Esta observación sugiere que estas hormonas no son los principales reguladores de la expresión del gen *AtCPK1*, y que su efecto regulador de la expresión de *AtCPK1* puede ser secundario, consecuencia de algún mecanismo de amplificación de la señal o de retroalimentación positiva. Apoyando esta idea se observa un desfase temporal en la activación del gen *AtCPK1* por elicitores (máxima a 30 min) y por las hormonas (máxima a 60 min). Así pues, aunque en la literatura hay múltiples ejemplos de regulación de la expresión de genes *CPKs* por hormonas (revisado en Klimecka y Muszynska, 2007), en el caso de *AtCPK1* las hormonas moduladoras de la respuesta de defensa no parecen ser los principales determinantes de la regulación de su expresión.

En relación al análisis funcional del promotor *AtCPK1* realizado en este trabajo en plantas transgénicas, estos estudios indican que el fragmento de DNA comprendido entre las posiciones -1732 a +461, que incluye la región del promotor y la secuencia 5' no traducida del cDNA del gen *AtCPK1*, es funcional y es capaz de dirigir la expresión del gen reportero *GUS* tanto en respuesta a infección como a las hormonas vegetales analizadas. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ensayos de tipo *Northern blot* que muestran una mayor acumulación de transcritos *AtCPK1* en respuesta a los mismos agentes inductores. Por otra parte, el análisis *in silico* de la secuencia promotora del gen *AtCPK1* ha identificado múltiples elementos *in cis* para los cuales se ha demostrado una función reguladora de la expresión en diferentes genes vegetales en respuesta a estrés tanto biótico como abiótico y a hormonas. Uno de los elementos más representados en el promotor de *AtCPK1* es la caja W (*W-box*) con la secuencia consenso (T)TGAC(C/T) encontrándose hasta 6 cajas W en la secuencia de DNA analizada. La función reguladora de la caja W de genes de defensa está ampliamente descrita en la literatura, y se sabe que esta secuencia es reconocida por factores de transcripción tipo WRKY (Eulgem y Somssich, 2007). La presencia de varias cajas W en el promotor del gen *AtCPK1* abre la posibilidad de realizar nuevos estudios para determinar si estos elementos son reguladores de la expresión del gen *AtCPK1* y si son reconocidos por factores de transcripción tipo WRKY.

En la región promotora del gen *AtCPK1* se encuentran también elementos de respuesta a hormonas, SA, JA, ET, ABA y auxinas. Curiosamente, el elemento de respuesta a ET encontrado en el promotor *AtCPK1* es la caja GCC (AGCCGCC). Este elemento está presente en los promotores de genes de defensa inducibles por ET, pero no en otros genes regulados por ET implicados en otros procesos, tales como la maduración del fruto o la senescencia (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). En relación a la regulación por JA, se ha identificado un elemento de respuesta a JA (CACATG) que es el sitio de unión del factor de transcripción AtMYC2, el cual regula la expresión de genes inducibles por JA implicados en la defensa frente a patógenos y a herida (Lorenzo *et al.*, 2004). Finalmente, el elemento de respuesta a SA identificado en el promotor *AtCPK1* (TGACG) es el sitio de unión de factores del tipo TGA que regulan la expresión de muchos genes de defensa (Gruner *et al.*, 2003).

En el promotor *AtCPK1* se encuentran también el motivo ABRE (*ABA Responsive Element*) y su elemento acoplador CE (*Coupling Element*), elementos reguladores de genes inducibles por ABA. Resulta particularmente interesante la observación derivada del análisis de las secuencias promotoras de un grupo de 162 genes

inducibles por calcio, que revela una frecuencia importante en la presencia de estos dos elementos, ABRE y CE, en dichos genes (Kaplan *et al.*, 2006). En este trabajo los autores también demuestran que estos elementos funcionan como elementos de respuesta a calcio. Por tanto, la presencia de estos elementos en el promotor *AtCPK1* sugiere que, además del ABA, el calcio podría también ser un factor regulador de la expresión de *AtCPK1*. Además de los motivos ABRE y CE se han identificado otros dos elementos más de respuesta a calcio (AACGCGT), reconocidos por factores de transcripción tipo CAMTA (*CAModulin Transcription Activators*). Estos factores de transcripción poseen una estructura conservada evolutivamente en los organismos pluricelulares formada por varios dominios funcionales: un dominio de unión a DNA, un dominio de unión a calmodulina y un dominio de interacción proteína-proteína (Galon *et al.*, 2010). Estos factores de transcripción son activados por cambios en los niveles de calcio y median la respuesta a estímulos externos y a hormonas. Uno de los descritos recientemente, el factor AtSR1 o CAMTA3, regula la respuesta inmune mediada por SA en plantas de *Arabidopsis* (Du *et al.*, 2009). Los elementos de activación por calcio encontrados en el promotor *AtCPK1* además están presentes en muchos genes de respuesta rápida a calcio, que incluyen genes implicados en señalización y de respuesta temprana a estrés, tales como la MAP quinasa 3 (AtMPK3) o la fosfatasa 2C (PPTC) (Galon *et al.*, 2010). Resulta por tanto muy interesante poder abordar ahora nuevos estudios para determinar si la presencia de calcio es capaz de inducir la transcripción del gen *AtCPK1* en *Arabidopsis*.

Finalmente, comentar la presencia de numerosos motivos reguladores por luz en el promotor *AtCPK1*, sugiriendo que su expresión pueda estar regulada por la luz. Esto resulta interesante puesto que hemos detectado la expresión basal de *AtCPK1* principalmente asociada a las raíces de las plantas, el órgano de la planta no expuesto a la luz. Experimentos preliminares no incluidos en esta memoria en plantas transgénicas portadoras de la fusión transcripcional del promotor *AtCPK1:GFP-GUS* sugieren que en oscuridad se detecta una fuerte actividad GUS. Existe pues la posibilidad de que la expresión del gen *AtCPK1* sea dependiente de las condiciones de luz, y que los elementos de respuesta a luz encontrados en el promotor *AtCPK1* sean funcionales.

En definitiva, el fragmento de DNA de la región promotora del gen *AtCPK1* contiene un número importante de elementos reguladores de la transcripción. No obstante, se hace necesario realizar estudios funcionales con mutaciones dirigidas para los diferentes elementos identificados en el promotor para determinar si efectivamente desempeñan un papel regulador de la expresión del gen *AtCPK1*.

Modificaciones postraduccionales y estabilidad de la proteína AtCPK1

AtCPK1 ha sido la proteína CPK mejor caracterizada desde el punto de vista bioquímico y enzimático. Su mecanismo de activación mediado por la unión de calcio a la cadena polipeptídica AtCPK1 fue descrito hace bastantes años (Harper *et al.*, 1993). Dichos estudios fueron realizados *in vitro* con la proteína AtCPK1 producida en *E. coli* usando como sustrato de fosforilación la histona III, que además de mostrar la actividad quinasa dependiente de calcio demostraron que esta actividad era estimulada por lípidos de membrana (Harper *et al.*, 1993). Sin embargo hasta la fecha, no se han descrito estudios *in vivo* de actividad CPK. La dificultad para realizar estudios bioquímicos y de actividad de proteínas CPKs *in vivo* puede atribuirse a varias causas, como son el hecho de que se trata de familias multigénicas muy complejas, con un alto grado de conservación entre los distintos miembros, y de que no se conocen los sustratos para la mayoría de los miembros de esta familia de quinasas (Hegeman *et al.*, 2006). Existen algunos estudios que describen cambios en la actividad quinasa dependiente de calcio utilizando sustratos generales de fosforilación, tipo la proteína básica de mielina (MBP) o la histona III, en extractos proteicos purificados de plantas en respuesta a estrés osmótico (Takahashi *et al.*, 1997), frío (Martin y Busconi, 2001), embriogénesis (Anil y Rao, 2000), hormonas (Abo-el-Saad y Wu, 1995), herida (Chico *et al.*, 2002) o efectores específicos de patovar (Romeis *et al.*, 2000), aunque se desconoce la CPK concreta implicada en esas respuestas.

El desconocimiento actual sobre las características bioquímicas y actividad de CPKs, o de los sustratos sobre los que actúan, contrasta con la gran información que se dispone sobre genes *CPKs* en diferentes especies vegetales cuya expresión se induce transcripcionalmente en respuesta a estrés, al tratamiento con hormonas o durante determinados estadios de desarrollo. Los únicos estudios encontrados en la literatura que permiten correlacionar la activación de la expresión de un gen *CPK* concreto con una función biológica se han realizado mediante aproximaciones de ganancia y pérdida de función en plantas transgénicas, ya sean estables o transitorias. En nuestro grupo de investigación, se ha comprobado que la sobreexpresión de *AtCPK1* confiere protección de amplio espectro frente a patógenos en la planta de *Arabidopsis* mientras que la pérdida de función de *AtCPK1* resulta en una mayor susceptibilidad a los mismos patógenos (Coca y San Segundo, 2010). Por tanto, la inducción transcripcional del gen *AtCPK1* se ha podido correlacionar con una función de este gen en la respuesta de defensa de la planta de *Arabidopsis* como un regulador positivo de la defensa basal de la planta. No obstante, la aproximación de ganancia de función podría tener efectos

pleiotrópicos debido a la expresión ectópica de la proteína, mientras que la pérdida de función podría resultar en compensación génica o adaptación, por lo que el fenotipo observado pudiera no ser causa directa de la alteración de la expresión de *AtCPK1*. Por ello, en este trabajo se han llevado a cabo estudios para determinar los posibles mecanismos por los cuales podría estar regulada la actividad de la proteína *AtCPK1* en relación a la defensa de la planta, tales como el estado de fosforilación de la proteína, capacidad de interacción con otras proteínas y el efecto del calcio en dichas interacciones, o la estabilidad de *AtCPK1* en los tejidos de la planta.

Los ensayos de fosforilación-defosforilación realizados en este trabajo con extractos proteicos de *Arabidopsis* indican que **la proteína *AtCPK1* se fosforila en respuesta a la infección fúngica**. La mayoría de las proteínas CPK, incluida *AtCPK1*, se autofosforilan *in vitro* de manera dependiente de Ca^{+2} , aunque su importancia en la función *in vivo* se desconoce (Hegeman *et al.*, 2006). El único estudio encontrado en la literatura sobre fosforegulación de proteínas CPKs *in vivo* se ha realizado en tabaco con las proteínas *NtCPK2* y *NtCPK3*, ortólogas de *AtCPK1*, implicadas en la respuesta específica de huésped mediada por efectores, así como también en la respuesta a estrés hipo-osmótico (Romeis *et al.*, 2001 ; Witte *et al.*, 2010). Estos resultados se obtuvieron mediante ensayos de expresión transitoria en hoja en los que se producían proteínas marcadas con epítopos y en ellos se demuestra que estas proteínas CPKs de tabaco se fosforilan *in vivo* en respuesta al estímulo (Romeis *et al.*, 2001). La actividad de las proteínas *NtCPK2* y *NtCPK3* de tabaco es dependiente no solo de autofosforilación sino también de fosforilación por otras proteínas quinasas pendientes de identificación. Además, se muestra que mutaciones en aminoácidos fosforilables de *NtCPK2* y *NtCPK3* alteran las respuestas fisiológicas mediadas por estas proteínas, si bien su actividad *in vitro* frente al sustrato de fosforilación *synthide 2* no se ve afectada (Witte *et al.*, 2010). De acuerdo con ello, se había propuesto que la fosforilación de las proteínas CPKs cumple otras funciones reguladoras independientes de la activación quinasa *per se* a diferencia de otras proteínas quinasas. La fosforilación en otras proteínas quinasas, como la proteína quinasa A, ocurre en el lazo de activación del dominio quinasa, y resulta en la fosfoactivación; mientras que las CPKs poseen un aminoácido ácido (D-310 en *AtCPK1*) en esta posición que mimetiza el estado fosfoactivado (Harper *et al.*, 2004). En el caso de *AtCPK1*, la mayoría de los sitios potencialmente fosforilables se localizan en el dominio N-terminal variable de su cadena polipeptídica (Fig. R13), al igual que se ha descrito para las ortólogas de tabaco (Witte *et al.*, 2010). Dado que se trata de un dominio muy variable entre las

diferentes isoformas de CPKs se ha propuesto que la región N-terminal es el determinante de la especificidad de acción de las CPKs, probablemente a través de su interacción con otras proteínas, o de su localización subcelular. Por ello, podría pensarse que la fosforilación/autofosforilación de AtCPK1 durante la respuesta de defensa, básicamente en su dominio N-terminal, da lugar a cambios conformacionales que alteran su afinidad por las proteínas con las que interacciona, potenciales dianas de fosforilación, y así regular la función biológica de AtCPK1. Apoyando esta hipótesis, el análisis de los complejos proteicos de los que forma parte AtCPK1 purificados mediante inmunoafinidad muestra diferencias cualitativas y cuantitativas importantes entre plantas infectadas y las plantas control sin infectar (**Figura R16** y **R23**). Para comprobar esta hipótesis son necesarios experimentos adicionales.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo en el estudio del interactoma de AtCPK1 muestran la relación que existe entre la estructura de AtCPK1 y su capacidad de interactuar con otras proteínas lo cual es dependiente de la concentración de iones calcio, siendo el calcio el principal regulador de la actividad de las CPKs. La unión de iones calcio al dominio calmodulina de las proteínas CPKs desplaza al dominio autorregulador, dejando libre y disponible el dominio quinasa para ejercer su actividad (Harper y Harmon, 2005). Los resultados aquí mostrados sugieren que el calcio, además de regular la actividad del enzima, puede también regular la capacidad de interacción de esta quinasa con otras proteínas. Así, en presencia de calcio a una concentración de $1\mu\text{M}$ se observa un perfil de proteínas que pudieran ser componentes del interactoma de AtCPK1 mucho más complejo que el que se encuentra cuando no se ha suplementado la muestra con calcio y que es más similar al observado en muestras provenientes de plantas infectadas (**Figura R16**). Así pues, la unión de calcio a AtCPK1 podría no solo modificar su actividad, sino también su capacidad para interactuar con otras proteínas mimetizando la situación que se produce en condiciones de infección por hongos. Es posible que la unión de calcio, que libera al dominio quinasa, permita la autofosforilación de la proteína AtCPK1, lo que resulta en un cambio de afinidad por otras proteínas, al igual que se observa durante la respuesta de defensa cuando AtCPK1 es fosforilada. Aunque se desconoce si AtCPK1 es autofosforilada o fosforilada por otra quinasa durante la respuesta de defensa.

En definitiva, los resultados mostrados en este trabajo indican que la proteína AtCPK1 de *Arabidopsis* se fosforila en respuesta a la infección por el hongo *F. oxysporum*, mientras que la presencia de calcio afecta a su capacidad de interactuar con otras proteínas. Será interesante ahora realizar estudios para

determinar si se trata de procesos de autofosforilación o de fosforilación por otras proteínas quinasa, y conocer si dicha(s) fosforilaciones se encuentran en el dominio N-terminal de la proteína. Asimismo, será interesante conocer en que manera los cambios en el estado de fosforilación de AtCPK1, pudieran afectar a la interacción de AtCPK1 con otras proteínas componentes de la respuesta de defensa de la planta.

Por otra parte, en el presente trabajo se han obtenido evidencias que indican que **los niveles de acumulación de la proteína AtCPK1 se encuentran regulados por el proteasoma 26S**. Inicialmente, los experimentos de inmunodetección de AtCPK1 en extractos proteicos de plántulas estériles e infectadas demostraron que la activación transcripcional observada para el gen *AtCPK1* (**Figura R1**) se acompaña de una mayor acumulación de la proteína AtCPK1 (**Figura R12**). Al igual que sucede a nivel de los transcritos *AtCPK1*, el tratamiento con elicitores fúngicos (**Figura R2**) resulta en una acumulación mucho más rápida de la proteína AtCPK1 que en el caso de la infección con esporas del hongo (**Figura R12**). Supuestamente esta mayor acumulación de AtCPK1 podría traducirse en una mayor actividad de esta quinasa, aunque no puede hacerse tal afirmación en ausencia de datos sobre la actividad quinasa de AtCPK1. Este análisis también revela que la proteína AtCPK1 no se acumula progresivamente con el tiempo a pesar de que el agente inductor se mantiene y de que el gen se encuentra activado transcripcionalmente, un aspecto que es más evidente en el análisis de plantas tratadas con elicitores (**Figura R12**). Estas observaciones hacen pensar que el aumento que se observa de mensajeros *AtCPK1* sería necesario para mantener mediante síntesis de *novo* los niveles de acumulación de la proteína AtCPK1 que podría ser altamente inestable cuando se encuentra activada (condiciones de infección). Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados obtenidos en los experimentos para determinar la posible degradación de AtCPK1 por el proteasoma (**Figuras R15**). Una situación similar se ha descrito para otra proteína CPK, la proteína OsCPK7, para la que se detectan niveles constantes de acumulación en condiciones de frío, mientras que los transcritos correspondientes se acumulan en respuesta al tratamiento con frío (Saijo *et al.*, 2000).

Así, el ensayo realizado para determinar la estabilidad de la proteína AtCPK1 en extractos proteicos en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132 indican que la proteína es inestable y que su degradación es dependiente del proteasoma (**Figura R15**). Además, se aprecia que la proteína AtCPK1 es ligeramente más inestable en los extractos provenientes de plántulas infectadas

que en extractos de plantas control (a tiempo cero los niveles de acumulación de AtCPK1 son más elevados en la muestra infectada que en la control sin infectar, mientras que a tiempos posteriores los niveles de acumulación de AtCPK1 se igualan o incluso son inferiores en la muestra infectada). Sin embargo, las diferencias no son muy importantes y por tanto, no se puede afirmar que la proteína AtCPK1 sea más inestable en condiciones de infección respecto a las condiciones control.

El control de procesos a través de la estabilidad/degradación de proteínas implicadas es un mecanismo regulador bastante frecuente en plantas (Smalle y Vierstra, 2004). En la proteína AtCPK1 y en muchas CPKs se encuentran motivos peptídicos PEST, característico de proteínas de vida media corta que son diana de reconocimiento de la subunidad 26S del proteasoma para su degradación proteolítica. Ello sugiere que la estabilidad de las proteínas es otro punto bastante generalizado de regulación de la señalización por CPK. De hecho, en la literatura se ha descrito la interacción directa *in vitro* e *in vivo* entre las proteínas NtCDPK1 y Rpn3 (una subunidad reguladora del proteasoma 26S), requerida para el control de la división celular, diferenciación y muerte celular en tabaco (Lee *et al.*, 2006).

La degradación por el proteasoma también se ha relacionado con el estado de fosforilación/autofosforilación de proteínas. En la literatura se ha descrito que determinadas proteínas que son activadas por fosforilación, p.e. CKB4, son inestables (Perales *et al.*, 2006). De hecho, la fosforilación del residuo Ser en el motivo PEST marca a las proteínas para ser ubiquitinadas y degradadas vía proteasoma, así muchas proteínas activadas por fosforilación inmediatamente son reconocidas por el túnel de degradación (Smalle y Vierstra, 2004). En el dominio N-terminal de AtCPK1 se ha localizado un motivo PEST de probabilidad alta, con dos residuos de serina potencialmente fosforilables (**Figura R13**). Así pues, los resultados aquí obtenidos en el estudio de la proteína AtCPK1 muestran que esta proteína sufre cambios en el estado de fosforilación en respuesta a la infección, al tiempo que ha puesto de manifiesto la inestabilidad de la proteína AtCPK1 y su degradación por el proteasoma. Ello permite hipotetizar una posible regulación de AtCPK1 por el proteasoma dependiente de fosforilación. Si fuera así, un posible escenario en el que nos podríamos situar sería el siguiente: el reconocimiento del patógeno desencadenaría una señal de transducción (todavía no caracterizada) que da lugar a una activación transcripcional rápida de la expresión del gen AtCPK1 que contribuiría a un incremento en la acumulación de AtCPK1 en estadios iniciales de la infección. Una fracción de la proteína (preexistente o sintetizada *de novo*) sería fosforilada por quinasa(s) no caracterizadas, lo cual unido a la regulación mediada

por la unión del calcio al dominio calmodulina de AtCPK1 desencadenaría las reacciones posteriores de fosforilación/defosforilación de la ruta de señalización. La degradación controlada por el proteasoma sería responsable de que los niveles de AtCPK1 "activa" sean los adecuados en la respuesta a la infección a lo largo del tiempo.

