

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS



**GEM, una proteína con dominio GRAM,
es un regulador negativo de la señalización por ABA
durante la germinación en *Arabidopsis thaliana***

Tesis Doctoral
Nuria Mauri Panadero

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS



**GEM, una proteína con dominio GRAM,
es un regulador negativo de la señalización por ABA
durante la germinación en *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por Nuria Mauri Panadero,
Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora
en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director:

Crisanto Gutiérrez Armenta

Tutor:

José Antonio Tercero Orduña

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del antiguo ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-16222) dentro del proyecto “Control de la proliferación y la división celular en *Arabidopsis*” (BFU2006-05662). Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio del Doctor Crisanto Gutiérrez Armenta bajo su supervisión y dentro de las instalaciones del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), centro mixto de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), salvo en los meses de disfrute de una ayuda para estancia breve (ayudas FPI-2009) en el laboratorio de la Doctora Paloma Más en el Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB).

A mi profesora Mercedes, por
traer aquellas revistas científicas un día en
el colegio público San Fernando

Agradecimientos

Como en cualquier esfuerzo personal, el proceso de elaboración de esta tesis no ha estado exento de lucha, sin embargo, algunas personas que me han acompañado han contribuido de manera esencial (y ahora me doy cuenta) para convertir los momentos de desesperación en sed de superación y los momentos de orgullo personal en alegría generalizada. A estas personas quiero agradecer sus sabias conversaciones, sentidos abrazos y preocupadas críticas.

Al CBM llegué en el año 2007, justo cuando todo el equipo se trasladaba al nuevo edificio. Entonces me gustaba imaginármelo como un monasterio del s.XIII, el aislamiento ayuda a verlo así, con un montón de monjes trabajando metódicamente y produciendo obras tan densas como el Metaboloma o el Epigenoma. En este escenario, me recibieron un grupo de simpáticos extraños que consiguieron quitarme el susto y estuvieron siempre dispuestos a perder su tiempo respondiendo a mis preguntas, como Celi, Pablo, Bene, Maripaz, Marta, Maribel, Elena R y, especialmente, mi amiga Cristina, capaz de transformar la monotonía del trabajo en un laboratorio en días de risa desternillante (gracias por atarme los cordones o cambiar mi DNI con residencia en Ponylandia). También a mi amigo Brian Molloy from Spain que me ayudó a poner mis primeros crampones y a vivir experiencias al límite en su compañía. Durante esta etapa de experimentación he presenciado el amanecer en el CBM en todos los sentidos...

Como el tiempo es relativo y más en el monasterio, pronto llegaron mis compañeras de la etapa más reciente, Sofía, Zaida, Joana y Maria FM, y más tarde, Irene, con las que he pasado días de gloria descubriendo pelusas debajo de la mesa, mutantes con apariencia de violetas africanas, códigos secretos en la secuencia del genoma de *Arabidopsis* y la fama gracias al tema "aire apestador". La ayuda de Maria FM ha sido, además, fundamental para desarrollar los experimentos de germinación. A ellas, especialmente gracias por haberme alimentado de amor en mis peores días. Habéis tirado de mí más de lo que pensáis y lo valoraré siempre. En el mismo sentido, he compartido con los escribas de claustros vecinos como María, Alfonso, Fajardo, Joe y Gloria, más de 400 cafés solos y largos, risas y cualquier cosa que necesitara como en una familia. Gracias también a los que saludo con premura en los pasillos, pero me encantaría volver a ver en otras circunstancias más relajadas, entre ellos, la fabulosa crème del CBM con la que he compartido algún viaje siniestro y noches de improvisación, y a David por cargar pacientemente conmigo en la montaña. Gracias al personaje en la sombra por su cariño incondicional y por responder siempre a mis llamadas nocturnas de socorro.

Al director del *scriptorium*, Crisanto, mi gratitud sincera por acercarme al lienzo en blanco que había soñado y permitir que aprenda sin dejar de seguirme de cerca. Por el método, libre de sermones (casi siempre) y rico en argumentación, que ha servido para ganar confianza en el trabajo que hacíamos juntos. Sobre todo, en un campo en el que no éramos ningunos expertos y es que esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de un buen número de especialistas que nos orientaron generosamente en estas nuevas áreas. A todos ellos, gracias.

Así, esta tesis me ha permitido aprender de los conocimientos y compañía de otro grupo de investigación en Barcelona durante una estancia en el laboratorio de Paloma Más que recuerdo muy inspiradora y con banda sonora de fondo junto a David, Tommaso, Sergi, Hélène, Benoît y otros apasionados investigadores al final de la escapada. Aunque, previamente, también he tenido la suerte de trabajar en el IBMCP de Valencia antes de empezar esta tesis, junto a Pepe Gadea, Forment, y otros amigos de Valencia que han sido un apoyo para seguir en el empeño.

A las becas FPI, millones de gracias, porque han sido la oportunidad para muchos de nosotros de pisar tierra y su repercusión, además del avance que no somos capaces de anticipar, asegura de alguna manera el acceso libre del mundo al poder de la ciencia. También, al CBM por poner todas las facilidades para experimentar, al correo interno (al unificado en gentes especialmente), a las chicas de microscopía, a Alfonso medios, a Ilu.

A mi familia, a mi padre, a mi madre y a mi hermana L. Mauri por enseñar a verme como a un elemento de cambio y no como a un elemento que cambia, a no rendirme pronto y por haber creído en mí todo este tiempo.