Proteínas que interaccionan con AtCPK1

Para entender la función de AtCPK1 en la defensa de la planta de Arabidopsis frente a la infección por hongos patógenos se plantearon estudios para identificar proteínas que interaccionan con AtCPK1 que pudieran ser también componentes de la ruta de señalización en la que participa AtCPK1. Para ello, se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales: i) captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad a la proteína fusión GST-AtCPK1; ii) cromatografía de immunoafinidad; y iii) purificación de complejos mediante el sistema TAP. Cada una de estas estrategias tiene sus ventajas y limitaciones, pero la combinación de las tres estrategias permite alcanzar una idea, aunque todavía sesgada, acerca del interactoma de AtCPK1.

i) La captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad utilizando una proteína de fusión como cebo (en nuestro caso, AtCPK1-GST) es una estrategia relativamente fácil, usada frecuentemente en la literatura, y de alto rendimiento. Se trata, sin embargo, de un sistema que permite la interacción de proteínas *in vitro* por lo que las interacciones encontradas pueden no coincidir con la localización de las proteínas en el contexto de la célula (la compartimentalización en diferentes organelos de la célula podría hacer que la interacción encontrada *in vitro* no se tenga lugar *in vivo*). Además, se utiliza como cebo una proteína recombinante producida en *E. coli*, que puede no haber sufrido las modificaciones postraduccionales apropiadas, en nuestro caso, la fosforilación por una quinasa no presente en *E. coli*, o la miristoilación en el dominio N-terminal de AtCPK1 (en procariotas no se encuentra la transferasa de grupos miristoilo que cataliza la unión del ácido mirístico a la glicina del extremo N-terminal de la proteína sustrato). Al tratarse de una proteína recombinante por fusión a la GST es también posible que la proteína fusión no adopte la conformación de la proteína nativa, o que no se estructure correctamente al no estar en el entorno apropiado (por ejemplo AtCPK1 está asociada a membrana). Todos estos factores pueden interferir en la capacidad de AtCPK1 para interaccionar con otras proteínas o dar lugar a interacciones que no se producen en la célula vegetal. De cualquier modo, la estrategia de captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad utilizando una proteína fusión

GST-AtCPK1 como cebo nos ha permitido validar las interacciones identificadas con las otras estrategias utilizadas en este trabajo.

ii) La aproximación de captura de complejos proteicos mediante inmunofluorescencia es más compleja técnicamente y el rendimiento es un factor limitante en el caso de proteínas poco abundantes. Además, esta técnica es muy dependiente de la especificidad y afinidad del anticuerpo por su antígeno. Se cuestiona también si las interacciones detectadas ocurren en células intactas. En cambio, esta aproximación permite identificar interacciones con la proteína nativa y en la concentración en la que se encuentra en la célula vegetal. La fijación de las interacciones antes de iniciar la ruptura de las células, favorece la detección de interacciones, incluso de aquellas que sean transitorias, que ocurren en células intactas.

iii) La aproximación con el sistema de purificación TAP posee múltiples ventajas que incluyen la simplicidad de la técnica, alto rendimiento y reproducibilidad. Más importante, este sistema permite la purificación de complejos que ocurren *in vivo* utilizando la proteína producida en la propia célula vegetal, aunque modificada por la adición de epítopes que son necesarios para su purificación por afinidad. En este trabajo, la proteína AtCPK1-cTAP se ha sobreexpresado lo que ha favorecido su purificación, pero existe la posibilidad de que algunas de las interacciones detectadas sean consecuencia del exceso de proteína AtCPK1, y que en condiciones naturales estas interacciones no ocurran. De acuerdo con esto, el sistema TAP ha mostrado muchas proteínas que podrían ser componentes del interactoma de AtCPK1, para las cuales no es fácil encontrar una explicación. Por ello, se hace conveniente que las interacciones encontradas con el sistema TAP sean validadas con aproximaciones complementarias.

Por los motivos expuestos, en este trabajo se han considerado únicamente aquellas proteínas que fueron identificadas con los distintos sistemas experimentales utilizados, lo que sugiere que efectivamente estas proteínas pueden ser componentes del interactoma de AtCPK1 y relevantes para su función, e incluso sustrato de la actividad quinasa de AtCPK1. Entre ellas destacaremos las proteínas 14-3-3, la proteína peroxisomal APX3, las catalasas 2 y 3, las nitrilasas y las H⁺-ATPasas, que son comentadas a continuación.

Los resultados mostrados indican que AtCPK1 interactúa directamente con al menos dos isoformas de **proteínas 14-3-3**, y sugieren que podría mostrar una mayor afinidad por estas proteínas 14-3-3 en situación de infección que en condiciones de crecimiento normal, esto es en ausencia de infección (**Figura R19**). La interacción de AtCPK1 con proteínas 14-3-3 ha sido detectada en dos de las tres

estrategias empleadas, mediante cromatografía de afinidad a la proteína fusión GST-AtCPK1 y en ensayos de inmunoafinidad (**Figuras R19** y **R22**, respectivamente), y confirmada con ensayos *pull-down* (**Figuras R30**).

En relación a la función de las proteínas 14-3-3, se sabe que estas proteínas desempeñan una función reguladora de diferentes procesos celulares a través de su interacción con otras proteínas, o proteínas cliente. En muchos casos funcionan a modo de "adaptador" que facilita la interacción entre diferentes proteínas cliente. Esta interacción es dependiente de fosforilación y de la presencia de iones calcio. Por citar algún ejemplo, se ha descrito la interacción de estas proteínas con proteínas implicadas en el metabolismo del carbono y del nitrógeno (la nitrato reductasa, o la glutamina sintasa o la sacarosa fosfato sintasa), así como también con proteínas implicadas en señalización, p.e. en condiciones de carencia de nutrientes (p.e. proteínas quinasas) (Comparot *et al.*, 2003). Las proteínas 14-3-3 se encuentran muy conservadas en eucariotas. La unión a su proteína "cliente" puede estabilizar la actividad de dicha proteína en su forma fosforilada (activa o inactiva), inducir cambios conformacionales que la activan o inactivan, o alteran su unión a otras proteínas, o dirigir su localización subcelular. En Arabidopsis se han identificado 15 genes que codifican proteínas 14-3-3, de las cuales 12 han sido detectadas mediante análisis proteómico (Fuller *et al.*, 2006). Además, se sabe que las proteínas 14-3-3 dimerizan y cada subunidad 14-3-3 puede interactuar con una proteína diferente. También pueden formar heterodímeros, lo que podría explicar que en nuestros ensayos hayamos identificado más de una isoforma 14-3-3.

Los resultados obtenidos sobre la interacción de AtCPK1 con proteínas 14-3-3 corroboran resultados publicados por otros grupos. Así, Camoni *et al.* (1998) describieron que la proteína AtCPK1 interactúa *in vitro* con tres isoformas 14-3-3, y que esta interacción estimula la actividad quinasa de AtCPK1 (estudios realizados utilizando la proteína básica de mielina, MPB, como sustrato). Más recientemente, la utilización del sistema TAP para purificar complejos proteicos de proteínas 14-3-3 de Arabidopsis ha permitido identificar la proteína AtCPK1 entre dichos complejos (Chang *et al.*, 2009). Además de las evidencias experimentales que existen de la interacción entre AtCPK1 y proteínas 14-3-3, comentar que la proteína AtCPK1 posee en su dominio N-terminal la secuencia RTESKP (posiciones 80-86) que es similar a la secuencia que se ha descrito como motivo de unión de proteínas 14-3-3, la secuencia RSXSXP (donde la Ser subrayada está fosforilada) (Muslin *et al.*, 1996). Además, la serina del motivo RTESKP ha sido identificada como un residuo autofosforilado en la proteína AtCPK1 mediante mapeo fosfoproteómico (Hegeman

et al., 2006). Todo ello sugiere que la interacción entre AtCPK1 y proteínas 14-3-3 se podría producir a través del dominio N-terminal de AtCPK1. Así con la información disponible sobre el mecanismo de acción de las proteínas 14-3-3 y de la interacción observada entre AtCPK1 con estas proteínas se puede pensar que tras el reconocimiento del patógeno, la proteína AtCPK1 es fosforilada lo cual determinaría su interacción con proteínas 14-3-3. Esta interacción podría estimular la actividad quinasa de AtCPK1 sobre sus proteínas sustrato, dianas de fosforilación por AtCPK1.

Por otra parte, los resultados mostrados en este trabajo indican que **AtCPK1 interacciona con enzimas peroxisomales implicadas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno**. Es bien conocido que en condiciones normales, en la célula vegetal se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), tanto durante la fotosíntesis en el cloroplasto como durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Pero las moléculas ROS no son únicamente un subproducto de las reacciones metabólicas, sino que tienen un papel regulador de muchos procesos biológicos actuando como moléculas señalizadoras en procesos de muerte celular programada, desarrollo, señalización hormonal, respuesta a estrés abiótico y respuesta a patógenos. Así, en condiciones de estrés ambiental, incluida la infección por patógenos, se incrementa la producción de ROS. Estas moléculas son muy reactivas y pueden resultar tóxicas para la propia célula ya que pueden provocar la oxidación de biomoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por ello, los niveles de ROS están altamente regulados mediante una serie de procesos en los que participan proteínas detoxificadoras de las ROS, tales como los enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y las catalasas. Las distintas aproximaciones seguidas en este trabajo han permitido identificar a varias proteínas implicadas en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, tales como la catalasa 2 (CAT2), la catalasa 3 (CAT3) y la ascorbato peroxidasa 3 (APX3), formando parte de los complejos multiproteicos en los que participa AtCPK1.

La **ascorbato peroxidasa APX3** se identificó en los ensayos de cromatografía de afinidad con la proteína de fusión GST-AtCPK1 (**Figura R20**) y en los ensayos de inmunoafinidad (**Figura R22**). El ensayo de *pull-down* confirmó la interacción directa entre AtCPK1 y la proteína APX3 (**Figuras R30**). Esta proteína se encuentra asociada al peroxisoma, aunque existen otras ascorbato peroxidasa localizadas en el citoplasma, mitocondrias y cloroplastos (Narendra et al., 2006). Hay que destacar que los estudios desarrollados bien en el propio grupo, bien por otros

autores, han demostrado que la proteína AtCPK1 se localiza en peroxisomas, muy probablemente anclada a la membrana del peroxisoma (Dammann *et al.*, 2003; Coca y San Segundo, 2010). Estos datos apoyan que la interacción entre AtCPK1 y la proteína APX3 puede ocurrir en el peroxisoma. En otros estudios se ha descrito que APX3 interacciona con una proteína 14-3-3 en un ensayo de doble híbrido (Zhang *et al.*, 1997). Existe por tanto la posibilidad de que la interacción entre la proteína APX3 y AtCPK1 pudiera estar mediada por proteínas 14-3-3.

Los ensayos de captura por inmutofinidad y con el sistema TAP han identificado a las **catalasas 2 y 3** como posibles componentes del interactoma de AtCPK1 (tablas II y III). Se desconoce si hay una interacción directa entre AtCPK1 y las catalasas ya que no se detectó interacción entre ellas en los ensayos de *pull down*. En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran 3 genes que codifican para 3 subunidades diferentes de catalasas que se asocian entre si para formar al menos 6 isoenzimas diferentes (Frugoli *et al.*, 1996 y www.arabidopsis.org). Ello explicaría que se haya identificado más de una isoforma de catalasa en nuestros ensayos. Las catalasas están principalmente asociadas al peroxisoma, aunque también se han encontrado en el cloroplasto, la mitocondria y el citoplasma.

Recientemente se ha descrito que incremento en los niveles de calcio citoplasmático va seguido de un incremento en los niveles de calcio en el lumen de los peroxisomas en plantas de *Arabidopsis*, y que el incremento en los niveles de calcio en el peroxisoma induce la actividad catalasa (Costa *et al.*, 2010). En este momento, solo se pueden hacer hipótesis sobre una posible regulación de la actividad ascorbato peroxidasa APX3 o catalasa por AtCPK1 en relación al control de los niveles ROS en la célula vegetal. Existe una evidencia que apoyaría la hipótesis de que efectivamente AtCPK1 podría estar implicada en la regulación de especies reactivas de oxígeno que ha sido obtenida por la expresión ectópica de AtCPK1 en protoplastos de tomate que indica que AtCPK1 estimula la producción de ROS (Xing *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que APX3 y catalasas formen parte del interactoma de AtCPK1 sin que haya una regulación directa de la actividad de estos enzimas detoxificadores de ROS por AtCPK1.

Entre las proteínas identificadas como componentes de los complejos en los que participa AtCPK1 mediante el sistema TAP se identificaron tres proteínas **nitrilasas** (NIT1, NIT2 y NIT3), de las cuatro nitrilasas que se han identificado en *Arabidopsis*. Tan solo dos de ellas (NIT2 y NIT3) interaccionan *in vitro* con AtCPK1 en los ensayos de *pull-down* (**Figura R30**). Las proteínas NIT1, NIT2 y NIT3 son bastante similares entre ellas, pero considerablemente diferentes a la NIT4 (Janowitz *et al.*,

2009). Las nitrilasas catalizan la hidrólisis de grupos nitrilos (cianidas orgánicas) de sus grupos carboxilos liberando un grupo amonio. Aunque tradicionalmente se creía que las nitrilasas desempeñan un papel muy relevante en la biosíntesis de auxinas, actualmente existen evidencias que lo contradicen, habiéndose demostrado que funcionan principalmente en la detoxificación de cianidas y el reciclaje del nitrógeno (Piotrowski, 2008). Una de las principales funciones propuestas para las nitrilasas de *Arabidopsis* es que participan en el catabolismo de los glucosinolatos (Pollmann *et al.*, 2009). Estos compuestos son metabolitos secundarios implicados en la defensa frente a patógenos y herbívoros. Así, se sabe que la expresión del gen NIT2 se induce fuertemente en respuesta a patógenos y a herida, situaciones en las que se espera un incremento en la liberación de nitrilos a partir de los glucosinolatos, situación en la cual se requiere de la función de nitrilasas para la detoxificación de la célula (Piotrowski, 2008). También se sabe que la NIT1 en respuesta a herida forma agregados citoplasmáticos, que podrían participar en los procesos de muerte celular programada (Cutler y Somerville, 2005). Además se ha descrito que los factores de transcripción de respuesta a etileno (EREBP) interaccionan con una nitrilasa de tabaco citoplasmática, evitando la interacción con las secuencias promotoras de los genes de defensa (Xu *et al.*, 1998). El modelo propuesto por estos autores es que la nitrilasa de tabaco funcionaría como un guardián del factor de transcripción EREBP, pero que en condiciones de infección la producción de etileno favorecería la separación de ambas proteínas y el factor de transcripción se translocaría al núcleo para activar la expresión de genes de defensa. De manera similar, podría pensarse que la interacción entre AtCPK1 y las nitrilasas NIT2 y NIT3 podría regular la función de AtCPK1, o bien AtCPK1 la de las nitrilasas, con el consiguiente efecto en la respuesta de defensa. Sin embargo, es evidente que la función biológica de dicha interacción necesita ser caracterizada en más profundidad.

Por otra parte, se observa que la mayor parte de las proteínas purificadas mediante cromatografía de inmunoadinidad e identificadas en los complejos proteicos de los que forma parte AtCPK1 corresponden **a proteínas cloroplásticas que participan en el ciclo oxidativo del cloroplasto**. Algunas de estas proteínas fueron también identificadas mediante el sistema TAP. Entre ellas encontramos varias subunidades de la ATPasa localizada en la membrana del tilacoide, la H⁺-ATPasa de tipo F. Las ATPasas de tipo F son enzimas muy complejas formadas por más de ocho subunidades distintas, que catalizan el paso reversible de protones a través de la membrana impulsado por la hidrólisis de ATP. Estas ATPasas juegan un

papel importante dentro de los cloroplastos y mitocondrias. Puesto que el flujo de protones a favor del gradiente va acompañado por la síntesis de ATP, las H⁺-ATPasas son también conocidas como **ATP sintasas**. Se han identificado las subunidades alfa, beta y gamma del complejo F1 localizado en el lumen del tilacoide, en tanto que no se ha identificado ningún componente del complejo F0 integral de membrana. La interacción entre la proteína AtCPK1 y la subunidad alfa de la ATPasa se ha confirmado mediante ensayo de *pull down* (**Figura R30**). Por otra parte, se sabe que la actividad de la ATP sintasa cloroplástica está regulada negativamente por fosforilación mediada por proteínas 14-3-3 (localizadas en el cloroplasto) en condiciones que favorecen la hidrólisis de ATP, o la actividad ATPasa, para evitar el consumo energético (Bunney *et al.*, 2001). Aunque no se cuenta con evidencia experimental, podría pensarse que la proteína AtCPK1 pudiera regular, por procesos de fosforilación, directa o indirectamente, a las ATP sintasas cloroplásticas implicadas en el ciclo oxidativo, lo cual iría a su vez asociado a la producción de ROS.

Otra de las proteínas encontradas en los complejos en los que se encuentra AtCPK1 es la **proteína de unión a las clorofilas a/b** (LHCP AB180), que junto a las clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos forman el complejo antena de los fotosistemas. Estas proteínas LHCP AB180 se han identificado tanto por el sistema TAP, como mediante cromatografía de inmunoafinidad. Además, con este último sistema, también hemos encontrado otros componentes del complejo antena como la LHCB2 o la PSBP-1.

Existen numerosos factores ambientales que afectan a la fotosíntesis y eficiencia del transporte de electrones que conducen a cambios en el estado redox de los cloroplastos con el consiguiente aumento de las moléculas ROS. Desde hace muchos años se sabe que la fosforilación de proteínas es un mecanismo regulador que ajusta las condiciones de luz con las propiedades de distribución de energía de los fotosistemas (Baginsky y Gruissem, 2009). La regulación de estos procesos dependiente de la fosforilación de proteínas también determina el nivel de producción de ROS. De cualquier modo, la relación que puede existir entre la respuesta a patógenos y la producción de ROS en cloroplastos hasta el momento se desconoce. Resulta particularmente interesante el hecho de que muchos mutantes de defensa de *Arabidopsis* presentan un fenotipo de formación de lesiones espontáneas (*lesion mimic*, similar a la respuesta HR que se induce en plantas silvestres por infección) que es dependiente de la luz y que es una consecuencia de la alteración del metabolismo de los cloroplastos y generación de ROS (Lorrain *et al.*, 2003). Estos mutantes presentan expresión constitutiva de los genes de

defensa y son más resistentes a patógeno. Además los cloroplastos desempeñan un papel importante en la defensa de la planta ya que están implicados en la producción de SA y de intermediarios de la síntesis del JA (Wildermuth *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2005).

Puesto que los estudios realizados para identificar proteínas del interactoma de AtCPK1 habían apuntado a la presencia de proteínas cloroplásticas en dicho interactoma, se consideró importante determinar si AtCPK1 se localiza en los cloroplastos. Para ello, se obtuvieron preparaciones puras de cloroplastos a partir de los cuales se prepararon extractos proteicos que fueron luego utilizados para la inmunodetección de AtCPK1 con el anticuerpo preparado en este trabajo frente al dominio N-terminal de AtCPK1. Los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que AtCPK1 se localiza en el cloroplasto (**Figura R32**).

Al consultar la información disponible en la base de datos del TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>) sobre la localización subcelular de proteínas CPKs de Arabidopsis se vio que hay tres isoformas para las que se ha predicho una asociación con los cloroplastos, la AtCPK15 (At4g21940), AtCPK16 (At2g17890) y AtCPK24 (At2g31500). Existe por tanto la posibilidad de que en los experimentos de inmunodetección con el anticuerpo preparado frente al dominio N-terminal de AtCPK1 sobre extractos de proteínas cloroplásticas se estuviera inmunodetectando otra proteína CPK. En este trabajo, se ha comprobado que este anticuerpo no reconoce a la proteína AtCPK2, la isoforma más homóloga a AtCPK1, pero no se ha comprobado experimentalmente si este anticuerpo reconoce o no a las CPKs cloroplásticas (AtCPK15, AtCPK16 y AtCPK24). El porcentaje de similitud entre los dominios N-terminal de AtCPK1 y los correspondientes de AtCPK15, AtCPK16 y AtCPK24 es del 14, 5 y 13 %, respectivamente. La baja homología encontrada entre ellas hace poco probable que el anticuerpo AtCPK1 esté reconociendo a alguna de estas isoformas cloroplásticas.

En resumen, los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral indican que la proteína AtCPK1 puede ser componente de más de un complejo multiproteico, más concretamente AtCPK1 puede formar parte de complejos localizados en el peroxisoma y en el cloroplasto. Ello hace que el panorama sobre la ubicación de la proteína en la célula sea bastante complejo. Así, los estudios llevados a cabo en el propio grupo, y en otros grupos, en los que se determinó la localización subcelular de fusiones a proteínas fluorescentes en raíz y cultivos celulares de Arabidopsis, o en epitelio de cebolla, han mostrado una localización de AtCPK1 en peroxisomas y en cuerpos lipídicos (Dammann *et al.*, 2003; Coca y San Segundo, 2010). También

es cierto que estos últimos estudios fueron realizados en tejidos de la planta que no son fotosintéticamente activos (sin cloroplastos). Así que es posible que AtCPK1 esté asociada a cloroplastos en tejidos verdes, pero que haya pasado inadvertido en los otros estudios. Los datos mostrados en este trabajo vienen a añadir una complejidad adicional en relación a la localización de AtCPK1 en cloroplastos, hasta el momento no observada mediante las otras aproximaciones experimentales.