Summary

The GRAM domain is found in glucosyltransferases, Rab GTPases-activating proteins and myotubularins but its function remains poorly known in plants. We classified a new group of nine proteins with a specific sequence in the GRAM domain that we propose to name GER (GEM RELATED) subfamily, based on their similarity to GEM (GL2 EXPRESSION MODULATOR). In this work we have focused on GEM.

GEM expression was mainly located in the root during the vegetative stage of the plant but in the reproductive stage *GEM* is also expressed in flowers and siliques during gametogenesis, embryogenesis and seed maturation. In the flower, *GEM* is located in developing microspores, the tapetum layer in the pollen sacs, dehiscent pollen grains and in the stigma papillae of the gynoecium. In siliques, *GEM* is located in the endosperm of developing seeds, similarly to *ABA45*, another GRAM protein of barley. All these plant locations are associated with the production of ABA and therefore we hypothesized that GEM could play a role in ABA signaling processes. We have demonstrated that *GEM* expression is induced by ABA and has a role in seed germination, related to its expression in the endosperm.

ABA activates *GEM* expression in an *ABRE* site-dependent manner and its regulation requires the activity of ABI1 phosphatase, SnRK2 2.2 / 2.3/ 2.6 kinases, and the ABI3 and ABI5 transcription factors, which specifically recognize the *ABRE* motifs. Similarly, other members of the subfamily *GER*, such as *GER5*, are also ABA responsive genes but only *GER4* has *ABRE* motifs in its promoter.

Global transcriptional studies in *gem-1* and *GEMoe* plants have shown a strong deregulation of ABA-responsive genes. Germination studies in these plants indicate that GEM acts as a negative regulator of ABA signaling by inhibiting dormancy and promoting germination even at high salt concentrations. ABA signaling during root growth and drought tolerance is also promoted by GEM.

These transcriptional studies have also shown a strong enrichment in genes controlled by the circadian clock. We have concluded that GEM negatively regulates ABA-mediated induction of *ABAR*, a gene involved in ABA signaling and circadian clock regulation. *GEM* is also expressed in a circadian manner being, expressed most probably due to daily variation in ABA content in plants. However, *GEM* is not directly regulated by the main circadian oscillator. Changes in the flowering behavior of *gem-1* and *GEMoe* plants suggest a connection to ABA-mediated processes that link flowering regulators with the photoperiod, e.g., intermediate day photoperiod produces a delayed flowering in *GEMoe* plants.

Our subcellular localization studies show that GEM is part of the peripheral pool of membrane proteins as well as in the nucleus, and it binds various phosphoinotide phosphate. Thus, we propose that GEM could act as a signal transduction component in the ABA response.

Índice:

	Introducción	pág.
1. El ácido abscísico (ABA) en plantas		1
1.1 Metabolismo del ABA y su regulación		3
1.2 Señalización del ABA		5
1.2.1 Receptores de ABA		7
1.2.2 Protein fosfatasa de tipo 2C (PP2C)		8
1.2.3 Protein kinasas de la superfamilia SNF (SnRKs)		9
1.2.4 Factores de transcripción		10
1.2.5 Cambios epigenéticos asociados a la respuesta a ABA		10
1.2.6 Respuesta génica		11
1.2.7 Silenciamiento génico post-transcripcional		12
1.2.8 Mensajeros secundarios: los PIPs		12
1.3 Funciones del ABA		
1.3.1 Control del crecimiento		14
1.3.2 Dormición o inhibición de la germinación		14
1.3.3 Inhibición de la floración		15
1.3.4 Respuesta a estrés		16
1.3.5 Funciones ligadas al reloj circadiano		17
2. El dominio GRAM		
2.1 Filogenia y taxonomía del dominio GRAM		19
2.2 Estructura terciaria del dominio GRAM, las miotubularinas		21
2.3 Unión a fosfolípidos de las miotubularinas		22
	Objetivos	25
	Materiales y métodos	
Material vegetal y condiciones de crecimiento		27
Generación de anticuerpos		28
Análisis de los niveles de proteína		28
Ensayo de degradación por proteosoma		29
Ensayo de modificación por fosforilación		29
Unión de proteína a fosfolípidos		29
Fraccionamiento subcelular y localización de proteína		
- Fraccionamiento nuclear		30
- Fraccionamiento de membrana		31
Co-purificación y análisis por espectrometría de masas		32
Construcción de plantas <i>GEM²⁷⁷⁴:GUS</i> y <i>GEM²⁰⁴⁹:GUS</i>		32
Ensayo de tinción en plantas con el gen reportero GUS		33
Análisis transcriptómico		
- A nivel genómico		33
- A nivel génico		34
Análisis fenotípicos		
- Seguimiento del reloj circadiano.....		35

- Floración	35
- Germinación.....	35
- Crecimiento radicular.....	36
- Supervivencia a sequía.....	36
Alineamiento de proteínas	36
Predicción de dominios y motivos	36

Resultados

Bloque I: Clasificación y caracterización de GEM

1. La familia del dominio GRAM en plantas	37
1.1 La nueva subfamilia GER (GEM RELATED) en <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
1.2 Homología de las proteínas GER con ABA45 (<i>Hordeum vulgare</i>)	43
2. Caracterización de la proteína GEM	
2.1 Generación de anticuerpos contra GEM	44
2.2 Degradación por proteosoma	46
2.3 Modificación por fosforilación	46
2.4 Localización subcelular de GEM: membrana y núcleo	47
2.5 Unión a fosfolípidos	49
2.6 Unión a otras proteínas.....	50
3. Patrón de expresión local durante el desarrollo	
3.1 Estadio vegetativo	52
3.2 Estadio reproductivo	53
4. Análisis transcriptómico de plantas <i>gem-1</i> y <i>GEMoe</i>	
4.1 Categorización por localización subcelular y función	57
4.2 Meta-análisis	58