La presencia de AtCPK1 en los cloroplastos plantea la cuestión de cómo una proteína sin péptido de tránsito conocido es importada a este orgánulo. Aunque la mayoría de las proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo utilizan el sistema general de importe desde el citosol al cloroplasto basado en el reconocimiento del péptido de tránsito por el complejo multiproteico translocón, existen ejemplos en la literatura de proteínas que utilizan vías especializadas diferentes a la vía canónica (Li y Chiu, 2010). Por ejemplo, se ha descrito que algunas proteínas 14-3-3 median la translocación de proteínas al cloroplasto. Otras proteínas son importadas al cloroplasto vía el sistema de endomembranas citoplasmáticas. Por tanto, es posible considerar que la proteína AtCPK1 sea importada al cloroplasto a través de un sistema alternativo a la vía canónica mediada por el traslocón y el péptido de tránsito, aún por identificar. Estudios adicionales son necesarios para clarificar este aspecto.

La complejidad de la localización subcelular de AtCPK1 queda ilustrada en la **figura D2**, donde se presenta un modelo de las posibles funciones de AtCPK1 durante la respuesta de defensa de la planta de Arabidopsis, desarrollado a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

A modo de conclusión puede decirse que AtCPK1 presenta una regulación de su expresión a diferentes niveles, a nivel transcripcional y a nivel post-traducciona (fosforilación y estabilidad de la proteína mediada por el proteasoma). La presencia de iones calcio determina de manera importante la capacidad de interacción de AtCPK1 con otras proteínas. Entre las proteínas que podrían ser componentes del interactoma de AtCPK1 se encuentran enzimas peroxisomales relacionados con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ascorbato peroxidada, catalasas), nitrilasas implicadas en la detoxificación de cianidas, y proteínas que participan en el ciclo oxidativo del cloroplasto.

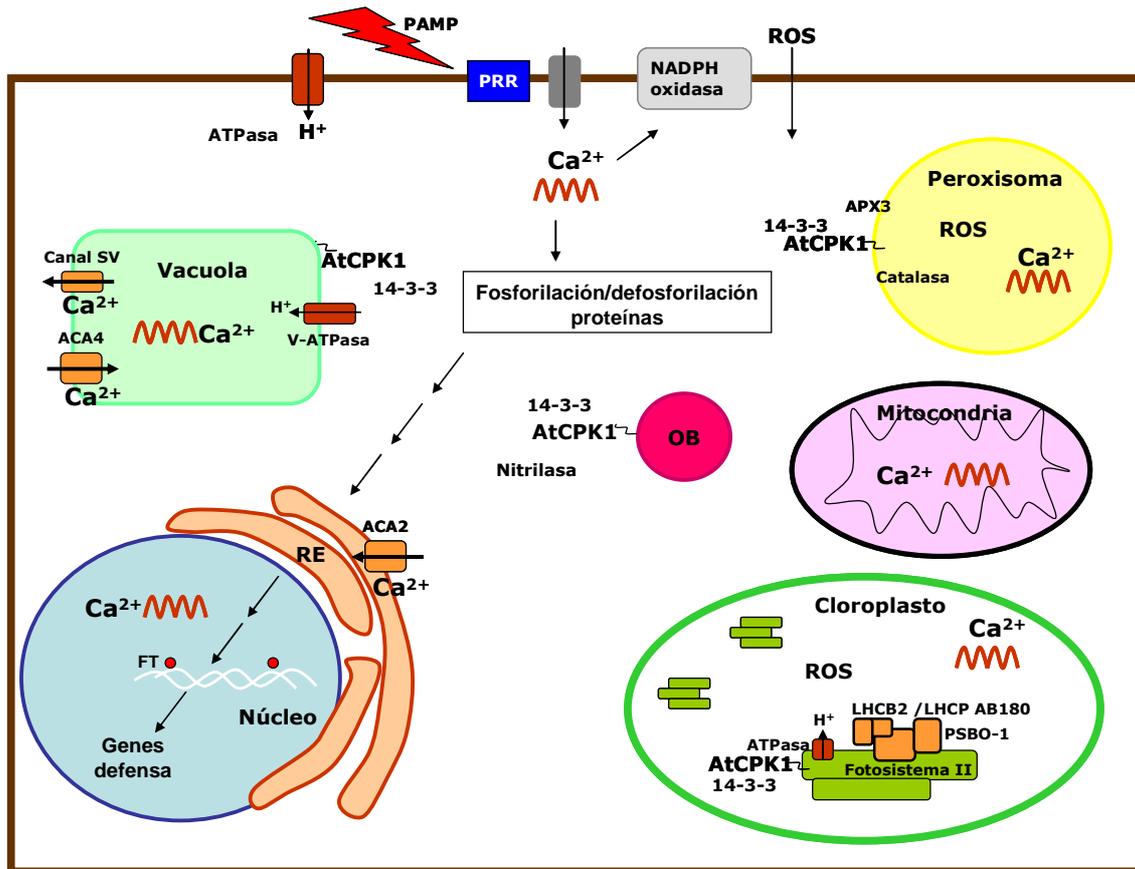


Figura D2. Modelo de las posibles funciones celulares de AtCPK1 durante la respuesta de defensa. Abreviaturas: ACA, Ca^{2+} -ATPasa; APX3, ascorbato peroxidasa 3; LHCP AB180 y LHCB2, proteínas de unión a clorofilas a/b; OB (*Oil-Bodies*), gotículas lipídicas; FT, factor de transcripción; PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*; PRR, *Pattern Recognition Receptors*; PSBO-1, photosystem II oxygen-evolving complex 1; RE, retículo endoplasmático; ROS, *Reactive Oxygen Species*.





Conclusiones

Conclusiones



Conclusiones



La expresión del gen *AtCPK1* de *Arabidopsis thaliana* se induce en respuesta a la infección por el hongo patógeno *F. oxysporum* y al tratamiento por elicitores del mismo hongo. La activación transcripcional de *AtCPK1* es rápida, pero transitoria.

El tratamiento con las hormonas, SA, ACC, MeJA, ABA, 2,4D y IAA, también activa transcripcionalmente la expresión de *AtCPK1*, si bien en todos los casos se trata de una inducción suave y transitoria de su expresión.

La proteína *AtCPK1* aumenta su nivel de acumulación en respuesta a la infección por el hongo *F. oxysporum* o al tratamiento con elicitores fúngicos en tiempos tempranos de la infección, pero no se observa un efecto acumulativo de la proteína *AtCPK1* en el tiempo. Ello se explicaría por la degradación controlada por el proteasoma que sería responsable del mantenimiento de los niveles adecuados de *AtCPK1* en la respuesta de defensa de la planta.

La proteína *AtCPK1* presenta diferentes estados de fosforilación en plantas de *Arabidopsis*. En respuesta a la infección fúngica, la proteína *AtCPK1* se fosforila bien por autofosforilación, bien por otras quinasas pendientes de identificación.

El interactoma de *AtCPK1* es mucho más complejo en plantas infectadas respecto a de plantas control no infectadas. La presencia de iones calcio tiene un efecto importante en la interacción de *AtCPK1* con otras proteínas. Así, en presencia de calcio se mimetiza el efecto de la infección en relación a las proteínas que interaccionan con *AtCPK1*.

Mediante estrategias complementarias para caracterizar los componentes del interactoma de *AtCPK1* se han identificado proteínas que interaccionan con *AtCPK1* y proteínas que podrían ser componentes de complejos multiproteicos en los que participa *AtCPK1*. Entre las proteínas que interaccionan con *AtCPK1* se encuentran proteínas 14-3-3, proteínas implicadas en la protección frente a estrés oxidativo (ascorbato peroxidasa y catalasas), y en la detoxificación celular (nitrilasas), así como también proteínas cloroplásticas que participan en el ciclo oxidativo del cloroplasto (la ATP sintasa y la proteína de unión a las clorofilas a/b).

La proteína *AtCPK1* se localiza en cloroplastos en plántulas de *Arabidopsis* tanto en condiciones control como en situación de infección por *F. oxysporum*. Ello viene a representar un nivel más de complejidad en cuanto al compartimento subcelular en el cual *AtCPK1* desempeña su función y se añade a las localizaciones anteriormente descritas para esta proteína en peroxisomas y cuerpos lipídicos de *Arabidopsis*.





Material y métodos



MATERIAL

1. MATERIAL VEGETAL

1.1. Ecotipos silvestres

En este trabajo se han usado plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-2 (Col2).

1.2. Líneas transgénicas

-*promAtCPK1:GFP-GUS*: plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col2 portadoras de la fusión transcripcional del promotor AtCPK1 (fragmento de DNA comprendido entre las posiciones -1732 a +461 del gen AtCPK1 que incluye el promotor más la secuencia 5' no traducida) al gen de fusión *GFP-GUS*.

-*prom35Sx2:AtCPK1-TAPa*: plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col2 portadoras del transgén para la expresión del gen de fusión *AtCPK1-TAPa* bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35Sx2*.

2. MANEJO, CULTIVO Y TRATAMIENTOS DEL MATERIAL VEGETAL

2.1. Condiciones de cultivo en el invernadero

Las plantas de *Arabidopsis* se han cultivado en macetas en una mezcla 3:1:1 de turba, perlita y vermiculita. Las condiciones de cultivo en el invernadero fueron $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, con una humedad ambiental del 55%, y un fotoperíodo de 14h de luz y 10 de oscuridad. Las plantas se han regado por inundación en bandejas 2-3 veces por semana, según las necesidades de las plantas. Una de las veces, se riegan con una solución fertilizante diluida (dilución 1/240). La solución fertilizante está basada en la solución de Hoagland modificada por Johnson y colaboradores (1957), con la siguiente composición: NO_3K 8,4mM, NH_4NO_3 1,2mM, K_2HPO_4 1,2mM, KH_2PO_4 1,2mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,7mM, $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6mM. Esta solución es completada con un quelante de hierro Kelamix 35mg/L y microelementos 0,4g/L.

2.2. Condiciones de cultivo *in vitro* de plántulas

Las plantas se crecieron *in vitro* en condiciones estériles en medio MS sin suplemento de sacarosa (referido en este trabajo como MS-). Las semillas utilizadas en este trabajo se mantuvieron durante 3 días en oscuridad a 4°C para sincronizar la germinación, como paso previo al cultivo *in vitro* o en tierra. Las

condiciones de crecimiento fueron 22-24°C de temperatura y fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.

2.3. Esterilización de semillas de Arabidopsis

La esterilización de las semillas de Arabidopsis se efectúa para evitar contaminaciones por microorganismos cuando se siembran en cultivo *in vitro*. Esta esterilización se ha hecho en seco. Se colocan las semillas en tubos de microcentrifuga y se depositan en un secador donde se incuban durante 4h en presencia de los gases que se desprenden de la reacción de 97ml de hipoclorito sódico y 3ml de HCl (al 35%). Transcurrido este tiempo las semillas se colocaron directamente en placas de medio MS- o sobre papel de filtro estéril sobre medio MS-.

2.4. Infección de plántulas Arabidopsis con el hongo *F. oxysporum*

El procedimiento utilizado para la obtención de esporas de *F. oxysporum* ha sido la siguiente:

1. Crecer el hongo en placas de Petri en medio PDA a 22-24°C durante aproximadamente 15 días, hasta que el micelio del hongo ocupe toda la placa.
2. Añadir 5ml de agua estéril a la placa y pasar suavemente por encima un asa de siembra esterilizada, con el fin de separar las esporas del micelio.
3. Recoger las esporas con una pipeta, filtrar a través de dos capas de *Mira cloth* (Calbiochem) estéril y contar las esporas en una cámara *Burker*.
4. Diluir con agua estéril a una concentración 1×10^5 esporas/mL y añadir Tween-20 al 0,02%.
5. Infectar las plantas rociándolas con la suspensión de esporas mediante un dosificador de aspersión, hasta cubrir las hojas de las plantas de forma homogénea.

Las plántulas de Arabidopsis de 15 días crecidas *in vitro*, se infectaron mediante rociado con una suspensión de esporas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiola* (aislado 488), a una concentración de 1×10^5 esporas/mL. A continuación, las placas se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento durante el período de tiempo requerido, manteniéndolas en oscuridad durante las primeras 24 h de infección.

2.5. Tratamiento de plántulas de Arabidopsis con elicitores de *F. oxysporum*

Se prepararon elicitores a partir de micelio del hongo *F. oxysporum*.

Procedimiento:

1. Crecer el hongo en medio líquido PDA a 22-24°C durante aproximadamente 6 semanas (500 ml de medio en un matraz de 2 L).
2. Recoger el micelio por filtración a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem) y autoclavar 120°C durante 20min (dos ciclos de autoclave).
3. Sonicar (Disruptor ultrasónico, Scientz) el micelio hasta conseguir una mezcla homogénea, a una potencia de 25 W y frecuencia de 20-25 kHz.
4. Congelar la muestra en nitrógeno líquido y liofilizar hasta que esté completamente seca.
5. Diluir con agua estéril a una concentración 300µg/mL.

Los tratamientos con elicitores se realizaron en plántulas de Arabidopsis de 15 días crecidas *in vitro* sobre papel de filtro estéril. El tratamiento se lleva a cabo pasando las plántulas sobre papel a medio MS líquido (también sin sacarosa) suplementado con elicitores de *F. oxysporum* a una concentración final de 300µg/mL. Las plantas se incuban en presencia de elicitores durante diferentes períodos de tiempo.

2.6. Tratamiento de plántulas de Arabidopsis con hormonas.

Los tratamientos con hormonas se realizaron en plántulas de Arabidopsis de 15 días crecidas *in vitro* sobre papel de filtro estéril. El tratamiento se lleva a cabo pasando las plántulas sobre papel a medio MS líquido (también sin sacarosa) suplementado con hormonas a una concentración de SA (100 mM), MeJA (100 µM), ACC (20 µM), ABA (100 µM), 2,4D (50 µM), IAA (100 µM). Como control para los tratamientos con SA, MeJA y ACC se suplementó el medio con agua estéril y con etanol diluido para los tratamientos con ABA, 2,4D e IAA. Las plantas se incuban en presencia de hormonas durante diferentes períodos de tiempo.

3. MATERIAL BACTERIANO

Cepas

E. coli K-12 DH5a: utilizada para la amplificación de DNA plasmídico.

E. coli BL21: utilizada para la expresión de las proteínas GST-AtCPK1; GST-N-termAtCPK1; AtCPK2-His; AtCPK1-GST-His y APX3-His.

E. coli DB3.1: utilizada para la amplificación de los vectores Gateway portadores del gen *ccdB*.

Agrobacterium tumefaciens C58 GV2260: Transformación *A. thaliana*

4. PLÁSMIDOS Y CONSTRUCCIONES

4.1. Vectores de clonaje de productos de PCR

pGEM-T Easy vector (Promega): vector utilizado para la clonación de productos de PCR mediante el sistema de clonaje TA (Ampicilina^R).

pCRII-Topo (Invitrogen): vector utilizado para el clonaje de productos de PCR por el sistema de clonaje a TA (Ampicilina^R, Kanamicina^R).

4.2. Vectores binarios

pCAMBIA 1304 (CSIRO, Australia): vector binario para la transformación de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*. El T-DNA contiene el gen de resistencia a higromicina y el gen que codifica para la proteína de fusión GFP-GUS.

C-TAPa (pC-TAPa, Ohio State University Stock Center): vector binario para la transformación de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens* (Rubio *et al.*, 2005). Utilizado para la obtención de plantas que expresan de forma constitutiva genes de fusión a las secuencias codificantes del epítipo TAP en C-terminal. El epítipo TAP contiene 9 repeticiones del motivo myc (9xmyc), fusionado a una secuencia de 6xHis, a la secuencia de procesamiento de la proteasa 3C, más dos dominios repetidos de unión a IgG (2xIgGBD). Confiere resistencia a espectinomicina en bacterias y gentamicina en plantas.

4.3. Vectores de expresión en *E. coli*

pET28a/pET28b/pET14 (Promega): vector utilizado para la producción en *E. coli* de proteínas de fusión a un motivo de 6xHis, bajo el control del promotor de expresión procarionta *tac* inducible por IPTG. Confiere resistencia a kanamicina en bacterias.

pGEX4T-1/ pGEX4T-3 (GE Healthcare): vector para la producción de proteínas de fusión a la proteína glutatión-S-transferasa (GST) en *E. coli*, bajo el control del promotor *tac* inducible por IPTG. Confiere resistencia a carbenicilina en bacterias.

4.4. Construcciones

Plásmidos obtenidos en este trabajo:

pGEX4T1-N-terminalAtCPK1: se ha utilizado para la producción en *E. coli* de la proteína GST-N-termAtCPK1.

pGEX4T3-AtCPK1: producción en *E. coli* de la proteína recombinante GST-AtCPK1.

pet28a-APX3: producción en *E. coli* de la proteína APX3-His.

pet28a-AtCPK1-GST: producción en *E. coli* de la proteína AtCPK1-GST-His.

pet14-AtCPK2: producción en *E. coli* de la región N-terminal de la proteína AtCPK2-His.

AtCPK1-cTAPa: producción en planta de la proteína AtCPK1-cTAP.

pc1304-promAtCPK1:GFP-GUS: producción en planta de la proteína GFP-GUS bajo control de la región promotora del gen AtCPK1 (fragmento comprendido entre las posiciones -1732 y + 461 respecto al inicio de transcripción)

pet28a-Zm14-3-3: producción de la proteína Zm14.3.3 (GRF14) en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*

pet28a-ATPasa alfa: producción de la proteína ATPasa subunidad alfa en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pet28b-ATPasa beta: producción de la proteína ATPasa subunidad beta en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pet28a-AtCPK1-GST: producción en *E. coli* de la proteína recombinante AtCPK1-GST-His, en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pCRII -nitrilasa 1: producción de la proteína nitrilasa1 en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pCRII -nitrilasa 2: producción de la proteína nitrilasa 2 en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pCRII -nitrilasa 3: producción de la proteína nitrilasa3 en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pCRII -catalasa 2: producción de la proteína catalasa2 en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

pCRII -catalasa3: producción de la proteína catalasa 3 en reticulocitos de conejo, para los ensayos de *pull-down*.

4.5 Medios

MS sin sacarosa: Medio Murashige y Skoog (Duchefa) 4.4 g/L, MES 0.5 g/L, ajustar a pH 5.8, sin suplemento de sacarosa. Para medio sólido se añade 9 g/L de agar (Difco). Las plantas se crecieron en medio MS sin el suplemento de sacarosa para favorecer la infectividad del hongo. Este medio se usó en todos los ensayos *in vitro* y no solo en los de infección.

LB (Luria Bertani): bactotripton 10g/L, de extracto de levadura 5g/L y NaCl 10g/L. Para medio sólido se añade 15g/L de agar. Autoclavar.

YEB (Yeast Extract Broth): extracto de buey 5g/L, extracto de levadura 1g/L, peptone bacteriológica 5g/L, sacarosa 5g/L, MgSO₄ 0.048%. Para medio sólido añadir agar 15g/L. Ajustar el pH7.2 con NaOH/HCl. Autoclavar.

PDA: potato dextrose broth (PDA) 24g/L. Para medio sólido añadir agar 15g/L. Autoclavar 40 min, una vez se enfríe a 55°C aproximadamente. Añadir cloranfenicol hasta una concentración final de 30 mg/L.

4.6. Sondas de DNA

Para los ensayos tipo Northern-blot se utilizó como sonda de hibridación la región del cDNA de *AtCPK1* que codifica para el N-terminal de la proteína (fragmento comprendido entre las posiciones 1-280 respecto al ATG). El fragmento se obtuvo por PCR utilizando los cebadores *NtermAtCPK1_directo.sonda* y *NtermAtCPK1_reverso.sonda* (ver **tabla M1**). Como control de carga en los ensayos Northern-blot, las membranas fueron hibridadas con una sonda específica del gen de la actina 2 (*ACT2*, GI:21593338), de expresión constitutiva en las condiciones analizadas. La sonda de la actina utilizada corresponde al fragmento del cDNA entre las posiciones 459 y 1063 respecto al ATG, y se obtuvo por PCR utilizando los cebadores *Act2_directo* y *Act2_reverso*.