Bloque II: Implicación de GEM en el reloj circadiano

5. Regulación del reloj circadiano por GEM	61
6. Regulación de <i>GEM</i> por el reloj circadiano	63
7. Floración dependiente de fotoperíodo	
7.1 Regulación de genes de floración por GEM	66
7.2 Fenotipo de floración de las plantas <i>gem-1</i> y <i>GEMoe</i>	67

Bloque III: Implicación de GEM en la señalización por ABA

8. Resultados del análisis transcriptómico de plantas <i>gem-1</i> y <i>GEMoe</i>	69
9. Expresión de genes de respuesta a ABA en plantas <i>gem-1</i> y <i>GEMoe</i>	71
10. Fenotipo de las plantas <i>gem-1</i> y <i>GEMoe</i> en la señalización por ABA	
10.1 Ensayos de dormición de la semilla.....	74
10.2 Ensayos de geminación en ABA, NaCl y PAC	76
10.3 Crecimiento radicular	77
10.4 Supervivencia a sequía	78
11. Estudio de la regulación de <i>GEM</i> por ABA	
11.1 Estudio <i>in silico</i> de la regulación de <i>GEM</i> y otros <i>GER</i> genes por ABA ...	79
11.2 Estudio de la inducción de <i>GEM</i> en plantas <i>GEM²⁷⁷⁴:GUS</i>	81
11.3 Funcionalidad de los sitios <i>ABRE</i> y <i>DRE/CRT</i>	83
12. Estudio de la regulación de <i>GEM</i> en mutantes de ABA	84

	Discusión	
a) <i>GEM</i> es un gen de respuesta a ABA a través de la vía de señalización ABI1-SnRK2s-ABI3/ABI5-ABRE.....		87
b) <i>GEM</i> es un regulador negativo de la señalización mediada por ABA		92
c) <i>GEM</i> se expresa durante estadios de desarrollo relacionados con un aumento de ABA		93
d) <i>GEM</i> actúa sobre la germinación como un regulador negativo de la vía de señalización del ABA		95
e) <i>GEM</i> tiene una expresión diurna y circadiana		98
f) <i>GEM</i> integra la señalización de ABA y el reloj circadiano en <i>ABAR</i> / <i>GEM</i> es un regulador negativo de la señalización mediada por ABA a <i>ABAR</i>		100
g) Unión de <i>GEM</i> a segundos mensajeros lipídicos y localización subcelular		101

	Conclusiones	103
--	---------------------	-----

	Bibliografía	105
--	---------------------	-----

	Material suplementario	
--	-------------------------------	--

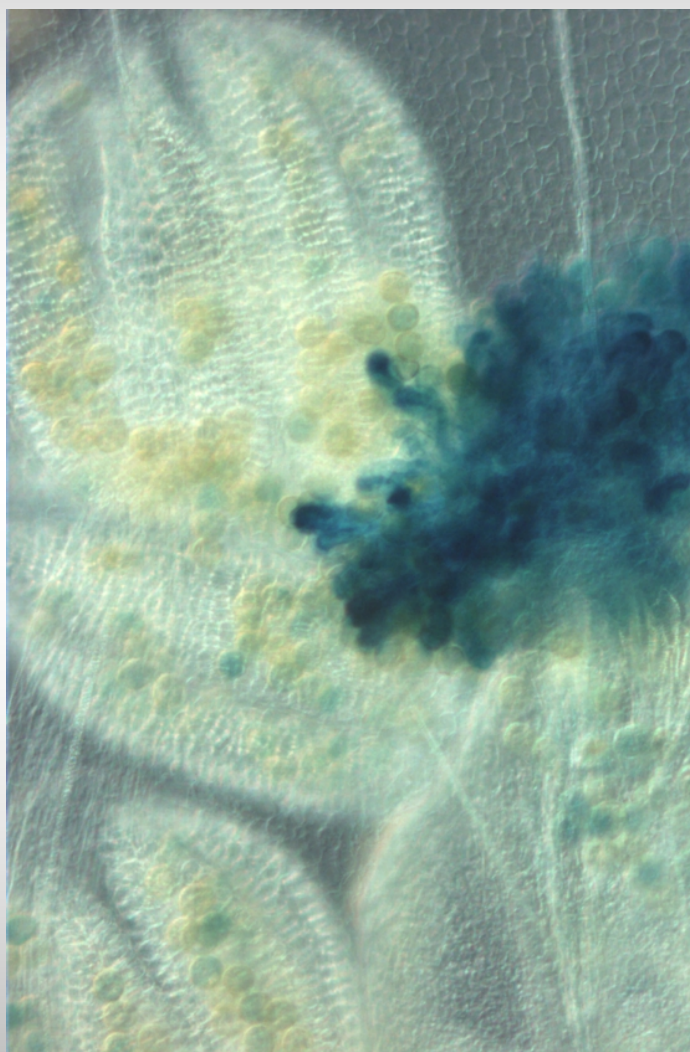
Tablas:

TS1. Homología de las proteínas GER con ABA45

TS2. Genes desregulados en los *microarrays* de plantas *gem-1*

TS3. Genes desregulados en los *microarrays* de plantas *GEMoe*

Introducción



Introducción

1. El ácido abscísico (ABA) en plantas

El ácido abscísico (ABA) fue identificado en la década de los 60 como una molécula acumulada en el fruto del algodón y, un tiempo después, fue descrito en las hojas del árbol del sicomoro donde esta sustancia se inducía fotoperiódicamente (Cornforth *et al.* 1966, Ohkuma *et al.* 1963). A pesar de haber sido asociado con la abscisión del fruto y considerado históricamente como un inhibidor del crecimiento, hoy se sabe que el ABA participa en la senescencia del fruto, no en su abscisión, y que es un regulador del crecimiento pero no un inhibidor exactamente como demuestra el hecho de que su falta cause enanismo en los mutantes de su biosíntesis (Fig. 1).



Fig.1 Fenotipo enano de plantas deficientes de ABA, *aba1-5* (Bonaventure *et al.* 2007)

Las funciones que desarrolla el ABA en la planta son esenciales para su supervivencia, entre las más importantes se encuentran: el control de la transpiración a través del cierre de los estomas, la maduración de la semilla y la quiescencia del embrión, la inhibición de la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva en la planta o la adaptación a condiciones adversas: hipoxia, sequía, frío, alta sal, infección por patógeno o herida (Leung and Giraudat 1998, Rock 2000, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000).

Los mecanismos de acción del ABA en la célula están comunicados con otras redes hormonales como las de las giberelinas o los brasinoesteroides, nutricionales como la del azúcar y de señalización ambiental como la dependiente de luz. Dicho de otra forma, la homeostasis del ABA en la planta forma parte de una homeostasis superior que integra las señales medioambientales externas con los programas de desarrollo intrínsecos (Gazzarrini 2001). En muchos aspectos, el ABA tiene en las giberelinas (GA) su antagonista funcional. Ocurre en la germinación de la semilla y en la floración donde ambas hormonas tienen efectos contrarios siendo inhibidas por el ABA y promovidas por las GA (Achard *et al.* 2006, Tyler *et al.* 2004)

Las búsquedas génicas cuya selección se ha basado en fenotipos anormales en germinación, transpiración, resistencia a sal, etc. han aportado decenas de *loci* relacionados con la regulación de la señalización del ABA, la mayoría en *Arabidopsis thaliana*. La redundancia funcional de las familias multigénicas de *Arabidopsis* ha dificultado esta búsqueda en algunos casos pero mediante la obtención de múltiples mutantes han sido posible implicar a otros genes que participan en la regulación del ABA como los *PYR/PYL/RCAR* (Gonzalez-Guzman *et al.* 2012). Dentro de la colección de mutantes de la ruta de señalización del ABA encontramos mutantes de

la ruta de su biosíntesis (*aba1*, *aba2*, *aba3*, *nced3*, *nced9*, *aoa3*) y de su catabolismo (*cyp707a*), proteínas fosfatasa (*abi1*, *abi2*), proteínas kinasa (*snrk1*), factores de transcripción (*abi3*, *abi4*, *abi5*), proteínas de unión a RNA (*abh1*, *ahg2*) y también enzimas del metabolismo de los fosfoinositoles (*fry1*) (Tabla 1). Los mutantes de la ruta del ABA se han clasificado tradicionalmente en: *deficientes*, aquellos mutantes cuyo fenotipo está provocado por la falta de la hormona endógena; *insensibles*, aquéllos otros que no responden a la aplicación del ABA; e *hipersensibles*, aquéllos cuya respuesta al ABA es superior a lo normal.

Tabla 1: Principales mutantes de la respuesta a ABA en *Arabidopsis thaliana* (A partir de Finkelstein et al., 2002)

		Mutante	Fenotipo	Producto génico	Ref.*
Biosíntesis	Deficiente	<i>aba1-1</i>	Baja dormición de la semilla, fenotipo marchito, baja inducción de genes de estrés	Zeaxantina epoxidasa	(1), (2), (3), (4)
	Deficiente	<i>aba2</i>	Baja dormición de la semilla, fenotipo marchito, baja inducción de genes de estrés	Aldehído oxidasa	(5),(6), (7)
	Deficiente	<i>aba3</i>	Baja dormición de la semilla, fenotipo marchito, baja inducción de genes de estrés	Aldehído oxidasa	(5),(2), (8),(7), (4)
	Deficiente	<i>nced3-3</i>	Germinación reducida, hipersensibilidad a estrés por sequía y osmótico	9'-cis-epoxy cartenoide dioxigenasa	(9)
	Deficiente	<i>nced9-1</i>	Resistencia a paclobutrazol	9'-cis-epoxy cartenoide dioxigenasa	(10),(11)
	Deficiente	<i>aoa3</i>	Fenotipo marchito	Aldehído oxidasa	(12)
Catabolismo	Hipersensible	<i>cyp707a1-1</i>	Acumula ABA, alta dormición	ABA 8'-hidroxilasa	(13),(14), (15)
Receptores	Insensible	<i>pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8</i>	Germinación resistente a ABA (100uM), alta tasa de transpiración, transcriptoma de ABA inactivo	Receptores de ABA	(16)
Proteín fosfatasa	Insensible	<i>abi1-1</i>	Dormición nula, germinación resistente a ABA (50uM), transcriptoma de ABA inactiva	Proteín-fosfatasa tipo 2C	(17),(18), (19)
	Insensible	<i>abi1-2</i>	Germinación hipersensible a ABA, resistencia a sequía, transcriptoma de ABA activo	Proteín-fosfatasa tipo 2C	(20)
	Insensible	<i>abi2-1</i>	Dormición nula, germinación resistente a ABA, respuesta a ABA defectuosa	Proteín-fosfatasa tipo 2C	(17),(21), (22)
Proteín K	Insensible	<i>snrk2.2-snrk 2.3-snrk 2.6</i>	Hipersensibilidad a sequía, dormición nula, transcriptoma de ABA inactivo, acumulación de ABA	Proteín kinasa	(23)
Factores de transcripción	Insensible	<i>abi3-1</i>	Germinación resistente a ABA, defectos pleiotrópicos en la maduración de la semilla	Factor de transcripción con dominio B3	(17),(24)
	Insensible	<i>abi4-1</i>	Germinación resistente a ABA, a azúcar y a sal	Factor de transcripción con dominio APETALA2	(25),(26), (27),(28), (6), (7)
	Insensible	<i>abi5-1</i>	Germinación resistente a ABA	Factor de transcripción con dominio bZIP	(25),(29)
	Insensible	<i>abi8</i>	Germinación resistente a ABA, enanismo, regulación de la apertura estomacal defectuosa, esterilidad masculina	Proteína de función desconocida	(30)