4.7. Cebadores para la amplificación de DNA mediante PCR

Tabla M1. Cebadores utilizados en este trabajo para la amplificación de DNA mediante PCR

CEBADORES	SECUENCIA 5' - 3'
<i>promAtCPK1_directo</i>	GGC CCG GGT TAT GAA AGG TTG AGG CTC G
<i>promAtCPK1_reverso</i>	CGG GCC CAG GGA TTG AAC AGA ATT TAG AGA AAG TGG
<i>FL_AtCPK1_directo</i>	C AGATCT GGA ATG GGT AAT GCT TGC GTT G
<i>FL_AtCPK1_reverso</i>	TCA CTC GAG TAG AGT TTA AGA GCA ATG CT
<i>AtCPK1_KpnI_directo</i>	GCG GTA CCG GAA TGG GTA ATA CTT GTG TTG
<i>AtCPK1_NotI_reverso</i>	GAT GCG GCC GCA GTT TAA GAG CAA TGC TAA AGC
<i>NtermAtCPK1_directo.sonda</i>	CAC CAT GGG TAA TAC TTG TGT TGG AC
<i>NtermAtCPK1_reverso.sonda</i>	CAA GGC TTA TCT CCT CTA GCG
<i>NtermAtCPK2_directo</i>	CCG GAA TTC ACC ATG GGT AAT GCT TGC GTT G
<i>NtermAtCPK2_reverso</i>	ATT CTC GAG ACC GCT TTC GTC TCT GGC TTG G
<i>ATPase.alpha_EcoRI_directo</i>	GC CGG AAT TCA CCA TGG TAA CCAT TAG AGC
<i>ATPase.alpha_SalI_reverso</i>	GCC GGT CGA CTA CTT TCT CCT GAA GTA G
<i>ATPase.beta_HindIII_directo</i>	GCC GAA GCT TAC CAT GAG AAC AAA TCC TAC TAC
<i>ATPase.beta_XhoI_reverso</i>	GCC GCT CGA GTT TCT TCA ATT TAC TCT CC
<i>pENTR.attL1_directo</i>	ACT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T
<i>pENTR.attL2_reverso</i>	TTT GTA CAA GAA AGC TGG GGT
<i>Act2_directo</i>	GAT CTG GCA TCA CAC TTT CTA C
<i>Act2_reverso</i>	GCC TTG GAG ATC CAC ATC TGC TG
<i>GST_directo</i>	CCT CGA GGA TGT CCC CTA TAC TAG GTT ATT G
<i>GST_reverso</i>	CCA TCC TCC AAA ATC GGA TTA ACT CGA AG
<i>APX3_directo</i>	GGA ATT CGG AGC TAT GGC TGC ACC GAT TG
<i>APX3_reverso</i>	GAC ATG TAC CTG GTG GTG GCT TCA TCC TCT TCC GAA TCT

<i>Nitrilasa1_directo</i>	GCA TCG AGT TGA TAT GTC TAG
<i>Nitrilasa1_reverso</i>	TCC ATA CGA TTG ACA TAA CTC C
<i>Nitrilasa2/3_directo</i>	CTC AAG CTC AAG TTA AAA CAG
<i>Nitrilasa2_reverso</i>	TGA CGA ATC ACA ACC GAT TAC
<i>Nitrilasa3_reverso</i>	CGA ACT TGA CTT AAC TTC AGT
<i>Catalasa2_directo</i>	TCT CTG AAT CTC TCC AAG CTC TC
<i>Catalasa2_reverso</i>	CTA ATT AAC AAC CAC AGA AAG GCC
<i>Catalasa3_directo</i>	GAT CAT CAA CCT TCT ATC ATC AC
<i>Catalasa3_reverso</i>	CTGA GCT TAT ATG GAG ATT GGC C

4.8 Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios:

- **Anti-AtCPK1**, anticuerpo policlonal producido en conejo frente al dominio N-terminal de la proteína AtCPK1 (dilución de trabajo 1/1000). Generados en este trabajo.
- **Anti-14-3-3**, anticuerpo policlonal producido en conejo contra la proteína 14-3-3 (GRF14) de maíz (dilución de trabajo 1/1000). Disponibles en el grupo de investigación.
- **Anti-APX3**, anticuerpo policlonal producido en conejo contra APX3 (solución de trabajo 1/1000). Disponibles en el grupo de investigación.
- **Anti-His**, anticuerpo comercial (Novagen) policlonal de ratón frente al epítipo de 6 histidinas. (dilución de trabajo 1/1000)
- **Anti-GST**, anticuerpo comercial (Amersham) policlonal de cabra frente a la proteína GST (dilución de trabajo 1/2000).
- **Anti-c-myc**, anticuerpo monoclonal comercial (Sigma) de ratón frente al epítipo c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) de la proteína humana p62^{c-Myc}. (dilución de trabajo 1/1500)

Anticuerpos secundarios:

- Donkey antirabbit inmunoglobulines, HRP-conjugated (Amersham)
- Donkey antimouse inmunoglobulines, HRP-conjugated (Amersham)
- Rabbit antigoat inmunoglobulines, HRP-conjugated (DAKO)

MÉTODOS

5. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Obtención de DNA plasmídico

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo tienen orígenes de replicación bacteriana que permiten obtener un alto número de copias en *E. coli*. El método de

lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989) permite purificar los plásmidos a partir de un cultivo pequeño de estas bacterias.

Procedimiento:

1. Inocular 5ml de medio LB a partir del stock bacteriano correspondiente y dejar crecer durante una noche, con agitación suave a 37°C.
2. Llenar un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml con el cultivo de *E. coli*.
3. Centrifugar 2 min a 13000 rpm.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet con 250µl de solución P1.
6. Añadir 250 µl de solución P2. Mezclar suavemente por inversión
7. Añadir 250 µl de la solución P3. Mezclar suavemente por inversión.
8. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
9. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
10. Añadir 5 µl de RNasa 10 mg/mL al sobrenadante. Incubar 30 min a 37°C.
11. Añadir 450 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. Agitar con un vortex 1 min
12. Centrifugar 3 min a 13000 rpm.
13. Transferir la fase acuosa a otro tubo.
14. Añadir 450 µl de cloroformo a la fase acuosa. Agitar durante 1 min
15. Centrifugar 3 min a 13000 rpm.
16. Transferir la fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga.
17. Añadir 0.7 volúmenes de isopropanol a la fase acuosa. Mezclar e incubar 20 min a 4°C.
18. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
19. Descartar el sobrenadante.
20. Añadir 200 µl de EtOH 70%.
21. Centrifugar 5 min a 1000 rpm.
22. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
23. Resuspender el pellet en 50 µl de H₂O.

Tampón P1: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10mM, RNasa a 100 µg/mL, pH8.0

Tampón P2: 200mM NaOH, SDS 1%, pH8.0

Tampón P3: Acetato potásico 3M, pH 5.5 ajustado con ácido acético.

El DNA utilizado para secuenciar se purificó utilizando un kit comercial de Quiagen (QIAprep Spin Miniprep), siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.2. Reacciones de modificación del DNA

Para la realización de modificación de DNA, tales como la digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción, ligaciones, defosforilación de extremos de DNA, relleno de extremos protuberantes, etc, se han seguido los protocolos generales descritos por Sambrook et al. (1989) y Ausubel (1989), y las condiciones aconsejadas por el fabricante en cada caso. Sólo se detallan aquellas de especial relevancia o aquellas en las que el protocolo seguido se ha modificado.

5.3. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se ha utilizado el método de CaCl₂ tal y como describen Lederberg y Cohen (1974). La transformación se ha realizado mediante choque térmico. Para ello, se descongela en hielo una alícuota (100 µl) del cultivo bacteriano y se añade el DNA plasmídico, se mezcla por pipeteo y se congela en N₂ líquido. El choque térmico se realiza incubando la mezcla 5 min a 37°C. Posteriormente se añaden 800 µl de LB y se incuban una hora a 37°C en agitación. Finalmente se recuperan las células mediante centrifugación (1 min , 3000rpm), se plaquean en medio LB con el antibiótico apropiado y se incuban a 37°C toda la noche.

5.4. Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

La bacteria *A. tumefaciens* tiene la capacidad natural de interactuar con zonas lesionadas de las plantas (mediante un proceso de quimiotaxis) y, mediante un complejo mecanismo que involucra a varios genes de virulencia (genes *vir*), transfiere e integra el T-DNA en el genoma vegetal. En este trabajo se ha utilizado la cepa *A. tumefaciens* C58C1 (transformación *A. thaliana*) que contiene todos los genes *vir* dentro del plásmido Ti y es resistente a los antibióticos rifampicina (Rif) y carbenicilina (Cb).

Método de preparación de células competentes de *Agrobacterium*:

1. Inocular 4 ml de medio YEB con rifampicina 100 µg/ml y carbenicilina 100 µg/ml con una colonia aislada de *A. tumefaciens*. Incubar durante toda la noche a 28 °C con agitación.
2. Inocular 400 ml de medio YEB con Rif 100 µg/ml y Cb 100 µg/ml con el cultivo anterior. Incubar a 28 °C con agitación hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ = 0,5.
3. Enfriar el cultivo en hielo.

4. Centrifugar 10 min a 4000 rpm a 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender con 400 ml de H₂O fría estéril.
5. Repetir el paso anterior tres veces.
6. Centrifugar 10 min a 4000 rpm a 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 8 ml de glicerol 10 % frío estéril.
7. Centrifugar 10 min a 4000 rpm a 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 1 ml de glicerol 10 % frío estéril.
8. Dividir en alícuotas de 50 µl, y congelar en nitogeno líquido. Almacenar las alícuotas a -70 °C.

Transformación por electroporación:

Procedimiento:

1. Agregar el DNA plasmídico a una alícuota de 50 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo. Mezclar y transferir a una cubeta de electroporación de 1 mm de separación entre los electrodos.
2. Incubar 10 min a 4 °C.
3. Enfriar los electrodos del electroporador (BIO-RAD) a 4 °C.
4. Colocar la cubeta en los electrodos y dar un pulso de corriente de 1,7 kV. La duración del pulso debe estar entre 4 y 5 ms.
5. Agregar inmediatamente 1 ml de medio YEB a la cubeta. Mezclar.
6. Transferir la mezcla de reacción a un tubo de 1,5 ml e incubar 1 h a 28 °C con agitación.
7. Distribuir homogéneamente una alícuota de la transformación en placas de YEB que contengan los antibióticos adecuados.
8. Incubar las placas 2-3 días en una estufa a 28 °C.
9. Comprobar la incorporación del plásmido mediante PCR de colonias utilizando cebadores específicos.

5.5. Retrotranscripción (RT-PCR):

Esta técnica se ha utilizado para la obtención de los cDNAs de genes de interés, utilizando cebadores específicos para cada gen. El cDNA se ha sintetizado a partir de RNA total obtenido de plantas de Arabidopsis utilizando la retrotranscriptasa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT , Invitrogen).

Procedimiento:

1. Mezclar en un tubo de microcentrifuga:
 - x µl RNA (1 µg)
 - 2 µl (10 mM) de cebadores específicos

Completar con H₂O hasta un volumen de 12 µl.

Incubar 5 min a 70°C. Poner en hielo.

2. Añadir al tubo:

4 µl tampón de retrotranscripción (5x)

1.25 µl dNTPs 10mM

1 µl inhibidor de RNAsa

2 µl DTT 0.1M

1 µl M-MLV transcriptasa reversa

Incubar 1h a 42°C.

3. Inactivar la reacción incubando a 70°C durante 15 min .

4. Mantener en hielo hasta el momento de hacer la PCR, o guardar a 4°C.

A partir del 10% de la reacción de retrotranscripción se harán las amplificaciones por PCR.

5.6. Amplificación de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La amplificación de DNA se ha realizado mediante PCR, generalmente en un volumen de 50 µl en la siguiente mezcla de reacción:

DNA o cDNA	20-200 ng
Tampón PCR 10X:	5 µl
MgCl ₂ 25mM:	5 µl
dNTPs:	2,5 µl
oligonucleótido 1 (100µg/µl):	2 µl
oligonucleótido 2 (100µg/µl):	2 µl
Taq polimerasa (5U/µl):	0,5 µl

Tampón de PCR: Tris HCl 200mM pH 8.4, KCl 500mM

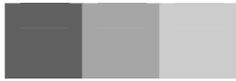
Las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores con las siguientes condiciones generales:

2 min a 94 °C / **N** ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a **Ta** y **te** a 72 °C / 10 min a 72 °C

El número de ciclos (**N**), la temperatura de apareamiento (**Ta**) y el tiempo de elongación (**te**) se ajustaron para cada reacción específica.

5.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo de los tamaños del DNA a analizar, se utilizaron distintas



concentraciones de agarosa para preparar los geles. Para fragmentos de entre 3000 pb y 800 pb se utiliza agarosa al 1%, mientras que para visualizar bandas de mayor tamaño se reduce a un 0.8% y para bandas menores se incrementa a un 1.5 %.

1. Añadir la agarosa que corresponda en tampón TBEX1 y disolver en microondas.
2. Dejar enfriar hasta 50 °C aproximadamente.
3. Agregar BrEt 0.5 µg/mL. Mezclar mediante agitación suave.
4. Verter en bandeja electroforética y dejar solidificar.
5. Las muestras de DNA se mezclan con el volumen de tampón de carga necesario para conseguir una concentración 1x.
6. La electroforesis se realiza con un voltaje entre 50-100v
7. Se visualiza y fotografía bajo luz ultravioleta (254nm).

Como marcador de peso molecular se ha utilizado el DNA del bacteriófago λ digerido con PstI o EcoRI/HindIII.

10x tampón de carga: azul de bromofenol 0.25%, cianol de xileno 0.25%, glicerol 50% en 1X TE.

1x tampón TBE: Tris 0.089 M, EDTA 0.002 M pH: 8, Ácido Bórico 0.089 M.

5.8. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se ha realizado en el Servicio de Secuenciación del CRAG, por secuenciación automática mediante el sistema Applied Biosystems de Pharmacia (*Automated Laser Fluorencence*). Las secuencias obtenidas fueron procesadas con los programas bioinformáticos disponibles en Internet, como Bioedit, ClustalW, BLAST de NCBI, Fasta y Genedoc.

5.9. Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de los fragmentos de DNA se realizó siguiendo diferentes protocolos en función de su procedencia y de la pureza final necesitada:

5.9.1. Precipitación de DNA

Procedimiento:

1. Añadir 1 volumen de fenol:cloroformo, mezclar con vortex y centrifugar 5 min a velocidad máxima. Recuperar la fase acuosa.
2. Añadir 0.1 volúmenes de AcNa 3M pH5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
3. Mezclar y dejar 2-5 min en hielo.

4. Centrifugar 10min a velocidad máxima. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 250 μ l de etanol 70%. Centrifugar 5 min a velocidad máxima y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender el DNA en 50 μ l de agua.

5.9.2. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados electroforéticamente en geles de agarosa/TBE se han purificado utilizando el Kit QUIAquick Gel Extraction (Quiagen) según las indicaciones del fabricante.

5.10. Obtención de DNA genómico de Arabidopsis

Para la obtención de DNA genómico de Arabidopsis se ha seguido el siguiente protocolo, descrito por Edwards *et al.*, 1991.

Procedimiento:

1. En el mortero, previamente enfriado con N₂ líquido, se pulveriza el material añadiendo continuamente nitrógeno para evitar que se descongele la muestra.
2. Añadir 400 μ l de tampón de extracción y mezclar con vortex.
3. Centrifugar 1 min a 13000 rpm.
4. Recuperar el sobrenadante (\pm 400 μ l) y añadir 400 μ l de isopropanol.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min
6. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
7. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 700 μ l de etanol 70%.
8. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Resuspender el pellet en 100 μ l de agua destilada. Guardar a -20°C.

Tampón de extracción: Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%.

5.11. Obtención de RNA de Arabidopsis

Para la extracción de RNA total se ha utilizado el reactivo Trizol de Invitrogen. Para evitar degradación por RNasas es necesario trabajar con guantes y material estéril. Los morteros donde machacamos el material, así como espátulas, se tratan 2 horas a 200°C. Todos los pasos de centrifugación deben realizarse a 4°C. El protocolo de extracción seguido es el indicado por el fabricante.

Procedimiento:

1. Pulverizar el material en mortero, previamente enfriado con N₂ líquido, añadiendo continuamente nitrógeno para evitar que se descongele la muestra.
2. Añadir Trizol (1 mL/ 150-200 mg del pulverizado). Mantener 5min
3. Añadir 200µl de cloroformo y agitar manualmente durante unos 15 seg.
4. Incubar 2-3min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12000 g 15 min
6. Recoger la fase acuosa y precipitar el RNA añadiendo 500 µl de isopropanol.
7. Incubar 10min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12000g 10 min
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet que contiene el RNA con EtOH al 75%.
10. Centrifugar a 7500 g 5 min
11. Dejar secar el pellet y disolver en 30 µl H₂O libre de RNasa. Para favorecer la solubilidad puede calentarse a 65°C durante 5 min.

La concentración y calidad del RNA obtenido se determina a partir de los datos de absorción de una solución del mismo (ver a continuación). La integridad del RNA se comprueba en un gel de agarosa.

5.12. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de DNA o de RNA presente en una muestra se ha cuantificado en Nano-drop (Thermo Scientific Nanodrop), determinando la absorción a una longitud de onda de 260 nm. Un valor de absorción a 260nm de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/mL de DNA de doble cadena o de 40 µg/mL de RNA. La pureza de la muestra se determina calculando la relación entre las absorbancias a 260 nm, 280 nm y 230 nm. La relación entre 260-280 nm indica la presencia de proteínas, si el valor obtenido es mayor a 1.7. La relación entre las absorbancias 260-230 nm indica la presencia de fenoles en la muestra.

5.13. Electroforesis de RNA

La separación de RNAs (15µg de RNA total) se ha realizado mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa (1%) en presencia de formaldehído (6,3%) y en tampón MEN. Las muestras de RNA se preparan añadiendo un volumen de tampón de carga 2x, se desnaturizan 15 min a 65°C y se mantienen en hielo hasta el momento de su análisis. La electroforesis se realiza en tampón MEN durante 2- 3h a 70 V.

Tampón de carga desnaturizante 2x: formamida desionizada 50%, formaldehído 6.4%, 10xMEN 10%, con azul de bromofenol para controlar la migración del RNA y BrEt 200µg/ml?.

Tampón MEN 10x: 200 mM MOPS pH 7, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA.

5.14 . Transferencia de RNA a membranas de nylon (*Northern blot*)

Después de la separación del RNA mediante electroforesis, éste se transfirió a membranas de Nylon (Amersham Biosciences) mediante capilaridad y fijó a las membranas para su posterior análisis mediante hibridación con sondas específicas marcadas radiactivamente.

Procedimiento:

1. Lavar el gel con agua a 65° (3 lavados de 5 min) con el fin de eliminar el exceso de formaldehído.
2. Equilibrar el gel en tampón de transferencia 10x SSC durante 20min
3. Fotografiar el gel bajo luz UV para tener un control de carga
4. Llenar una cubeta con 1L de tampón SSC 10X y colocar un vidrio encima.
5. Colocar dos tiras de papel Whatman 3MM sobre el vidrio de manera que entren en contacto con el tampón.
6. Colocar el gel sobre las tiras de papel y eliminar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas ayudándonos con una pipeta.
7. Poner unas tiras de film alrededor del gel, para que el gel sea lo único en contacto con la membrana.
8. Humedecer la membrana de nylon, del mismo tamaño que el gel, y colocarla encima, eliminando de nuevo las burbujas de aire de la misma manera que antes.
9. Humedecer en tampón de transferencia 2 papeles Whatman 3MM de la medida del gel, colocarlos encima y eliminar burbujas.
10. Añadir 2 papeles Whatman 3MM secos y papeles absorbentes de manera que forme una columna.
11. Colocar sobre la columna de papel un cristal y un peso no mayor de 1 Kg. para hacer presión y tener un buen contacto.
12. Se deja transferir toda la noche.
13. Al día siguiente se recoge la membrana se elimina el exceso de sales con un lavado en SSC 2x.
14. Se comprueba en UV que se ha producido la transferencia y se fija en el UV-Stratalinker 2400 (1200µJ x 100, 1min).

20X tampón SSC: citrato de sodio 300mM pH 7, NaCl 300 mM.

5.15. Marcaje radiactivo de DNA

El marcaje radiactivo de fragmentos de DNA se ha realizado mediante PCR en presencia del nucleótido deoxicitidina trifosfato marcado en posición alfa con ^{32}P , tal y como se detalla:

Tampón PCR 10X:	5 μl
dNTPs (dATP, dTTP y dGTP)10mM:	2,5 μl
oligonucleótido1 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$):	2 μl
oligonucleótido2 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$):	2 μl
Ex Taq TM Polimerase (TaKARA):	0,25 μl
α - ^{32}P -dCTP:	1 μl

Tampón de PCR: Tris HCl 200mM pH 8,4, KCl 500mM

Condiciones de la PCR: 2 min A 94°C/ 35 ciclos de 30 seg. a 94°C,30 seg. a 55°C y 40 seg. a 72°C./ 10 min a 72°C.

Los fragmentos de DNA se purificaron con las micro-columnas ProbeQuant TM G-50 (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se centrifuga una columna de purificación 1min a 3000 rpm.
2. Se coloca la columna sobre un nuevo eppendorf y se le añade la sonda.
3. Se centrifuga a 3000 rpm durante 2min y se recupera el eluyente.