Proteínas de unión a RNA	Hipersensible	<i>abh1</i>	Germinación hipersensible a ABA, respuesta hipersensible de las células guarda a ABA, tolerancia a sequía	Proteína de unión a RNAm	(31)
	Hipersensible	<i>ahg2-1</i>	Resistente a patógeno, transcriptoma de ABA y de GA activado	Ribonucleasa específica de poli(A)	(32)
	Hipersensible	<i>xrn2/3/4</i>	Inducción constitutiva de estrés, acumulación de RNA no codificante, menor número de raíces secundarias	5'-3'-Exoribonucleasas	(33),(34),(35)
	Hipersensible	<i>sad1</i>	Germinación hipersensible a ABA, baja biosíntesis de ABA, cto. de raíz hipersensible a ABA	Ribonucleoproteína	(4)
Metabolismo de los PIPs	Hipersensible	<i>fry1</i>	Inducción constitutiva del transcriptoma de estrés, acumula IP(3), germinación hipersensible a ABA, menor número de raíces laterales, tolerante a sequía	3',5'-bifosfato nucleotidasa (catabolismo PIPs)	(4),(34),(36),(35)
	Hipersensible	<i>sac9</i>	Bajo crecimiento, estomas cerrados, acumulación de antocianina, acumula ROS, PI(4,5) e IP(3) Inducción constitutiva del transcriptoma de estrés	Inositol polifosfato 1-fosfatasa; 3',5'-bifosfato nucleotidasa	(37)

Ref.

- | | | | |
|--|--|---|--------------------------------------|
| (1) (Koorneef <i>et al.</i> 1982) | (11) (Frey <i>et al.</i> 2012) | (21) (Leung <i>et al.</i> 1997) | (31) (Hugouvieux <i>et al.</i> 2001) |
| (2) (Ishitani <i>et al.</i> 1997) | (12) (Seo <i>et al.</i> 2000) | (22) (Rodríguez <i>et al.</i> 1998) | (32) (Nishimura <i>et al.</i> 2009) |
| (3) (Niyogi <i>et al.</i> 1998) | (13) (Okamoto <i>et al.</i> 2006) | (23) (Nakashima <i>et al.</i> 2009) | (33) (Gy <i>et al.</i> 2007) |
| (4) (Xiong <i>et al.</i> 2001) | (14) (Umezawa <i>et al.</i> 2006) | (24) (Giraudat <i>et al.</i> 1992) | (34) (Chen and Xiong 2010) |
| (5) (Leon-Kloosterziel <i>et al.</i> 1996) | (15) (Matakiadis <i>et al.</i> 2009) | (25) (Finkelstein 1994) | (35) (Estavillo <i>et al.</i> 2011) |
| (6) (Laby <i>et al.</i> 2000) | (16) (Gonzalez-Guzman, <i>et al.</i> 2012) | (26) (Finkelstein <i>et al.</i> 1998) | (36) (Wilson <i>et al.</i> 2009) |
| (7) (Rook <i>et al.</i> 2001) | (17) (Koorneef <i>et al.</i> 1984) | (27) (Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000) | (37) (Williams <i>et al.</i> 2005) |
| (8) (Llorente <i>et al.</i> 2000) | (18) (Leung <i>et al.</i> 1994) | (28) (Huijser <i>et al.</i> 2000) | |
| (9) (Wan and Li 2006) | (19) (Meyer <i>et al.</i> 1994) | (29) (Lopez-Molina and Chua 2000) | |
| (10) (Seo <i>et al.</i> 2006) | (20) (Saez <i>et al.</i> 2006) | (30) (Brocard-Gifford <i>et al.</i> 2004) | |

1.1 Metabolismo del ABA y su regulación

La biosíntesis del sesquiterpeno del ABA tiene lugar en dos pasos compartimentados dentro de la célula vegetal. En primer lugar, en los plastidios, principalmente cloroplastos, la zeaxantina que es el precursor directo del ABA se oxida a violanxantina a través de una epoxidasa (ABA1) y la violanxantina sufre una escisión oxidativa mediada por dioxigenasas (NCED) produciéndose xantoxina. En segundo lugar, la xantoxina sale al citoplasma donde una dehidrogenasa (ABA2) la transforma en ABA-aldehído que es oxidado (AAO3) para formar finalmente el S-(+)-ABA, la forma natural del ABA (Finkelstein *et al.* 2002). Los carotenoides son la fuente principal de la zeaxantina que alimenta la ruta de biosíntesis, una evidencia de esto es que la inhibición de su síntesis de los mediante *fluoridina* provoca una fuerte deficiencia de ABA.

Por otro lado, el catabolismo del ABA se produce de manera predominante por hidroxilación a ácido faseico a través de una citocromo P-450 monooxigenasa siendo menos frecuente la inactivación del ABA por esterificación con una glucosa.

En *Arabidopsis*, los pasos principales en la regulación de la biosíntesis y el catabolismo del ABA recaen en los genes *NCED* (Lefebvre *et al.* 2006) y los genes *P450 CYP707A*, respectivamente (Millar *et al.* 2006, Umezawa, *et al.* 2006) (Fig. 2)

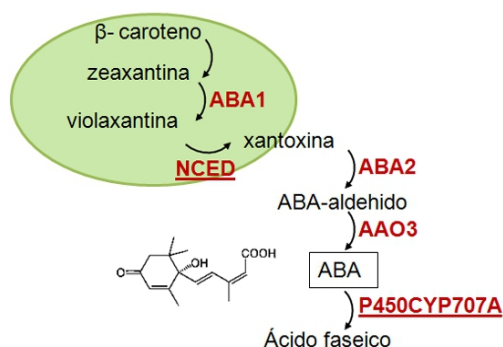


Fig. 2 Ruta de biosíntesis y catabolismo del ABA (en rojo, las enzimas que participan)

Los niveles de ABA endógeno en la planta fluctúan a lo largo del día, de su desarrollo y en respuesta a diferentes tipos de estrés marcando aquellas etapas donde el ABA juega un papel clave. Se han registrado fluctuaciones diarias en las concentraciones de ABA en varias especies de plantas como ya se describía en el árbol de sicomoro cuando el ABA fue identificado. También, durante el desarrollo se han descrito dos picos fuertes en la producción endógena de la hormona, ambas durante la maduración de la semilla en la silicua: la primera, la produce la semilla entre 9 y 10 días después de la floración, cuando el embrión alcanza más o menos su tamaño final en la *maduración temprana*. La segunda, la produce la envuelta de la silicua entre 15 y 16 días después de la floración cuando se produce su desecación dentro de la *maduración tardía* (Kanno *et al.* 2010) (Fig. 3).

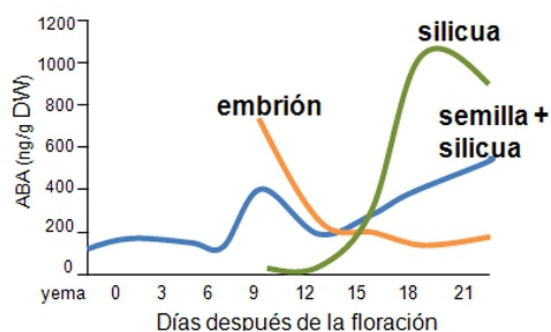


Fig. 3 Contenido de ABA endógeno durante el desarrollo de la semilla en *A. thaliana* (Kanno, *et al.* 2010)

Una vez independizada de la silicua, la semilla permanece en estado de dormición y no germina hasta que un descenso en la concentración de ABA, vía catabolismo, lo permite (Kushiro *et al.* 2004). Por último, durante el estadio vegetativo, las condiciones de sequía, salinidad u otros tipos de estrés también estimulan la biosíntesis del ABA alcanzando concentraciones muy altas en tiempos de reacción cortos, de alrededor de 24 horas. Una vez superada la situación de estrés, por ejemplo en la rehidratación después de una sequía, la actividad catabólica restablece la normalidad fisiológica (Okamoto *et al.* 2009) (Fig. 4).

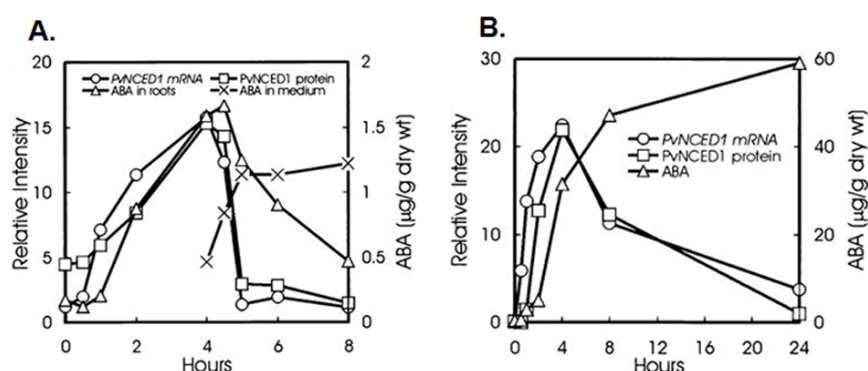


Fig. 4 Correlación entre la expresión de los genes *NCED1* con los niveles de ABA en un tratamiento por deshidratación y rehidratación en *Phaseolus vulgaris* L. (Qin and Zeevaart 1999)

1.2 Señalización del ABA

La concentración del ABA en la planta varía en momentos concretos del desarrollo como la maduración de la semilla o en respuesta a diferentes tipos de estrés. Su concentración endógena determina la división de sus funciones en aquellas que suceden rutinariamente e implican cambios en la actividad de canales de iones como el control diario del cierre de los estomas (*respuesta rápida*), y aquellas que ocurren asociadas a un importante aumento en la concentración de ABA endógeno e implican, además, cambios en la expresión génica como la maduración de las semillas, la latencia de yemas o la resistencia a sequía (*respuesta lenta*) (Finkelstein, *et al.* 2002). En ambas respuestas son comunes una serie de elementos que componen la cadena de señalización como los receptores PYR/PYL/RCAR, las fosfatasa PP2C, las kinasas SnRKs y algunos mensajeros secundarios, sin embargo, el incremento de ABA endógeno en la respuesta lenta está asociado a la acumulación de determinados factores de transcripción que determinan una respuesta especializada de los genes (Fig. 5). Así, la señalización de ABA puede afectar a la actividad de los canales de iones como KAT o SLAC1 provocando una despolarización y como consecuencia el cierre de los estomas, y llegar al núcleo a través de

factores de transcripción como ABI3 o ABI5 dónde acaba generando una respuesta génica (Raghavendra *et al.* 2010).