5.16. Hibridación de membranas de RNA

La hibridación de las membranas de RNA se realizó siguiendo el método descrito por Church y Gilbert (1984) siguiendo el protocolo que a continuación se detalla:

1. La membrana con el RNA fijado se prehibrida a 65°C durante 1 h en agitación suave en solución de hibridación
2. Esta solución se sustituye por nueva solución de hibridación a la que se ha añadido la sonda marcada radiactivamente (previamente desnaturalizada durante 10 min a 100°C). La hibridación se realiza durante unas 18h a 65°C con agitación suave.
3. Se elimina la solución de hibridación y se añade solución de lavado. Se realizan 3 lavados a 65°C de 20min cada uno.
4. Sellar la membrana en plástico y exponer en pantalla de *Phosphorimager*. El escaneado de la pantalla con un láser rojo de doble fibra óptica (Bio-Rad GS-363 Molecular Imager System) permite recoger la imagen en el ordenador.

Solución de hibridación: tampón fosfato 125 mM pH 7.2, SDS 7%, EDTA 1mM

Solución de lavados: tampón fosfato 40 mM pH 7.2, SDS 2%, EDTA 2mM.

5.17. Reutilización de membranas

Las membranas de RNA utilizadas para el análisis de expresión de *AtCPK1* (ensayos Northern-blot) se rehibridaron con la sonda del gen de expresión constitutiva en nuestras condiciones experimentales *Actina2* (ACT2), como control de carga. Así pues, después de la hibridación y detección de RNA con la primera sonda *AtCPK1*, las membranas se deshibridaron con dos lavados secuenciales en SDS al 1% a 100 °C. La membrana queda así preparada para la nueva hibridación.

6. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Obtención de extractos proteicos de plantas

La obtención de proteínas de material vegetal se realizó siempre a partir de material congelado y pulverizado con N₂ líquido en mortero o Tissue-Lyser (Qiagen). El material vegetal procesado en este trabajo siempre fue de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en cultivo *in vitro*. Se han seguido diferentes protocolos de obtención de extractos proteicos en función del experimento realizado.

Extracción 1: Extracción de proteínas totales.

Este procedimiento se ha usado en los ensayos de captura de complejos proteicos asociados a la proteína GST-*AtCPK1* (tampón de extracción 1.1) y en los ensayos de análisis del estado de fosforilación de *AtCPK1* (tampón de extracción 1.2, este ensayo se ha realizado en presencia de iones calcio).

Procedimiento:

1. Homogenizar 200mg de material pulverizado en 750µl de tampón de extracción.
2. Centrifugar durante 20min a 15000 g a 4°C y recuperar el sobrenadante.

Tampón de extracción 1.1: TrisCl 20mM pH8, NaCl 150mM, EDTA 2.5mM, NaF 20mM, β-mercaptoetanol 10mM, NP-40 0.1%, cóctel de inhibidores (Benzamidina 2mM, E-64 2 µM, Leupeptina 42 µM, Pepstatina 1 µM, PMSF 100 µM).

Tampón de extracción 1.2: Tris HCl 50mM pH7.5, CaCl₂ 1.1mM, 9mM MgCl₂, Triton X-100 0.8%, 1:200 Inhibidor de proteasoma MG132 (C26H41N3O5, A.G.

Scientific) cóctel de inhibidores (Benzamidina 2mM, E-64 2 μ M, Leupeptina 42 μ M, Pepstatina 1 μ M, PMSF 100 μ M).

Extracción 2: Obtención de extractos proteicos enriquecidos en proteínas de membrana.

Se ha seguido el método descrito por *Romeis et al., 2001*.

Procedimiento:

1. Homogenizar 200mg de material pulverizado en 600 μ l de tampón de extracción.
2. Centrifugar 20min 4°C a 15000g.
3. Resuspender el precipitado en un volumen de tampón de elución durante 20min a 4 °C con agitación suave.
4. Centrifugar 20min a 4°C a 15000g y recuperar el sobrenadante.

Tampón de extracción: Hepes 50mM pH7.4, EDTA 5mM, EGTA 5mM, NaF 10mM, Na₃VO₄ 10mM, β -glicerolfosfato 50mM, DTT 5 mM, cóctel de inhibidores (Benzamidina 2mM, E-64 2 μ M, Leupeptina 42 μ M, Pepstatina 1 μ M, PMSF 100 μ M).

Tampón de elución: Hepes 20mM pH7.4, MgCl₂ 1mM, Triton X-100 1%, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, β -glicerolfosfato 5mM; DTT 5 mM, inhibidor de proteasoma MG132 (C26H41N3O5, A.G. Scientific dil 1:200), cóctel de inhibidores (Benzamidina 2mM, E-64 2 μ M, Leupeptina 42 μ M, Pepstatina 1 μ M, PMSF 100 μ M).

6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se ha determinado mediante el método Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color del reactivo ácido de *Comassie brilliant Blue G-250* al unirse a las proteínas, detectable mediante cambios en la absorbancia a longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína se determina por extrapolación con una recta patrón preparada con la proteína BSA (albúmina sérica bovina).

Procedimiento:

1. Las muestras se preparan en un volumen final de 1 ml, correspondientes a 800 μ l de agua y extracto proteico, y 200 μ l de reactivo Bradford 5x (BioRad)
2. La recta patrón se preparan en el mismo volumen final, añadiendo la proteína BSA hasta la concentración final deseada (normalmente 1, 2, 4, 6 y 8 μ g/mL).
3. Se determina la absorbancia de las muestras problema comparadas con el blanco a una longitud de onda de 595 nm en espectofotómetro.

4. Se calcula la recta de regresión y extrapola la concentración de las muestras problema.

6.3. Ensayos de fosforilación-defosforilación de proteínas

Estos ensayos se han realizado con extractos proteicos obtenidos con el protocolo de extracción 1, anteriormente reseñado.

Procedimiento:

1. Partimos de 50 µg de proteínas totales en tampón de extracción 1.2 (ver apartado 6.1), suplementado de la siguiente manera según el caso:
Muestra control: NaF 1mM, Na₂VO₄ 1mM, β-glicerofosfato 5mM, MgCl₂ 9mM.
Tratamiento de fosforilación: ATP 10µM, MgCl₂ 9mM.
Tratamiento de defosforilación: MnCl₂ 2mM, 20U de fosfatasa alcalina (New England Biolabs, USA).
2. Incubación a 30°C durante 1 h.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se cambia el tampón en el que se encuentran las proteínas utilizando *Desalting columns* (Biosciences), por un tampón conteniendo 7M urea, 2M tiourea, 4% (p/v) CHAPS, pH 8.5 y se realiza una electroforesis bidimensional y análisis por inmunotransferencia.

6.4. Ensayos de degradación de proteínas por el proteasoma

El análisis de degradación de la proteína AtCPK1 mediado por proteasoma se ha realizado por incubación de extractos proteicos obtenidos en presencia y ausencia del inhibidor de proteasoma MG132 (C26H41N3O5, A.G. Scientific). Los extractos proteicos totales de partida contienen inhibidores de proteasas para evitar la degradación inespecífica por proteasas celulares.

Procedimiento:

1. Partimos de 400µg de proteínas totales (extracción 1, ver apartado 6.1). Los extractos duplicados se suplementaron o no con inhibidor del proteasoma MG132 (dilución 1:200)
2. Se incuban a 30°C durante 30 min, 1 h y 2 h.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el nivel de acumulación de la proteína AtCPK1 en las diferentes muestras mediante inmunotransferencia con el suero inmune anti-AtCPK1.

6.5. Purificación de proteínas de cloroplastos

Para ello, en primer lugar se obtuvieron los cloroplastos intactos de plántulas de *Arabidopsis* siguiendo el protocolo descrito por Aronsson (Aronsson y Jarvis, 2002).

Procedimiento:

1. Preparar el gradiente de Percoll: 13ml de Percoll + 13ml tampón CIB1X + 5mg glutatión
2. Mezclar bien y centrifugar 19000rpm, 30 min y a 4°C. Mantener en hielo.
3. Homogenizar el tejido vegetal (sin congelar) en 20ml de tampón CIB1X frío con un politrón, con pulsos cortos de 2-3 seg y velocidad media. Filtrar el homogenizado obtenido a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem).
4. Centrifugar el homogenizado a 3000rpm, 5 min a 4°C.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con suavidad en 3 ml de tampón CIB1x.
6. Depositar la suspensión sobre el gradiente de Percoll. Centrifugar el gradiente con los cloroplastos a 7000rpm, 10 min a 4°C.
7. Recuperar la fracción de cloroplastos intactos
8. Para eliminar el Percoll, se lavan los cloroplastos intactos con 30 ml de tampón HMS1X. y centrifugación a 2000rpm 5 min a 4°C. Repetir este paso 1-2 veces más.
9. Resuspender los cloroplastos en 300µl de tampón HMS1x, y observar la preparación en el microscopio comparando la imagen de fluorescencia (los cloroplastos emiten fluorescencia debido a la presencia de las clorofilas) y la imagen de transmisión.
10. Una vez comprobada la pureza de la muestra, se centrifuga a 2000 rpm, 5 min a 4°C y el pellet se resuspende en tampón de lisis para la obtención de las proteínas cloroplásticas que se analizaron mediante ensayos de inmunotransferencia.

Tampón CIB1x : Sorbitol 0.3M, MgCl₂ 5mM, EGTA 5mM, EDTA 5mM, HEPES 20mM y NaHCO₃ 10mM. Ajustar pH 8.

Tampón HMS 1X: HEPES 50mM, MgSO₄ 3mM y Sorbitol 0.3M. Ajustar el pH=8.0.

6.6. Producción en *E. coli* de proteínas recombinantes por fusión a la GST

Para ello se han utilizado los siguientes plásmidos:

- pGEX4T3-*AtCPK1* para la producción de la proteína de fusión GST-*AtCPK1*
- pGEX4T1-Nterm*AtCPK1* para la producción de la proteína de fusión GST-Nterm*AtCPK1* (fusión de la GST al dominio N-terminal variable de la proteína *AtCPK1*).

La expresión de los genes fusión en estos plásmidos está dirigida por el promotor procariota *tac*, cuya expresión es inducible por IPTG. En la zona de fusión de ambos genes (gen *GST* y gen de interés) se encuentra la secuencia que codifica para el motivo de reconocimiento por proteasa trombina que permite la liberación de las proteínas de la proteína GST.

El protocolo general para la purificación de las proteínas de fusión fue adaptado para cada una de las proteínas obtenidas, ajustando la concentración del IPTG, el tiempo y la temperatura de inducción para favorecer su solubilidad. Las proteínas se han producido en la cepa de *E. coli* BL21 deficiente en proteasas para minimizar el riesgo de degradación proteolítica de las proteínas de fusión en la propia célula de *E. coli*.

Procedimiento:

1. Transformar células competentes de *E. coli* BL21 con el plásmido de interés.
2. Inocular una única colonia transformante en 5 ml de LB suplementado con carbenicilina (100 µg/mL) y dejar crecer toda la noche a 37°C y 250 rpm.
3. Diluir el cultivo 1/50 en 500 ml de LB y dejar a 37°C en agitación hasta una $DO_{600nm} = 0.6$.
4. Añadir IPTG 0.1 mM e incubar a 37°C durante 2 horas en el caso de GST-NtermAtCPK1 y a 20°C durante 16h para GST-AtCPK1.
5. Centrifugar los cultivos a 8000rpm durante 15 min, a 4°C, y eliminar los sobrenadantes. Congelar los precipitados a -20 °C.
6. Descongelar las células y resuspenderlas en 25 ml de tampón PBS suplementado con inhibidores de proteasas. Este paso y todos los que siguen a continuación deben realizarse a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.
7. Añadir lisozima a una concentración final de 1mg/ ml e incubar 1 hora a 4°C.
8. Sonicar manteniendo la muestra en hielo (35W, 3 pulsos de 30 seg) y seguidamente centrifugar a 8000 rpm, 4°C, durante 45 min . Recuperar el sobrenadante.
9. Purificar la proteína recombinante fusión a la GST mediante cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante. Para ello se prepara una columna con la matriz de sefarosa-glutati6n (Amersham Biosciences) equilibrada en PBS, en la proporci6n de 1ml por litro de cultivo. Pasar el sobrenadante obtenido en la etapa 8 a trav6s de la columna, dej6ndolo fluir por gravedad.
10. Lavar columna con PBS suplementado con NaCl 0.7 M (3 veces con 5 ml)
11. Lavar la columna con PBS (3 veces con 5 ml)
12. Eluir la prote6na con una soluci6n 10 mM de glutati6n en TrisHCl 50 mM pH 8, en fracciones de 0.5ml

13. Determinar la concentración de proteína en las distintas fracciones mediante absorbancia a 280 nm.
14. Una vez purificadas las proteínas fusión se digieren con trombina para liberar la proteína de interés de la GST. Para ello se añadió un volumen de tampón de digestión (Tris 20 mM pH8; NaCl 100 mM; CaCl₂ 2.5 mM) y 10U de trombina por mg de proteína de fusión.
15. Se incuba toda la noche a 20°C.
16. El extracto se somete a cromatografía de afinidad en una matriz de sefarosa-glutatinación para la retención de la proteína GST y elución de la proteína de interés.
17. La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford (1976) y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

PBS: Na₂PO₄·H₂O 1.6 mM, NaHPO₄·2H₂O 8.4 mM, NaCl 150 mM. Ajustar a pH 7,4.

6.7. Purificación de proteínas marcadas con el epítipo de histidinas en *E. coli*

En este trabajo también se han producido en *E. coli* proteínas de fusión a las que se le ha fusionado en C-terminal un epítipo de 6xHis que permite la purificación por afinidad a columnas de níquel.

Los plásmidos de expresión en *E. coli* utilizados son:

- pET28a-APX3 para la producción de la proteína de Arabidopsis APX3 (ascorbato peroxidasa 3)
- pET28a-AtCPK1-GST-His para la producción de la proteína de fusión en C-terminal de la GST a AtCPK1.
- pET14-N-termAtCPK2 para la producción del dominio N-terminal variable de AtCPK2.

Las proteínas de fusión fueron producidas en la cepa de *E. coli* BL21. El protocolo utilizado es el mismo que se ha descrito para la producción de proteínas fusionadas a la GST con la única diferencia de que la inducción se realizó con de IPTG 0.1 mM durante 4h y a 28°C.

La purificación de las proteínas de fusión se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Depositar la matriz His-Bind (Novagen) en la columna (1ml resina/ litro de cultivo) evitando que la matriz se seque en ningún momento a lo largo de todo el proceso.

2. Lavar la matriz con 3 volúmenes de H₂O.
3. Activar la matriz con 5 volúmenes de tampón de carga.
4. Equilibrar la matriz con 3 volúmenes de tampón de unión.
5. Añadir el extracto proteico.
6. Lavar la matriz 3 veces con 10 volúmenes de tampón de unión suplementado con Imidazol 20mM.
7. Eluir la proteína recombinante unida a la columna con tampón de unión suplementado con imidazol a concentraciones crecientes (40-300 mM) en fracciones de 0.5 ml.
8. Determinar la concentración de proteínas en las distintas fracciones por absorbancia a 260 nm.

Tampón de carga: NiSO₄ 50 mM.

Tampón de unión 8x: NaCl 4M, Tris-HCl 160 mM pH 7.8.

6.8. Obtención de anticuerpos policlonales

Se han preparado anticuerpos policlonales para proteínas producidas en *E. coli.*, bien el fragmento N-terminal de AtCPK1, bien la proteína APX3-His.

Procedimiento:

1. Se utilizaron 200 µg de cada una de las proteínas purificadas (100 µg de proteína desnaturalizada +100 µg de proteína nativa) en un volumen final de PBS de 500 µl.
2. Se añadieron 500 µl de adyuvante de Freund completo para potenciar la inmunización. Las muestras se agitaron fuertemente hasta la formación de una emulsión.
3. La mezcla se inyectó por vía subcutánea en alícuotas de 100 µl. La inmunización se repitió 3 veces más (esta vez con el adyuvante de Freund incompleto), con intervalos de 15 días entre cada inmunización.
4. Dos meses después de la primera inmunización se realizó el sangrado del conejo.
5. La sangre se incubó 1h a 37 °C para su coagulación y posteriormente se centrifugó a 4000rpm durante 5 min a 4°C.
6. El sobrenadante se recuperó y se usó como el suero inmune tras su titulación en ensayos *dot-blot* con proteínas fijadas a membrana.

6.9. Captura de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Los ensayos se han realizado utilizando como cebo la proteína recombinante GST-AtCPK1. Las proteínas AtCPK1-GST y GST se producen en *E. coli* tal y como se ha indicado en el apartado 6.6.

Procedimiento:

1. Dializar las proteínas purificadas (9mg) frente a tampón de unión toda la noche a 4°C.
2. Preparar la matriz de Sefarosa 4B activada con BrCN (CNBr-activated Sepharose 4B Amersham), lavándola con una solución HCl 1 mM (1:50) y equilibrándola posteriormente en tampón de unión (1:2).
3. Unir las proteínas dializadas a la matriz mediante incubación durante 2 h a temperatura ambiente con ligera agitación (2 mg de proteínas por 1ml de matriz)
4. Bloquear la unión a la matriz mediante lavados secuenciales en tampón ácido y básico (lavados en 5 ml de tampón). Repetir el proceso 3 veces.
5. Activar la proteína recombinante GST-AtCPK1 unida a la matriz por incubación con una solución CaCl₂ (1.1mM) durante 30min
6. Preparar el extracto de proteínas (tampón de extracción 1.1, descrito en el apartado 6.1). Los complejos proteicos se fijaron con formaldehído 1% durante 10min y posteriormente se dializaron frente a PBS1X durante 2h a 4°C. .
7. Incubar las proteínas (2 mg) con la proteína GST-AtCPK1 o GST inmovilizada en la matriz de sepharosa (2:1) toda la noche a 4°C en un agitador orbital.
8. Lavar la columna para eliminar las uniones inespecíficas con tampón de unión.
9. Eluir las proteínas que interaccionan con GST-AtCPK1 o GST con tampón de elución (50µl)
10. Las proteínas eluidas se analizaron en geles SDS-PAGE.
11. Visualizar las proteínas mediante tinción de plata o analizarlas en ensayos de inmunotransferencia.

Tampón de unión: NaHCO₃ 0.1mM pH8.3, NaCl 0.5M.

Tampón ácido: Tampón acetato sodio 0.1M pH 4, NaCl 0.5M.

Tampón básico: Tris HCl 0.1M pH 8, NaCl 0.5M.

Tampón de elución: glicina 0.2M pH 2.8.

6.10. Purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad

Mediante este ensayo se han inmunopurificado los complejos proteicos en los que participa la proteína AtCPK1, utilizando anticuerpos policlonales generados frente al

dominio N-terminal de la proteína AtCPK1. Se muestra un esquema del procedimiento seguido en la figura M1.

Procedimiento:

1. Partimos de 10mg de extractos proteicos vegetales (Extracción 2, ver apartado 6.1)
2. Fijar los complejos proteicos con formaldehído (1%) durante 10min a 4°C.
3. Detener la fijación dializando los extractos frente a PBS durante 2h a 4°C.
4. Unir los anticuerpos anti-AtCPK1 (1ml de suero inmune) a una matriz de sepharosa 4B activada con BrCN previamente equilibrada en tampón de unión en un relación de 2:1 matriz/suero. Incubar durante 2 h en agitación a 4°C.
5. En paralelo, preparar otra matriz en la que se inmoviliza el suero preinmune. Se procede igual que con el suero inmune.
6. Bloquear las uniones a la sepharosa de forma covalente, mediante lavados secuenciales en tampón ácido y básico, en volumen de 5ml. Repetir el proceso 3 veces.
7. Lavar las matrices de sepharosa con PBS1X, 2 lavados de 10ml.
8. Incubar el extracto proteico con el suero preinmune inmovilizado en la matriz de sepharosa 4B, para eliminar los complejos que interaccionan inespecíficamente con el suero, durante 4h a 4°C en agitación orbital.
9. Los complejos no retenidos con el suero preinmune, se incuban con el suero inmune inmovilizado a la matriz de sepharosa 4B, durante 16h a 4°C con agitación orbital.
10. Eliminar los complejos no unidos, dejando sedimentar la matriz y retirando el sobrenadante.
11. Lavar la matriz con tampón PBS (4 lavados de 5ml).
12. Eluir los complejos proteicos retenidos por el suero inmune con tampón 7M urea: 2M tiourea, en un volumen final de 100µl.
13. Analizar el perfil de inmunoprecipación en electroforesis bidimensional.

Tampón de unión: NaHCO₃ 0.1mM pH8.3, NaCl 0.5M.

Tampón ácido: Tampón Acetato sódico 0.1M pH 4, NaCl 0.5M.

Tampón básico: Tris HCl 0.1M pH 8; NaCl 0.5M.

El rendimiento de la cromatografía de inmunoafinidad se determinó por comparación con el máximo teórico calculado (Subramanian, 2002). La eficiencia máxima teórica de unión del antígeno (Ag) al anticuerpo inmovilizado (Ab),



suponiendo una estequiometría 2:1 antígeno-anticuerpo se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Máxima teórica la unión de antígeno} = M \times V \times \left(\frac{MW \text{ Ag}}{MW \text{ Ab}} \right) \times \left(\frac{2}{1} \right) \times 100 \\ = 0.435 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$M \text{ (mg anticuerpo inmovilizado)} = 0.012 \text{mg}$$

$$MW \text{ Ab (peso molecular de Anti-AtCPK1)} = 150.000 \text{ Daltons}$$

$$MW \text{ Ag (peso molecular de AtCPK1)} = 68000 \text{ Daltons}$$

$$V \text{ (ml de matriz de sefarosa-4B)} = 0.4 \text{ml}$$

El rendimiento de la cromatografía de inmunoafinidad de AtCPK1 fue el siguiente:

$$\left[\frac{\text{Cantidad total de AtCPK1 eluída}}{\text{Máxima teórica la unión de antígeno}} \right] \times 100 = \\ \left[\frac{0.102}{0.435} \right] \times 100 = 23,4\%$$

Así se calculó que con un rendimiento del 23,4% en la cromatografía de inmunoafinidad se purificaron 5µg de proteína AtCPK1 (0.1 µg/µl) en un volumen final de 50 µl.

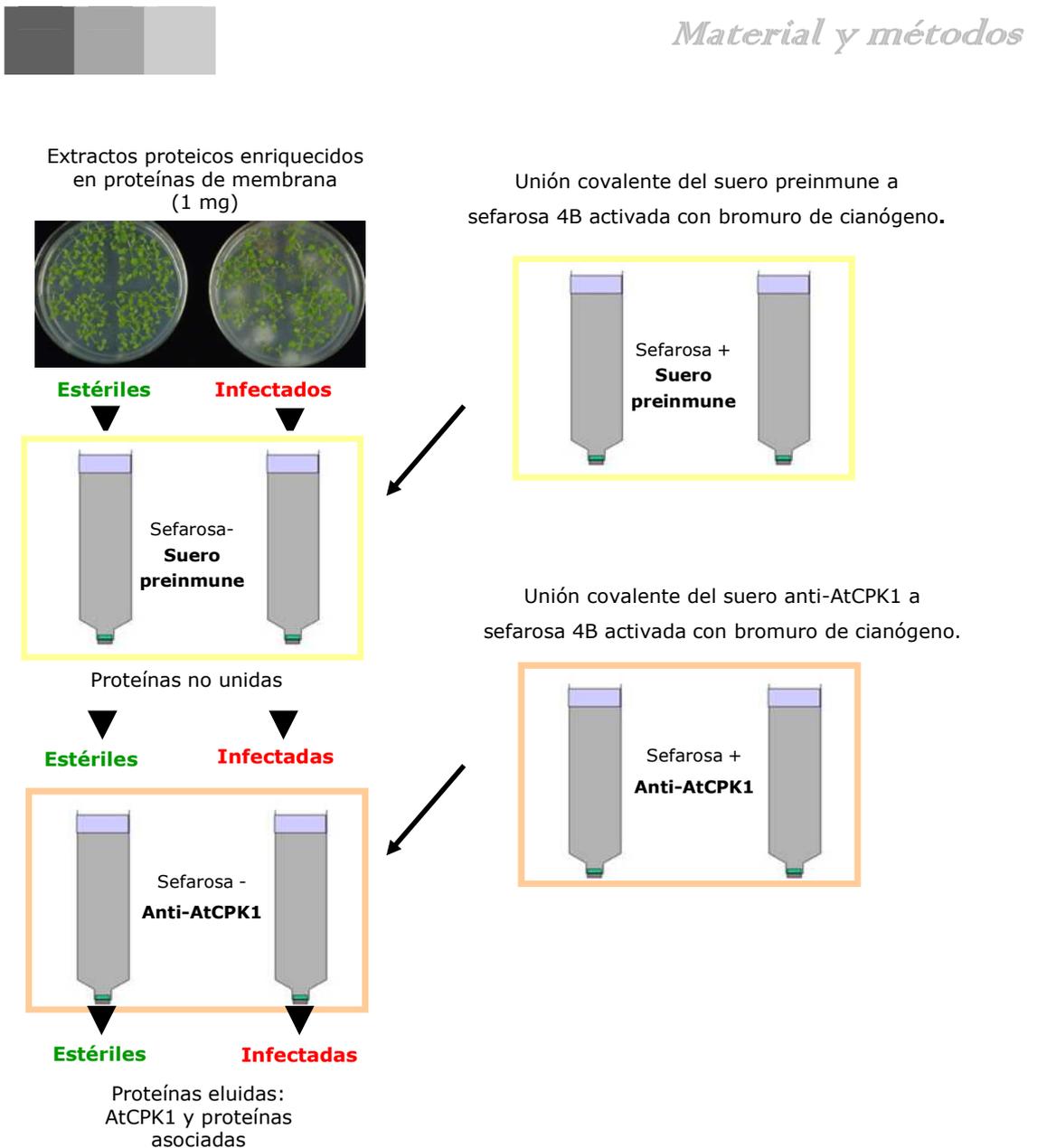


Figura M1. Esquema del proceso seguido para la purificación de complejos en los que se encuentra AtCPK1 mediante cromatografía de inmunoafinidad. Preparación de la matriz de sefarosa-4B a la que se ha unido covalentemente el suero preinmune o el suero anti-AtCPK1. Se partió de extractos proteicos (1 mg) enriquecidos en proteínas de membrana obtenidos a partir de plántulas de *Arabidopsis* (15 días) infectadas con *F. oxysporum* (24h) o controles no infectadas. Los extractos proteicos se someten a cromatografía en columnas de sefarosa-4B a las que se ha unido covalentemente el suero preinmune. Las proteínas no unidas al suero preinmune se someten a una nueva cromatografía de sefarosa-4B-anti-AtCPK1, donde quedan retenidas por afinidad la proteína AtCPK1 y las proteínas asociadas a ella. Posteriormente, se eluyen las proteínas retenidas en la columna de inmunoafinidad y se analizan mediante electroforesis y tinción con plata.

6.11. Análisis del efecto de la presencia de iones calcio en la interacción de AtCPK1 con otras proteínas.

Estos ensayos se realizaron para analizar posibles cambios en el perfil de complejos proteicos asociados a AtCPK1 regulados por calcio. Para ello mediante cromatografía de inmunoafinidad con los anticuerpos específicos frente AtCPK1 se purificaron los complejos proteicos a partir de extractos de plantas suplementados o no con iones calcio a una concentración de $1\mu\text{M}$. A esta concentración de calcio se ha descrito la activación de proteínas CPKs (Christodoulou *et al.*, 2004).

Procedimiento:

1. Se parte de $50\mu\text{g}$ de extractos proteicos vegetales (Extracción 1, ver apartado 6.1).
2. Añadir CaCl_2 a una concentración $1\mu\text{M}$ e incubar durante 2h a 4°C en agitación suave. En paralelo, se procesa una muestra control sin suplementar con iones calcio.
3. Fijar los complejos proteicos con formaldehído al 1% durante 10 min a 4°C .
4. Eliminar el formaldehído por diálisis de las muestras frente a PBS durante 2h a 4°C .
5. Realizar la inmunopurificación de los complejos proteicos a partir de estas muestras en condiciones iguales a las descritas en el apartado anterior.
6. Análisis de los complejos proteicos inmunopurificados mediante electroforesis bidimensional.

6.12 . Purificación de complejos proteicos mediante el sistema TAP.

Las líneas transgénicas utilizadas para la purificación de los complejos proteicos se generaron según se describe en el apartado 7 de Material y métodos.

El protocolo seguido se basa en el descrito por Rubio *et al.*, 2005, con ligeras modificaciones.

Procedimiento:

1. Crecer las plantas transgénicas que acumulan la proteína de fusión AtCPK1-cTAPa en condiciones estériles en medio MS sin sacarosa suplementado con el antibiótico gentamicina (el ensayo se realizó con líneas heterocigóticas). Las plantas se crecieron durante 5 días.
2. Las proteínas se fijaron por infiltración con vacío de una solución de formaldehído al 1% en PBS durante 30 min
3. Detener la fijación incubando el material vegetal en una solución 300 mM de glicina durante 20 min

4. Recoger el material vegetal, congelarlo con N₂ líquido y guardarlo a -80 °C hasta el momento de su utilización.
5. Homogeneizar la muestra con un homogeneizador cónico (Rubilador). Evitar el calentamiento de la muestra.
6. Añadir 3 volúmenes de tampón de extracción de proteínas (tampón 2, apartado 6.1) por unidad de peso de la muestra y agitar a 4 ° C durante 15 min
7. Realizar la extracción de proteínas enriquecidas en proteínas de membrana (apartado 6.1).
8. Dializar los extractos proteicos frente a tampón WB durante 4h a 4°C.
9. Incubar los extractos proteicos con resina IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) en una proporción 1:10 a 4°C. Las proteínas AtCPK1-cTAPa quedan retenidas a las IgG inmovilizadas en la matriz a través del motivo 2xIgGBD situado en la parte más distal de la proteína de fusión.
10. Sedimentar la matriz mediante centrifugado suave a 200g durante 50seg. Eliminar las proteínas no retenidas (contenidas en el sobrenadante).
11. Lavar 5 veces con tampón WB y 1 vez con CB.
12. Incubar con proteasa 3C (100unidades/10mg de extractos proteicos en 5ml de tampón CB, toda la noche a 4°C). La proteasa 3C corta la proteína de fusión AtCPK1-cTAPa entre el motivo de 6xHis y el dominio 2XIgBD. La digestión con esta proteasa resulta en la liberación de la proteína AtCPK1-cTAPa y complejos asociados de la matriz de IgG-sefariosa.
13. Los complejos eluidos tras la incubación con la proteasa 3C se incubaron con una resina His-Bind (Novagen), previamente activada, en una proporción 1:5. Los complejos quedan retenidos en la resina a través del motivo de 6xHis de la proteína de fusión.
14. Lavar con 30ml de tampón WB.
15. Eliminar las proteínas no retenidas una vez que se deja sedimentar la matriz, centrifugando 50seg a 200g.
16. Eluir los complejos con un 1ml de una solución EB. Recuperar los complejos proteicos y dializarlos frente a PBS1X.
17. Precipitar los complejos proteicos en 75% acetona y 15% TCA. Incubar 1h en hielo y centrifugar 30min a 16000rpm.
18. Lavar el pellet obtenido con acetona fría y dejar secar.
19. Resuspender el pellet en TMX2 suplementado con DTT 0.2M.
20. Romper los enlaces covalentes formados entre los complejos proteicos durante la fijación con formaldehído incubando las muestras a 95°C durante 20 min

21. Separar las proteínas purificadas en geles SDS-PAGE de 18 cm al 10% de acrilamida/bisacrilamida.
22. Teñir los geles de proteínas con nitrato de plata.
23. La identificación de las proteínas así obtenidas se realizó por espectrometría de masas (HPLC-masas) (ver apartado 6.23)

Tampón WB: Tris-HCl pH 7.5 50 mM, Glicerol 10 %, NaCl 150mM, NP-40 0.1%.

Tampón CB: Tris-HCl pH 7.5 50 mM, Glicerol 10 %, NaCl 150mM, NP-40 0.1%, DTT 1mM.

Tampón EB: Tris-HCl pH 7.5 50 mM, Glicerol 10 %, NaCl 150mM, NP-40 0.1%, Imidazol 0.05M.

Tampón TMx2: Tris-HCl pH 6,8 125 mM, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0,04%.

6.13. Ensayos *Pull-down* para la validación de interacciones proteína-proteína.

Estos ensayos se han usado para analizar la interacción *in vitro* de proteínas. En concreto, se ha analizado la interacción de las proteínas de fusión GST-NtermAtCPK1, AtCPK1-GST-His y GST (usada como control) con las proteínas APX3, Zm14.3.3, Nitrilasa 1, Nitrilasa 2, Nitrilasa 3, Catalasa 2, Catalasa 3, ATPasa alfa o ATPasa beta, previamente marcadas con ³⁵S utilizando el sistema de traducción y transcripción *in vitro* de proteínas.

6.14. Transcripción y traducción *in vitro* (TnT) de proteínas.

Las proteínas se sintetizaron y marcaron con ³⁵S utilizando un kit comercial de transcripción y traducción *in vitro* (TnTR Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega), en presencia de ³⁵S-Metionina. Los cDNAs codificantes de las proteínas a sintetizar se clonaron en los vectores pCRII (Invitrogen) o pET28 (Novagen), bajo el control del promotor de la T7RNA polimerasa. Antes de la síntesis, los plásmidos portadores de los cDNAs se linealizaron por digestión con una enzima de restricción cuya diana de corte se encontraba después del codón de parada y no estaba presente en la secuencia de los cDNAs codificantes. La síntesis de las proteínas se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante durante 90 min a 30°C en la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Lisado de reticulocitos de conejo	25µl
Tampón	5 µl
T7/RNA polimerasa	1µl
Mezcla de aminoácidos sin met	1µl
Inhibidor de RNAsas	1µl
DNA(0.5µg/µl)	x µl
Met(³⁵ S)	2µl
VOL. FINAL	50µl

6.15. Ensayos *Pull down*

Procedimiento:

1. Unir las proteínas de fusión a la GST a una matriz de sefarosa 4B.
2. Colocar en un tubo de 0.5 ml las proteínas de fusión a la GST (1-5 µg) inmobilizadas en la matriz de sefarosa en un volumen final de 90 µl.
3. Dejar sedimentar la resina y descartar el sobrenadante.
4. Añadir 180 µl de tampón de unión conteniendo CaCl₂ 1.1mM. Incubar durante 1h a 4°C, con rotación suave
5. Dejar sedimentar la resina en hielo y descartar el sobrenadante.
6. Añadir el producto de la reacción de TnT e incubar a 4°C, o/n con rotación.
7. Pasar a un tubo de 1.5 ml y dejar sedimentar en hielo.
8. Retirar el sobrenadante, que se correrá en un gel con el fin de comprobar la presencia de la proteína marcada con ³⁵S en el sobrenadante, y lavar con 1ml de tampón RIPA.
9. Mezclar bien y dejar sedimentar en hielo.
10. Retirar el sobrenadante, y repetir los lavados de 6-8 veces.
11. Añadir 20 µl de TM2x+β-mercaptoetanol (5%) y calentar a 95°C durante 5min
12. Cargar en un gel de proteínas SDS-PAGE
13. Teñir el gel de proteínas con azul de Comassie y desteñir.
14. Secar el gel al vacío durante 1h y exponer en *Phosphorimager*.

Tampón de unión: HEPES-KOH 20mM pH 7.9, KCl 50mM, MgCl₂ 2.5mM, glicerol 10%, DTT 1mM, Nonidet P40 0.2%, PMSF 100µM.

Tampón RIPA: Tris-HCl 100mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Nonidet P40 0.2%.

Tampón TMx2: Tris-HCl 125 mM pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.04%

6.16. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS se ha realizado en aparatos de Mini-protean-II (Biorad), utilizando diferentes porcentajes de acrilamida según el tamaño de la proteína/s a analizar. La composición de los geles se detalla a continuación:

Tampón del gel separador: Tris-HCL 1.5M H 8.8, SDS 0.4%.

Tampón del gel concentrador: Tris-HCL 0.5M pH 6.8, SDS 0.4%.

Tampón de electroforesis 10x: glicina 19.2M, Tris-HCL 2.5M pH 8.7, SDS 10 %.

7,50%	Gel separador(10ml)	Gel concentrador(2ml)
Acrilamida:bisacrilamida (30:0.8)(ml)	1,88	0,5
Tampón gel concentrador(ml)	2,5	
Tampón gel separador(ml)		1
H2O(ml)	5,63	2,25
APS15%(p/v)(μ l)	40	40
Temed (μ l)	5	10

10,00%	Gel separador(10ml)	Gel concentrador(2ml)
Acrilamida:bisacrilamida (30:0.8)(ml)	2,5	0,5
Tampón gel concentrador(ml)	2,5	
Tampón gel separador(ml)		1
H2O(ml)	5	2,25
APS15%(p/v)(μ l)	40	40
Temed (μ l)	5	10

12,50%	Gel separador(10ml)	Gel concentrador(2ml)
Acrilamida:bisacrilamida (30:0.8)(ml)	3,13	0,5
Tampón gel concentrador(ml)	2,5	
Tampón gel separador(ml)		1
H2O(ml)	3,38	2,25
APS15%(p/v)(μ l)	40	40
Temed (μ l)	5	10

Preparación de muestras:

1. Añadir el mismo volumen que el de muestra de tampón de carga (TMx2).
2. Añadir DTT a concentración final de 1 mM
3. Desnaturalizar las proteínas incubándolas 5 min a 95 ° C.

Tampón TMx2: Tris-HCL pH 6,8 125 mM, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0,04%

Condiciones para la separación electroforética de proteínas:

Voltaje: 80 mV durante 30 min y 90 mV el resto.

Tampón de electroforesis: Glicina 1,92 M, Tris-HCl 0,25 M pH 8,5, SDS 10%

Una vez separadas se tiñen o transfieren a membranas de nitrocelulosa según proceda.

6.17. Electroforesis bidimensional

Esta técnica permite la separación de proteínas según su punto isoeléctrico pI (1ª dimensión) y su peso molecular (2ª dimensión). Para la primera dimensión se han utilizado geles comerciales *Dry-Strips* (Amersham) de 7cm ó 18cm, con un rango de pH 3 a 11 creado con anfólinas utilizando el sistema Ettan IPGPhor de Amersham Pharmacia. La segunda dimensión consiste en una separación de las proteínas por peso molecular en gel de SDS-PAGE.

Procedimiento:

Primera dimensión:

1. Se parte de una cantidad de proteínas diferente en función del tamaño de las tiras de gradiente de pH inmovilizado de la primera dimensión de 7cm ó 18cm (50µg o 150µg, respectivamente).
2. Añadir el tampón de rehidratación (volumen final de muestra 125µl ó 350 µl, según sean tiras de 7 cm ó 18 cm, respectivamente)
3. Depositar el extracto proteico en el contenedor y colocar la tira (*Dry-Strip*)
4. Cubrir con aceite (*paraffin oil*) para evitar la evaporación de la muestra y la cristalización de la urea:tiourea y tapar.
5. Aplicar el programa de separación de proteínas.

Pasos	tiempo	voltaje
Rehidratacion	6 h	0 v
Paso 1	6 h	30 v en un solo paso
Paso 2	1.5 h	500 v en un solo paso
Paso 3	1.5 h	1000 v en un solo paso
Paso 4	7 h	5000 v en un solo paso

6. Cuando finaliza el programa, congelar las tiras a – 80 °C, hasta que se vaya a realizar la segunda dimensión (mínimo 1 hora).

Tampón de rehidratación: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, IPG Tampón0.5% (Amersham), Destricke 1.6% (Amersham), azul de Bromofenol 0.02%.

Segunda dimensión:

1. Equilibrar las tiras en tampón de equilibrado suplementado con 10 mg/mL DTT durante 15 min, con agitación y a TA.
2. Incubar otros 15 min en las mismas condiciones con tampón de equilibrado suplementado con 25 mg/mL Iodoacetamida.
3. Lavar con H₂O destilada
4. Una vez equilibradas las tiras, se montan en geles SDS-PAGE al 12% y se sellan con agarosa al 1% (disuelta en tampón de electroforesis).

Electroforesis siguiendo el programa:

Programa	Tiempo	Potencia
P1	30 min	2,5W por gel
P2	6h	20W por gel

Tampón de equilibrado: Tris-HCl 50mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (v/v), azul de bromofenol.

6.18. Transferencia de proteínas

En el transcurso de este trabajo se han utilizado dos sistemas diferentes para transferir las proteínas resueltas en geles de SDS-PAGE en membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-C, Amersham). Los protocolos detallados se describen en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan *et al.*, 2004).

- Transferencia horizontal mediante el sistema SemiDry (BioRad). Es un sistema rápido y sencillo aunque la eficiencia de transferencia es baja para proteínas de alto peso molecular. Las condiciones de trabajo empleadas han sido 12 V durante 40 min en el siguiente tampón.
- Transferencia vertical en fase líquida (BioRad). Es un sistema de duración más larga pero que permite conseguir una mayor eficiencia de transferencia. Resulta muy útil para proteínas alto peso molecular o poco abundantes. En este caso las condiciones de trabajo han sido de 350 mA durante 1h o bien 90 mA 16h a 4 ° C en el tampón de transferencia que se detalla a continuación. Es necesario refrigerar la cubeta para evitar el calentamiento.

Tampón de transferencia: Tris Base 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%, SDS 10%. No es necesario ajustar pH (cercano a pH 9).

Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau para visualizar las proteínas, lo que permite verificar la presencia y cantidad de proteínas en las membranas.

Protocolo de tinción de proteínas en membranas con rojo Ponceau.

1. Incubar las membranas en una solución de rojo Ponceau 0,1% en ácido acético al 1% durante 5 min
2. Lavar y fijar las proteínas a la membrana incubando con una solución de metanol 30% y ácido acético 10%, hasta que el fondo quede blanco.
3. Incubar las membranas en PBS para desteñir.