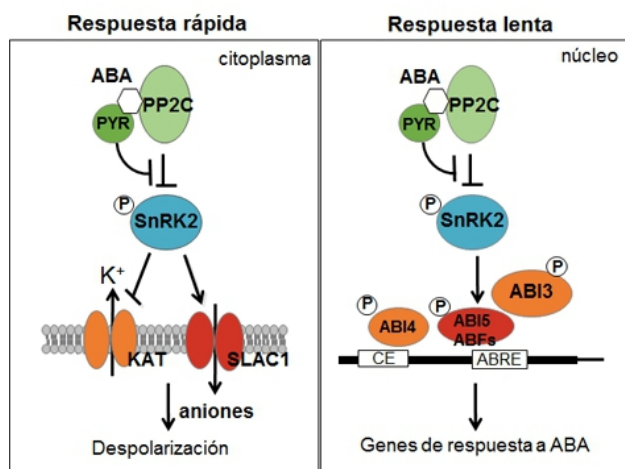


Fig. 5 Señalización del ABA a nivel de los canales de iones en la membrana (respuesta rápida) y en la respuesta génica en el núcleo (respuesta lenta) (Raghavendra, *et al.* 2010)

La respuesta génica (o respuesta lenta), también entendida como la respuesta del ABA a una situación de deshidratación celular, puede dividirse en dos estadios: semilla y planta (Fig.6). En el estadio de semilla el incremento de ABA endógeno causado por la deshidratación durante la maduración da lugar a la acumulación de factores de transcripción como ABI3, ABI4 y ABI5, especializados en la inducción de genes de semillas (*SSPs*) (Lopez-Molina *et al.* 2001, Lopez-Molina *et al.* 2002). Por otra parte, la producción de ABA endógeno en situaciones de estrés ambiental, y también biótico, durante el estadio vegetativo de la planta está asociado a la actividad de otros factores de transcripción de las familias AREBs/ABFs (ABRE Binding Factors) y DREBs/CBFs (C-repeat Binding Factor) que controlan la expresión de genes de respuesta a estrés (Fujita *et al.* 2011). Además, el reloj circadiano y las condiciones de luz parecen participar en la regulación de la expresión génica mediada por ABA afectando a la tolerancia y a la represión del crecimiento bajo condiciones de estrés (Fujita, *et al.* 2011).

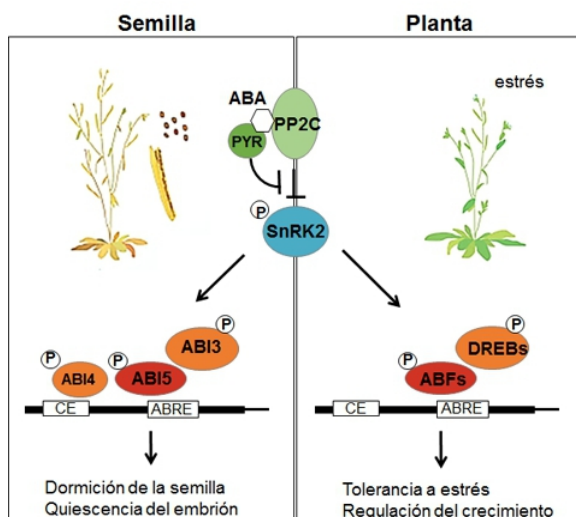


Fig. 6 Señalización del ABA durante la maduración de las semillas y una situación de estrés en la planta (Fujita *et al.* 2011)

Los mecanismos de transducción comunes a toda la señalización del ABA se conocen mejor hoy en día habiéndose establecido un modelo centrado en los receptores PYR/PYL/RCAR, las protein fosfatasa de tipo 2C (PP2C) y las protein kinasa SnRKs (Cutler *et al.* 2010). Si incluimos dentro de la señalización del ABA, además, la expresión génica determinada por los factores de transcripción y su regulación post-transcripcional a través de proteínas de unión a RNA podemos definir una red de reguladores *positivos* y *negativos* de la señalización hormonal del ABA (Fig. 7).

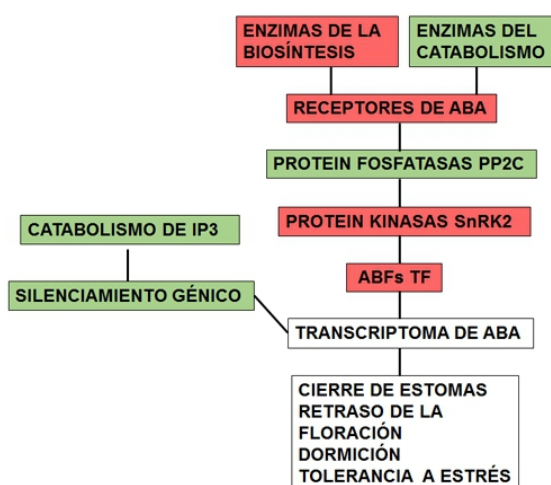


Fig.7 Esquema general de los reguladores conocidos en la señalización del ABA, en rojo, los reguladores positivos y, en verde, los negativos