6.19. Inmunodetección de proteínas fijadas a la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos

Una vez se han transferido las proteínas a la membrana se procede a la inmunodetección con anticuerpos específicos. La dilución del anticuerpo a utilizar es específica para cada anticuerpo.

1. Se incuba la membrana en solución bloqueante 10% de leche desnatada Molico en PBST durante 1h a temperatura ambiente con agitación suave.
2. Se cambia la solución bloqueante, por la solución de hibridación (tampón PBST con 3% de leche) con el anticuerpo primario específico. Se puede incubar 2-4 h a temperatura ambiente, pero la eficiencia es mejor si se realiza toda la noche a 4°C.
3. Lavar 3 x 10 min con tampón PBST
4. Incubar la membrana 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado en tampón PBST.
5. Lavar 3 x 10min con tampón PBST
6. Revelado quimioluminiscente. Todos los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo estaban conjugados a la peroxidasa de rábano, que permite un revelado quimioluminiscente. El revelado se realizó utilizando el Kit comercial SuperSignal West Femto (Pierce) o el kit ECL™ Western Blotting (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.20. Tinción de proteínas en geles SDS-PAGE con azul de Coomassie

Esta tinción se ha utilizado rutinariamente para analizar patrones proteicos en geles SDS-PAGE. Su límite de detección es de 0.1-0.2 µg de proteína.

1. Fijar las proteínas con una solución de azul Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) al 0,05% en metanol 50% y ácido acético 10%, durante 15min

2. Hacer lavados sucesivos con una solución de metanol 30% y ácido acético 10%.
3. Cuando el fondo esté desteñado, hacer dos lavados con H₂O

6.21. Tinción de proteínas con nitrato de plata

La tinción de proteínas con nitrato de plata presenta un límite de detección inferior al del azul Coomassie pudiendo detectar hasta 5-10 ng de proteína. El protocolo que hemos usado permite además el posterior análisis de las bandas por espectrometría de masas. Para obtener una tinción nítida es especialmente importante preparar todas las soluciones en H₂O milli-Q y utilizar exclusivamente recipientes de vidrio.

Procedimiento:

1. Fijar las proteínas en una solución de etanol 40% y ácido acético 10% durante 30 min
2. Sensibilizar el gel durante 30 min en la siguiente solución:
Etanol 30%, Na₂S₂O₃ 0.2%, acetato sódico 6.8%.
3. Lavar el gel 3 veces durante 5 min con H₂O milli-Q
4. Incubar durante 20 min con AgNO₃ (2.5 g / L).
5. Lavar el gel 2 veces durante 5 min con H₂O milli-Q.
6. Revelar hasta que aparezcan las bandas de proteína (2-5 min) con una solución de Na₂CO₃ 2.5% y formaldehído 0.01%.
7. Detener la reacción incubando 10 min con Na₂-EDTA (14.6 g / L).
8. Lavar el gel 2 veces durante 5 min con H₂O milli-Q.
9. Guardar el gel en H₂O milli-Q.

6.22. Análisis de imágenes e identificación de proteínas.

Los geles bidimensionales teñidos fueron digitalizados. A continuación las imágenes se analizaron usando el programa Image Master Platinum 5.0 de Amersham Bioscience. El programa identifica los *spots* considerando tres parámetros (*smooth*, *area*, *saliency*). En nuestro caso se establecieron unos parámetros muy restrictivos para evitar confundir *spots* correspondientes a proteínas con artefactos de tinción o señales de fondo. El programa normaliza las imágenes en función de los parámetros establecidos y detecta automáticamente cada *spot* al que se asigna una cruz. Una vez identificados los *spots* por el programa, se realiza un análisis visual de las imágenes. Se asignan manualmente las coordenadas de las imágenes tomando como referencia *spots* correspondientes a proteínas de referencia claramente visibles en todas las réplicas experimentales. Tras este tratamiento de las imágenes, se hace la comparación de las réplicas experimentales considerando

un índice de similitud bueno a partir del 60%. Seguidamente, el programa realiza un análisis estadístico para cada una de las proteínas, teniendo en cuenta la intensidad, el volumen y el área del *spot*. Finalmente el programa establece un listado de las proteínas que se acumulan diferencialmente, que no varían o que están ausentes entre las réplicas experimentales.

Una vez determinadas las proteínas de interés se procede a recortar las *spots* de los geles para la identificación de las correspondientes proteínas por espectrometría de masas. Las proteínas se recortan con una cuchilla de bisturí y se colocan en tubos con 0.1 ml de agua milliQ y se almacenan a 4°C hasta su secuenciación.

6.23. Secuenciación peptídica de proteínas

Los spots recortados de los geles bidimensionales de proteínas se secuenciaron en el servicio de proteómica de la Universidad de Barcelona

Procedimiento:

1. Reducir las proteínas a secuenciar con 10 mM DTT a 56°C durante 45 min
2. Añadir iodoacetamida (55 mM) e incubar durante 30min a temperatura ambiente y en oscuridad.
3. Digerir las proteínas con tripsina (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C, durante toda la noche.
4. Una vez digeridos, añadir acetonitrilo 50% / ácido trifluoroacético 0.1% (ACN/TFA) y liofilizar.
5. Resuspender los pépticos así obtenidos en 10µl Metanol/H₂O (1:2), TFA 0.5%. Utilizar 0.5µl para el análisis MALDI-TOF MS.
6. En algunos casos, la concentración de proteínas de partida era muy baja por limitaciones técnicas. Así que se procedió a concentrar las muestras con columnas C18-symmetry (7,8 x 100 mm, 5 µm, 100 Å, Waters)
7. Preparar las columnas manualmente con puntas de pipetas P20 rellenas con membrana C-18. Equilibrarlas con 25 µl de ACN y 25 µl de TFA 0.1%. Una vez equilibradas, pasar las muestras a través de las columnas y eluir en 5 µl de matriz de glicina con ácido α-Cyano-4-hydroxy-cinámico (CHCA, Promega). Depositarlos en una placa MALDI.
8. Calibrar el aparato Analyser 4700 (Applied Biosystems), utilizando una mezcla de péptidos estándar.

El análisis MS/MS proporciona un patrón de fragmentos peptídicos que se compara con las bases de datos utilizando el software *Protein Prospector* v 3.4.1 (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) y el MASCOT (Matrix Science Inc).

Estos programas permiten la identificación de las proteínas asociadas a los patrones MS/MS obtenidos.

7. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS

Transformación de plantas de Arabidopsis

En este trabajo se han transformado plantas de *A. thaliana* del ecotipo Col2 mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El método de transformación utilizado es el descrito por Clough y Bent (1998) que se basa en la infiltración de flores en un estadio de preantesis (antes de que se autopolinicen) con un cultivo de *A. tumefaciens*. Parte de las semillas (T1) producidas por las plantas transformadas (T0) habrán incorporado el T-DNA transferido por *Agrobacterium* y se podrán seleccionar por la resistencia al antibiótico conferida por el gen de selección del T-DNA. Posteriormente, se deja que las plantas de la generación T1 (heterocigóticas) se autopolinicen. Las plantas de la generación T2 homocigóticas se caracterizan para la segregación de la resistencia al antibiótico en la generación T3. Así, el cultivo y la segregación en medio selectivo de las plantas resistentes al antibiótico permite obtener, al cabo de dos o tres generaciones, líneas transgénicas estables y homocigóticas para el transgén.

Procedimiento:

1. Sembrar las plantas de Arabidopsis en macetas cubiertas con una reja metálica. Se siembran unas 8-10 semillas por tiesto, densidad que permite un buen crecimiento de las plantas.
2. Cuando las plantas han desarrollado inflorescencias de 5-7 cm (aproximadamente a las 6 semanas de haber sido sembradas), cortar las inflorescencias a nivel de la roseta. Después de 9-10 días, las nuevas inflorescencias están en un estadio óptimo para transformar.
3. Dos días antes de la transformación, inocular 2 mL de medio YEB con los antibióticos adecuados para la cepa de *Agrobacterium* portadora de la construcción a transformar. Incubar toda la noche a 28°C en agitación.
4. Inocular un cultivo de 1 L de medio YEB con los antibióticos adecuados y 1 mL del precultivo. Incubar toda la noche a 28°C en agitación.
5. Centrifugar el cultivo 10 min a 4000 xg. Descartar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 300 mL de sacarosa 5% (p/v).
7. Justo antes de transformar las plantas añadir Silwet 0.02% (v/v), al cultivo de *Agrobacterium*.

8. Sumergir las inflorescencias de las plantas durante 5 min en el cultivo bacteriano. Es conveniente haber regado las plantas antes de la transformación para que el sustrato este saturado con el agua y no absorba el cultivo, evitando así futuras contaminaciones.
9. Dejar las plantas en posición horizontal en una bandeja sobre papel de filtro y cubrirla con papel de plástico.
10. Mantener la bandeja durante 2-4 días en el invernadero a baja intensidad de luz.
11. Pasado este tiempo, retirar el plástico y el papel de filtro, y poner las plantas en posición vertical, para ser cultivadas normalmente en el invernadero.

8. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROMOTORES EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS

Análisis histoquímico de la actividad GUS

Los ensayos para la detección histoquímica de la actividad β -glucuronidasa (GUS) se realizaron sobre plantas transgénicas portadoras de la fusión transcripcional del promotor *AtCPK1* al gen *GUS* (*PromAtCPK1:GFP-GUS*).

Procedimiento:

1. Las plántulas se crecieron en condiciones estériles *in vitro* en medio MS sin sacarosa, durante diferentes periodos de tiempo según interesaba y se sometieron a diferentes tratamientos (elicitores, infección, hormonas, etc.)
2. Para evitar la difusión de la actividad GUS, fijar rápidamente las plántulas al finalizar el tratamiento con acetona fría al 90% durante 20 min
3. Eliminar la acetona y lavar tres veces las plántulas con H₂O milliQ.
4. Infiltrar las plántulas al vacío durante 15 min con tampón GUS e incubar 16h a 37°C en oscuridad.
5. Retirar el tampón de reacción GUS, lavar varias veces con etanal al 70%.
6. Visualizar la tinción de la actividad GUS bajo lupa.

Tampón GUS: Ferricianuro potásico 100 μ M, Ferrocianuro potásico 100 μ M, EDTA 10mM pH=8, X-Gluc 1mg/mL, tampón fosfato 50mM y N,N-dimetilformamida 1%.





Bibliografía

- Abbasi, F., Onodera, H., Toki, S., Tanaka, H., y Komatsu, S.** (2004). OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol. Biol.* **55**, 541-552.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., y Shinozaki, K.** (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868.
- Abo-el-Saad, M., y Wu, R.** (1995). A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol.* **108**, 787-793.
- Afzal, A.J., Wood, A.J., y Lightfoot, D.A.** (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 507-517.
- Akimoto-Tomiya, C., Sakata, K., Yazaki, J., Nakamura, K., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Shibuya, N., y Minami, E.** (2003). Rice gene expression in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Mol. Biol.* **52**, 537-551.
- Ali, G.S., Prasad, K.V., Day, I., y Reddy, A.S.** (2007). Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an arabidopsis receptor-like kinase. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1601-1611.
- Alkhalifioui, F., Renard, M., Frenedo, P., Keichinger, C., Meyer, Y., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Ritzenthaler, C., y Montrichard, F.** (2008). A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* **148**, 424-435.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., y Ecker, J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148-2152.
- Altenbach, D., y Robatzek, S.** (2007). Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 1031-1039.
- Allwood, E.G., Smertenko, A.P., y Hussey, P.J.** (2001). Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Lett.* **499**, 97-100.

- Anil, V.S., y Rao, K.S.** (2000). Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis. Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiol.* **123**, 1301-1312.
- Antoniw, J.F., Dunkley, A.M., White, R.F., y Wood, J.** (1980). Soluble leaf proteins of virus-infected tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars [proceedings]. *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 70-71.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Aronsson, H., y Jarvis, P.** (2002). A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Lett.* **529**, 215-220.
- Asai, S., y Yoshioka, H.** (2008). The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav.* **3**, 920-922.
- Asano, T., Kunieda, N., Omura, Y., Ibe, H., Kawasaki, T., Takano, M., Sato, M., Furuhashi, H., Mujin, T., Takaiwa, F., Wu Cy, C.Y., Tada, Y., Satozawa, T., Sakamoto, M., y Shimada, H.** (2002). Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* **14**, 619-628.
- Ascencio-Ibanez, J.T., Sozzani, R., Lee, T.J., Chu, T.M., Wolfinger, R.D., Cella, R., y Hanley-Bowdoin, L.** (2008). Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.* **148**, 436-454.
- Aslam, S.N., Newman, M.A., Erbs, G., Morrissey, K.L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T.T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Knight, M.R., y Cooper, R.M.** (2008). Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr. Biol.* **18**, 1078-1083.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., y Hofte, M.** (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 709-719.
- Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J., y Keen, N.T.** (1996). Syringolide 1 Triggers Ca²⁺ Influx, K⁺ Efflux, and Extracellular Alkalinization in Soybean Cells Carrying the Disease-Resistance Gene Rpg4. *Plant Physiol.* **112**, 297-302.
- Ausubel, J., y Sladovich, H. E., eds.** (1989) *Technology and Environment* Natl. Acad. Press, Washington.

- Ayadi, M., Delaporte, V., Li, Y.F., y Zhou, D.X.** (2004). Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in Arabidopsis. *FEBS Lett.* **562**, 147-154.
- Baginsky, S., y Gruissem, W.** (2009). The chloroplast kinase network: new insights from large-scale phosphoproteome profiling. *Mol. Plant* **2**, 1141-1153.
- Balbi, V., y Devoto, A.** (2008). Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* **177**, 301-318.
- Bari, R., y Jones, J.D.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**, 473-488.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S., y Kudla, J.** (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 1346-1362.
- Beckers, G.J., y Spoel, S.H.** (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol. (Stuttg)* **8**, 1-10.
- Berkowitz, G., Zhang, X., Mercie, R., Leng, Q., y Lawton, M.** (2000). Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol.* **41**, 785-790.
- Bernier, F., y Berna, A.** (2001). Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?. *Physiol Biochem.* **39**, 545-554.
- Berrocal-Lobo, M., y Molina, A.** (2008). Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* **13**, 145-150.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., y Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**, 23-32.
- Binder, B.M., Harper, J.F., y Sussman, M.R.** (1994). Characterization of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase purified from *Escherichia coli* using an affinity sandwich technique. *Biochem.* **33**, 2033-2041.
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N., y Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**, 1425-1440.

- BodenhauseN, N., y Reymond, P.** (2007). Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **20**, 1406-1420.
- Bohlmann, H.** (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 1-16.
- Boller, T., y Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Ann. Rev. Plant Biol.* **60**, 379-406.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H., y Sheen, J.** (2010). Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* **464**, 418-422.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., y Dong, X.** (1997). The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**, 1573-1584.
- Bradford, 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**, 248-254.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., y Mundy, J.** (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* **47**, 532-546.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F., y Cammue, B.P.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* **44**, 393-416.
- Buckner, B., Guri, S., B, J., y Janick-Buckner, B.** (2000). Cell death in maize. *Physiol. Plant* **108**, 231-239.
- Bunney, T.D., van Walraven, H.S., y de Boer, A.H.** (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4249-4254.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **46**, 95-122.
- Camoni, L., Harper, J.F., y Palmgren, M.G.** (1998). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett.* **430**, 381-384.

- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., y Dong, X.** (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Cary, A.J., Liu, W., y Howell, S.H.** (1995). Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Clough, S., y Bent, A.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Coca, M., y San Segundo, B.** (2010). AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant J.* **63**, 526-540.
- Colcombet, J., y Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* **413**, 217-226.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Speicher, D.W., y Wingfield, P.T.** (2004). *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons), Hoboken, N.J. .
- Comparot, S., Lingiah, G., y Martin, T.** (2003). Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* **54**, 595-604.
- Conrath, U., Pieterse, C.M., y Mauch-Mani, B.** (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**, 210-216.
- Costa, A., Drago, I., Behera, S., Zottini, M., Pizzo, P., Schroeder, J.I., Pozzan, T., y Schiavo, F.L.** (2010). H₂O₂ in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca⁽²⁺⁾-dependent scavenging system. *Plant J.* **62**, 760-772.
- Custers, J.H., Harrison, S.J., Sela-Buurlage, M.B., van Deventer, E., Lageweg, W., Howe, P.W., van der Meijs, P.J., Ponstein, A.S., Simons, B.H., Melchers, L.S., y Stuiver, M.H.** (2004). Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant J.* **39**, 147-160.
- Cutler, S.R., y Somerville, C.R.** (2005). Imaging plant cell death: GFP-Nit1 aggregation marks an early step of wound and herbicide induced cell death. *BMC Plant Biol.* **5**, 4.
- Chandran, V., Stollar, E.J., Lindorff-Larsen, K., Harper, J.F., Chazin, W.J., Dobson, C.M., Luisi, B.F., y Christodoulou, J.** (2006). Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *J. Mol. Biol.* **357**, 400-410.

- Chang, I.F., Curran, A., Woolsey, R., Quilici, D., Cushman, J.C., Mittler, R., Harmon, A., y Harper, J.F.** (2009). Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **9**, 2967-2985.
- Chaudhuri, S., Seal, A., y Gupta, M.D.** (1999). Autophosphorylation-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase from groundnut. *Plant Physiol.* **120**, 859-866.
- Cheng, S.H., Sheen, J., Gerrish, C., y Bolwell, G.P.** (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.* **503**, 185-188.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., y Sheen, J.** (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* **129**, 469-485.
- Chico, J.M., Raices, M., Tellez-Inon, M.T., y Ulloa, R.M.** (2002). A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* **128**, 256-270.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., y Felix, G.** (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., y Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B., y Thordal-Christensen, H.** (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol. Plant. Pathol.* **3**, 135-144.
- Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J.F., y Chazin, W.J.** (2004). Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 29092-29100.
- Church, G.M., y Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., y Harper, J.F.** (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1840-1848.

- Dangl, J., y Jones, J.D.** (1998). Plant-microbe interactions. Affairs of the plant: colonization, intolerance, exploitation and co-operation in plant-microbe interactions. *Curr. Op. Plant Biol.* **1**, 285-287.
- Dangl, J.L., y Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., y Cervone, F.** (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **39**, 313-335.
- de Wit, P.J.** (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 2726-2732.
- DeFalco, T.A., Bender, K.W., y Snedden, W.A.** (2010). Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem. J.* **425**, 27-40.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., y Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247-1250.
- Delledonne, M.** (2005). NO news is good news for plants. *Curr. Op. Plant Biol.* **8**, 390-396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., y Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Dettmer, J., Schubert, D., Calvo-Weimar, O., Stierhof, Y.D., Schmidt, R., y Schumacher, K.** (2005). Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *Plant J.* **41**, 117-124.
- Dodd, A.N., Kudla, J., y Sanders, D.** (2010). The language of calcium signaling. *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**, 593-620.
- Douglas, P., Moorhead, G., Hong, Y., Morrice, N., y MacKintosh, C.** (1998). Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* **206**, 435-442.
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X.F., Yang, W.J., Wu, Y.M., Huang, Y.B., y Tang, Y.X.** (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochem. (Mosc)* **74**, 1-11.
- Dumas, B., Centis, S., Sarrazin, N., y Esquerre-Tugaye, M.T.** (1999). Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1769-1771.

- Edwards, J.B., Delort, J., y Mallet, J.** (1991). Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids. Res.* **19**, 5227-5232.
- Estruch, J.J., Kadwell, S., Merlin, E., y Crossland, L.** (1994). Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8837-8841.
- Eulgem, T., y Somssich, I.E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Op. Plant Biol.* **10**, 366-371.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., y Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206.
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., y Lamb, C.** (2009). Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **150**, 1750-1761.
- Fan, W., y Dong, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1377-1389.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A., y Teixeira, A.R.** (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 677-700.
- Feussner, I., y Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**, 275-297.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., y Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* **20**, 5400-5411.
- Flor, H.** (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathol.* **32**, 653-669.
- Frattini, M., Morello, L., y Breviario, D.** (1999). Rice calcium-dependent protein kinase isoforms OsCDPK2 and OsCDPK11 show different responses to light and different expression patterns during seed development. *Plant Mol. Biol.* **41**, 753-764.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., y McClung, C.R.** (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **112**, 327-336.
- Fuller, B., Stevens, S.M., Jr., Sehne, P.C., y Ferl, R.J.** (2006). Proteomic analysis of the 14-3-3 family in Arabidopsis. *Proteomics* **6**, 3050-3059.

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., y Ryals, J.** (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* **261**, 754-756.
- Galon, Y., Finkler, A., y Fromm, H.** (2010). Calcium-regulated transcription in plants. *Mol. Plant* **3**, 653-669.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., y Pugin, A.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**, 711-724.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., y Moreno, M.** (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**, 72-74.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 205-227.
- Gomez-Porrás, J.L., Riano-Pachon, D.M., Dreyer, I., Mayer, J.E., y Mueller-Roeber, B.** (2007). Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* **8**, 260.
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K.S., y Zhu, J.K.** (2004). The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**, 919-926.
- Gruner, R., Strompen, G., Pfitzner, A.J., y Pfitzner, U.M.** (2003). Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4876-4886.
- Hamel, L.P., Nicole, M.C., Sritubtim, S., Morency, M.J., Ellis, M., Ehltling, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen, J., Xing, T., Zhang, S., Seguin, A., y Ellis, B.E.** (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**, 192-198.
- Harmon, A.C.** (2003). Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravit. Space Biol. Bull* **16**(2), 83-90.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., y Harper, J.F.** (2000). CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci.* **5**, 154-159.
- Harmon, A.C., Lee, J.-Y., Yoo, B.C., y Shao, J.** (1996). Plant membrane-associated protein kinases. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 137-150.

- Harper, J.F., y Harmon, A.** (2005). Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature* **6**, 555-566.
- Harper, J.F., Binder, B.M., y Sussman, M.R.** (1993). Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in Escherichia coli. *Biochemistry* **32**, 3282-3290.
- Harper, J.F., Manney, L., y Sussman, M.R.** (1994). The plasma membrane H(+)-ATPase gene family in Arabidopsis: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 572-587.
- Harper, J.F., Breton, G., y Harmon, A.** (2004). Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**, 263-288.
- He, P., Shan, L., and Sheen, J.** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiol.* **9**, 1385-1396.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., y Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12217-12222.
- Hegeman, A.D., Rodriguez, M., Han, B.W., Uno, Y., Phillips, G.N., Jr., Hrabak, E.M., Cushman, J.C., Harper, J.F., Harmon, A.C., y Sussman, M.R.** (2006). A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* **6**, 3649-3664.
- Hernandez Sebastia, C., Hardin, S.C., Clouse, S.D., Kieber, J.J., y Huber, S.C.** (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **428**, 81-91.
- Hu, X., Bidney, D.L., Yalpani, N., Duvick, J.P., Crasta, O., Folkerts, O., y Lu, G.** (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* **133**, 170-181.
- Huang, J.Z., Hardin, S.C., y Huber, S.C.** (2001). Identification of a novel phosphorylation motif for CDPKs: phosphorylation of synthetic peptides lacking basic residues at P-3/P-4. *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 61-66.
- Hwang, I., Sze, H., y Harper, J.F.** (2000). A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* **97**, 6224-6229.

- Jackowski, G., Kacprzak, K., y Jansson, S.** (2001). Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochimica et biophysica acta* **1504**, 340-345.
- Janowitz, T., Trompetter, I., y Piotrowski, M.** (2009). Evolution of nitrilases in glucosinolate-containing plants. *Phytochemistry* **70**, 1680-1686.
- Johnson, C.M., Stout, P.R., Broyer, T.C., y Carlton, A.B.** (1957). Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil* **8**, 337-353.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., y Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Op. Plant Biol.* **5**, 415-424.
- Jones, J.D., y Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jorda, L., y Vera, P.** (2000). Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic Arabidopsis plants. Luciferin induction of PR gene expression. *Plant Physiol.* **124**, 1049-1058.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K., y Klessig, D.F.** (2000). Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* **12**, 677-690.
- Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M.R., Fluhr, R., y Fromm, H.** (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 2733-2748.
- Kawasaki, T., Hayashida, N., Baba, T., Shinozaki, K., y Shimada, H.** (1993). The gene encoding a calcium-dependent protein kinase located near the sbe1 gene encoding starch branching enzyme I is specifically expressed in developing rice seeds. *Gene* **129**, 183-189.
- Kazan, K., y Manners, J.M.** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **14**, 373-382.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S.A., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J.E., Mussig, C., Thomma, B.P., Albrecht, C., de Vries, S.C., Hirt, H., y Nurnberger, T.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr. Biol.* **17**, 1116-1122.
- Kinkema, M., Fan, W., y Dong, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-2350.



- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., y Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* **97**, 8849-8855.
- Klimecka, M., y Muszynska, G.** (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica Polonica* **54**, 219-233.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., y Yoshioka, H.** (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**, 1065-1080.
- Kogel, K.H., y Langen, G.** (2005). Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cellular Microbiol.* **7**, 1555-1564.
- Koornneef, A., Verhage, A., Leon-Reyes, A., Snetselaar, R., Van Loon, L., y Pieterse, C.M.** (2008). Towards a reporter system to identify regulators of cross-talk between salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* **3**, 543-546.
- Kudla, J., Batistic, O., y Hashimoto, K.** (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22**, 541-563.
- Kunkel, B.N., y Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Op. Plant Biol.* **5**, 325-331.
- Kuntz, C., Chang, A., Faure, J.D., Clarke, A.E., Polya, G.M., y Anderson, M.A.** (1996). Phosphorylation of a style S-RNases by Ca²⁺-dependent protein kinases from pollen tubes. *Sex Plant Reprod.* **9**, 25-34.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., y Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- Laloi, C., Apel, K., y Danon, A.** (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Op. Plant Biol.* **7**, 323-328.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A., y Wendehenne, D.** (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**, 1-4.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., y Wendehenne, D.** (2004). Analysis of nitric oxide signaling

- functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **135**, 516-529.
- Lay, F.T., y Anderson, M.A.** (2005). Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 85-101.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., y Pugin, A.** (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* **171**, 249-269.
- Lederberg, E.M., y Cohen, S.** (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.* **119(3)**, 1072-1074.
- Lee, B.J., Kwon, S.J., Kim, S.K., Kim, K.J., Park, C.J., Kim, Y.J., Park, O.K., y Paek, K.H.** (2006). Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by Tobacco mosaic virus from nuclear proteome analysis. *Biochem. Biophys Res. Comm.* **351**, 405-411.
- Lee, S.S., Cho, H.S., Yoon, G.M., Ahn, J.W., Kim, H.H., y Pai, H.S.** (2003). Interaction of NtCDPK1 calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **33**, 825-840.
- Li, H.M., y Chiu, C.C.** (2010). Protein transport into chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**, 157-180.
- Li, J., Lee, Y.R., y Assmann, S.M.** (1998). Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol.* **116**, 785-795.
- Li, J., Brader, G., y Palva, E.T.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**, 319-331.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., y Walker, J.C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213-222.
- Li, Y., Liu, Z.B., Shi, X., Hagen, G., y Guilfoyle, T.J.** (1994). An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. *Plant Physiol.* **106**, 37-43.

- Lino, B., Carrillo-Rayas, M.T., Chagolla, A., y Gonzalez de la Vara, L.E.** (2006). Purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase from beetroot plasma membranes. *Planta* **225**, 255-268.
- Loake, G., y Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr. Op. Plant Biol.* **10**, 466-472.
- Lopez, M.A., Bannenberg, G., y Castresana, C.** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr. Op. Plant Biol.* **11**, 420-427.
- Lorenzo, O., y Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Op. Plant Biol.* **8**, 532-540.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., y Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C., y Roby, D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants?. *Trends Plant Sci.* **8**, 263-271.
- Lu, C.A., Lin, C.C., Lee, K.W., Chen, J.L., Huang, L.F., Ho, S.L., Liu, H.J., Hsing, Y.I., y 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.
- Lu, S.X., y Hrabak, E.M.** (2002). An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **128**, 1008-1021.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D., y Romeis, T.** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10736-10741.
- Llorente, F., Muskett, P., Sanchez-Vallet, A., Lopez, G., Ramos, B., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L., Parker, J., y Molina, A.** (2008). Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol. Plant* **1**, 496-509.
- Ma, S.Y., y Wu, W.H.** (2007). AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Mol. Biol.* **65**, 511-518.

- Ma, W., Smigel, A., Tsai, Y.C., Braam, J., y Berkowitz, G.A.** (2008). Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.* **148**, 818-828.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., y Margis-Pinheiro, M.** (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* **75**, 3959-3970.
- Martin, M.L., y Busconi, L.** (2000). Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J.* **24**, 429-435.
- Martin, M.L., y Busconi, L.** (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol.* **125**, 1442-1449.
- Matton, D.P., Prescott, G., Bertrand, C., Camirand, A., y Brisson, N.** (1993). Identification of cis-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene *STH-2* in potato. *Plant Mol. Biol.* **22**, 279-291.
- Mauch-Mani, B., y Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Op. Plant Biol.* **8**, 409-414.
- McCubbin, A.G., Ritchie, S.M., Swanson, S.J., y Gilroy, S.** (2004). The calcium-dependent protein kinase HvCDPK1 mediates the gibberellic acid response of the barley aleurone through regulation of vacuolar function. *Plant J.* **39**, 206-218.
- McMichael, R.W., Jr., Kochansky, J., Klein, R.R., y Huber, S.C.** (1995). Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 71-75.
- Merkouropoulos, G., Andreasson, E., Hess, D., Boller, T., y Peck, S.C.** (2008). An Arabidopsis protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **283**, 10493-10499.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., y Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490-498.
- Mohanty, B., Krishnan, S.P., Swarup, S., y Bajic, V.B.** (2005). Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann. Bot.* **96**, 669-681.
- Moreno, J.I., Martin, R., y Castresana, C.** (2005). Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J.* **41**, 451-463.

- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriác, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., y Schroeder, J.I.** (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* **4**, e327.
- Morillo, S.A., y Tax, F.E.** (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr. Op. Plant Biol.* **9**, 460-469.
- Morris, E.R., y Walker, J.C.** (2003). Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr. Op Plant Biol.* **6**, 339-342.
- Muhlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., y Karpinski, S.** (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2339-2356.
- Muller, B., y Sheen, J.** (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science* **318**, 68-69.
- Mur, L.A., Carver, T.L., y Prats, E.** (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**, 489-505.
- Murillo, I., Jaeck, E., Cordero, M.J., y San Segundo, B.** (2001). Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection. *Plant Mol. Biol.* **45**, 145-158.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., y Shaw, A.S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897.
- Mussig, C., Lisso, J., Coll-Garcia, D., y Altmann, T.** (2006). Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biol.* **8**, 291-296.
- Nakai, T., Konishi, T., Zhang, X.Q., Chollet, R., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Mori, H., Sakai, F., y Hayashi, T.** (1998). An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1337-1341.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., y Yoshida, S.** (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* **33**, 887-898.
- Nam, K.H., y Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203-212.

- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., y Dunand, C.** (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 195-204.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Kornyejev, D., Holaday, A.S., y Zhang, H.** (2006). The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. *J. Exp. Bot.* **57**, 3033-3042.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., y Jones, J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* **18**, 650-655.
- Nawrath, C., y Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Neill, S., Desikan, R., y Hancock, J.** (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Op. Plant Biol.* **5**, 388-395.
- Nelson, N.** (2003). A journey from mammals to yeast with vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase). *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 281-289.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., y Ohashi, Y.** (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **39**, 500-507.
- Nishi, T., y Forgac, M.** (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nature* **3**, 94-103.
- Nurnberger, T., y Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**, 372-379.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., y Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* **198**, 249-266.
- Ogawa, N., Yabuta, N., Ueno, Y., y Izui, K.** (1998). Characterization of a maize Ca²⁺-dependent protein kinase phosphorylating phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1010-1019.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., y Shinshi, H.** (2000). Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1187-1192.

- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.F., y Masclaux-Daubresse, C.** (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* **57**, 547-557.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A., y Palme, K.** (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **1**, 321-337.
- Park, C.J., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J., y Paek, K.H.** (2004a). Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* **219**, 797-806.
- Park, H.C., Kim, M.L., Kang, Y.H., Jeon, J.M., Yoo, J.H., Kim, M.C., Park, C.Y., Jeong, J.C., Moon, B.C., Lee, J.H., Yoon, H.W., Lee, S.H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., Hong, J.C., y Cho, M.J.** (2004b). Pathogen- and NaCl-induced expression of the ScaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol.* **135**, 2150-2161.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., y Daniels, M.J.** (1996). Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.
- Passardi, F., Penel, C., y Dunand, C.** (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**, 534-540.
- Patharkar, O.R., y Cushman, J.C.** (2000). A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant J.* **24**, 679-691.
- Patharkar, O.R., y Cushman, J.C.** (2006). A novel coiled-coil protein co-localizes and interacts with a calcium-dependent protein kinase in the common ice plant during low-humidity stress. *Planta* **225**, 57-73.
- Peltier, J.B., Ripoll, D.R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., Giacomelli, L., Pillardy, J., y van Wijk, K.J.** (2004). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J. Biol. Chem.* **279**, 4768-4781.

- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., y Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Perales, M., Portoles, S., y Mas, P.** (2006). The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the Arabidopsis biological clock. *Plant J.* **46**, 849-860.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., y Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K.J., y Jones, J.D.G.** (1998). Rapid, Cf-9- and Avr9-Dependent Production of Active Oxygen Species in Tobacco Suspension Cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1155-1166.
- Piotrowski, M.** (2008). Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochem.* **69**, 2655-2667.
- Polge, C., y Thomas, M.** (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* **12**, 20-28.
- Pollmann, S., Duchting, P., y Weiler, E.W.** (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochem.* **70**, 523-531.
- Qin, X.F., Holuigue, L., Horvath, D.M., y Chua, N.H.** (1994). Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell* **6**, 863-874.
- Quilis, J., Penas, G., Messeguer, J., Brugidou, C., y San Segundo, B.** (2008). The Arabidopsis AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 1215-1231.
- Raices, M., Chico, J.M., Tellez-Inon, M.T., y Ulloa, R.M.** (2001). Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Mol. Biol.* **46**, 591-601.
- Rechsteiner, M., y Rogers, S.W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271.

- Reddy, V.S., y Reddy, A.S.** (2004). Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochem.* **65**, 1745-1776.
- Resh, M.D.** (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**, 1-16.
- Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I., y Florencio, F.J.** (2004). The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* **134**, 1718-1732.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Kochner, P., Felix, G., Shiu, S.H., y Boller, T.** (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol. Biol.* **64**, 539-547.
- Romeis, T., Piedras, P., y Jones, J.D.** (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**, 803-816.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., y Jones, J.D.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* **20**, 5556-5567.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., y Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., y Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 795-803.
- Rouhier, N., y Jacquot, J.P.** (2002). Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth. Res.* **74**, 259-268.
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S.P., y Deng, X.W.** (2005). An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *Plant J.* **41**, 767-778.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C., y Schaller, A.** (2002). LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol.* **129**, 156-168.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., y Uknes, S.** (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* **9**, 425-439.

- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., y de Oliveira, D.E.** (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?. *Biochimica et Biophys Acta* **1492**, 1-14.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyozuka, J., Shimamoto, K., y Izui, K.** (2000). Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* **23**, 319-327.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- San Segundo, B., y Coca, M.** (2004). "Genes de Defensa" en Resistencia genética a patógenos vegetales. Ed. Univ. Politec. Valencia. Capítulo 4. pp137-193.
- Sanders, D., Brownlee, C., y Harper, J.F.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.
- Sano, H., Seo, S., Orudjev, E., Youssefian, S., y Ishizuka, K.** (1994). Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10556-10560.
- Scandalios, J.G.** (2002). Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* **3**, 10-19.
- Scandalios, J.G.** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 995-1014.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., y Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11655-11660.
- Schwessinger, B., y Zipfel, C.** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* **11**, 389-395.
- Seo, P.J., y Park, C.M.** (2010). MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **186**, 471-483.
- Sequeira, L.** (1965). Origin of indoleacetic acid in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* **55**, 1232-1236.

- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F.** (1999). The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**, 191-206.
- Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Kunz, S., Schuller, A., Nagel, W., Schumling, T., Parniske, M., y Ludwig-Muller, J.** (2006). Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 480-494.
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B., y Klessig, D.F.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11640-11645.
- Smalle, J., y Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-590.
- Song, F., y Goodman, R.M.** (2001). Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1458-1462.
- Sorek, N., Bloch, D., y Yalovsky, S.** (2009). Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Curr. Op. Plant Biol.* **12**, 714-720.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425-448.
- Subramanian, A.** (2002). Immunoaffinity Chromatography. *Mol. Biotechnol.* **20**, 41-47.
- Sutoh, K., y Yamauchi, D.** (2003). Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. *Plant J.* **34**, 635-645.
- Takahashi, K., Isobe, M., y Muto, S.** (1997). An increase in cytosolic calcium ion concentration precedes hypoosmotic shock-induced activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *FEBS Lett.* **401**, 202-206.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., y Ohta, H.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**, 1268-1283.

- Thaler, J.S., Owen, B., y Higgins, V.J.** (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**, 530-538.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P., y Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* **216**, 193-202.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., y Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**, 1093-1102.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., y Cammue, B.P.** (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Op. Immunol.* **13**, 63-68.
- Tsutsumi, K., Kagaya, Y., Hidaka, S., Suzuki, J., Tokairin, Y., Hirai, T., Hu, D.L., Ishikawa, K., y Ejiri, S.** (1994). Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene* **141**, 215-220.
- Ulloa, R.M., Raices, M., MacIntosh, G.C., Maldonado, S., y Tellez-Inon, M.T.** (2002). Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plantarum* **115**, 417-427.
- Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., y Shinozaki, K.** (1994). Two genes that encode Ca(2+)-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen Genet.* **244**, 331-340.
- Van der Biezen, E.A., y Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
- van der Hoorn, R.A., y Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M., y Ton, J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5602-5607.
- van Loon, L.C., y van Kammen, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Viol.* **40**, 190-211.

- van Loon, L.C., Rep, M., y Pieterse, C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **44**, 135-162.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. and Conejero, V.** (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **12**, 245-264.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M., y Alain, P.** (2006). Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 429-440.
- Verhagen, B.W., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Hofte, M., y Aziz, A.** (2010). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* **61**, 249-260.
- Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C., y Pieterse, C.M.** (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 895-908.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., y Narasimhan, M.L.** (2003). In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.* **131**, 1580-1590.
- Walther, D., Brunnemann, R., y Selbig, J.** (2007). The regulatory code for transcriptional response diversity and its relation to genome structural properties in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* **3**, e11.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., y Dong, X.** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* **17**, 1784-1790.
- Wang, Z.Y., Wang, Q., Chong, K., Wang, F., Wang, L., Bai, M., y Jia, C.** (2006). The brassinosteroid signal transduction pathway. *Cell Res.* **16**, 427-434.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei dit Frey, N., y Leung, J.** (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol. Plant* **1**, 198-217.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., y Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., y Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Williamson, R.E., y Ashley, C.C.** (1982). Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* **296**, 647-650.
- Witte, C.P., Keinath, N., Dubiella, U., Demouliere, R., Seal, A., y Romeis, T.** (2010). Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response. *J. Biol. Chem.* **285**, 9740-9748.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322** (3), 681-692.
- Woodward, A.W., y Bartel, B.** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* **95**, 707-735.
- Worrall, D., Hird, D.L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., y Scott, R.** (1992). Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **4**, 759-771.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., y Turner, J.G.** (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xing, T., Wang, X.J., Malik, K., y Miki, B.L.** (2001). Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1261-1264.
- Xiong, L., y Yang, Y.** (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **15**, 745-759.
- Xu, P., Narasimhan, M.L., Samson, T., Coca, M.A., Huh, G.H., Zhou, J., Martin, G.B., Hasegawa, P.M., y Bressan, R.A.** (1998). A nitrilase-like protein interacts with GCC box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses. *Plant Physiol.* **118**, 867-874.
- Yang, W., y Boss, W.F.** (1994). Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. *J. Biol. Chem.* **269**, 3852-3857.

- Yao, Y., Du, Y., Jiang, L., y Liu, J.Y.** (2007). Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 349-357.
- Yi, X., Hargett, S.R., Liu, H., Frankel, L.K., y Bricker, T.M.** (2007). The PsbP protein is required for photosystem II complex assembly/stability and photoautotrophy in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **282**, 24833-24841.
- Yoon, G.M., Cho, H.S., Ha, H.J., Liu, J.R., y Lee, H.S.** (1999). Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol. Biol.* **39**, 991-1001.
- Yu, X.C., Li, M.J., Gao, G.F., Feng, H.Z., Geng, X.Q., Peng, C.C., Zhu, S.Y., Wang, X.J., Shen, Y.Y., y Zhang, D.P.** (2006). Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. *Plant Physiol.* **140**, 558-579.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., y Lamb, C.** (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**, 2875-2886.
- Zhang, H., Wang, J., Nickel, U., Allen, R.D., y Goodman, H.M.** (1997). Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Mol. Biol.* **34**, 967-971.
- Zhang, S., y Klessig, D.F.** (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809-824.
- Zhang, S., y Klessig, D.F.** (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7225-7230.
- Zhang, X.Q., y Chollet, R.** (1997). Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **410**, 126-130.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., y Dong, X.** (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6523-6528.
- Zhao, J., Davis, L.C., y Verpoorte, R.** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Advan.* **23**, 283-333.
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Xu, Y.H., Zhang, X.Y., y Zhang, D.P.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3019-3036.



- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Op. Immunol.* **20**, 10-16.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Op. Plant Biol.* **12**, 414-420.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., y Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.