1.2.1 Receptores de ABA

A pesar de la facilidad con la que se mueve el ABA entre las células como ácido débil, los ensayos de microinyección y análogos de ABA han demostrado la existencia de receptores específicos para la molécula, tanto intracelulares como extracelulares (Cutler, *et al.* 2010), pero su identificación ha tenido una mayor dificultad. En los inicios de su búsqueda, se describieron una gran variedad de proteínas cuyas uniones a ABA pocas veces han podido ser confirmadas por ensayos más precisos. A las familias multiméricas de receptores se suma la dificultad de cristalizar proteínas que se unen a membrana. Entre esos receptores están los, no poco discutidos, ABAR (ABA RECEPTOR)/CHLH/GUN5 y GTG1/GTG2 (GPCR-TYPE G). Ambas proteínas han sido descritas por unión a ABA mediante técnicas de marcaje radioactivo y aunque la validez de esta técnica ha sido discutida (Risk *et al.* 2008), los mutantes presentan fenotipo de respuesta a ABA (Shen *et al.* 2006). Pero, recientemente, la identificación de una clase única de receptores de ABA ha sentado las bases para el establecer una ruta principal de señalización por ABA. Se trata del descubrimiento, por cuatro grupos de investigación diferentes (Ma *et al.* 2009, Nishimura, *et al.* 2009, Park *et al.* 2009, Santiago *et al.* 2009) de las proteínas solubles PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance Proteins/ PYR-Like proteins/ Regulatory Components of ABA Receptor) cuya

cristalización, además, ha permitido aclarar su funcionamiento molecular al unirse a ABA y a las fosfatasa de tipo 2C como ABI1 (Miyazono *et al.* 2009).

Las proteínas agrupadas bajo el nombre PYR/PYL/RCAR pertenecen a una familia de 14 miembros en *Arabidopsis thaliana* que se clasifican en tres clases (I,II,III) y se caracterizan por poseer un dominio START (Iyer *et al.* 2001). Este dominio forma un bolsillo central hidrofóbico de unión a ligando al que se ha comprobado que se une el ABA en las proteínas PYR/PYL/RCAR. Esta unión provoca un cambio en la conformación del receptor que aumenta su afinidad por las fosfatasa de tipo 2C (PP2C), las más conocidas ABI1 (ABA INSENSITIVE 1), ABI2 (ABA INSENSITIVE 2) y HAB1 (HYPERSENSITIVE TO ABA 1), sobre las que actúa como un inhibidor (Yin *et al.* 2009) (Fig. 8).

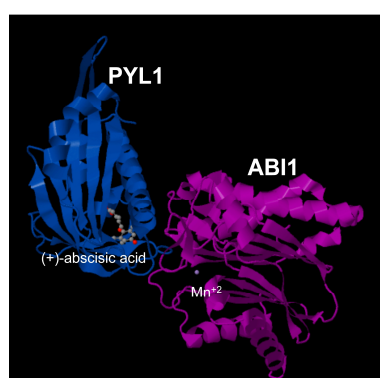


Fig. 8 Estructura tridimensional del cristal aislado del dímero PYL1-ABI1 en unión con los ligandos ABA y Mn^{+2} en *Arabidopsis thaliana* (Yin, *et al.* 2009)

La obtención del séxtuple mutante *pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8* cuyo fenotipo de germinación es insensible a concentraciones de ABA de 100 μ M da una idea del peso funcional de estos receptores (Gonzalez-Guzman, *et al.* 2012). Además, las proteínas PYR/PYL/RCAR son los únicos reguladores de la actividad enzimática de las PP2C descritos hasta ahora.

1.2.2 Protein fosfatasa de tipo 2C (PP2C)

Las fosfatasa específicas de Ser/Thr son las más comunes en plantas y entre éstas, el tipo 2C es el más abundante. Se trata de fosfatasa dependientes de un catión metálico (Mg^{+2} o Mn^{+2}) y, además, son insensibles a los inhibidores conocidos de las otras fosfatasa. Los ensayos enzimáticos han demostrado que son específicas de sustrato y experimentos de doble híbrido las han encontrado en interacción con varias otras proteínas SnRKs kinasas : ABI1 con OST1 (OPEN STOMATA 1)/SnRK2.6, diferentes PP2C con SnRK2.2 o ABI2 con CIPK15s (CBL-Interacting Protein Kinases)/SnRK3s.

Su unión también ha sido detectada mediante cristalografía en el caso de HAB1 con OST1/SnRK2.6 (Soon *et al.* 2012)(Fig. 9).

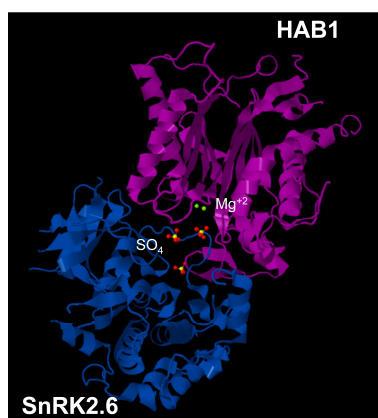


Fig. 9 Estructura tridimensional del cristal aislado del dímero HAB1-SnRK2.6 con los 3 ligandos sulfatos y uno de Mg^{+2} en *Arabidopsis thaliana* (Soon, et al. 2012)

De manera rutinaria, las PP2C inactivan a las kinasas SnRKs eliminando el grupo fosfato que las une. Pero, ante un aumento en la concentración de ABA, las PP2C quedan secuestradas por los PYR/PYL/RCAR y las nuevas fosforilaciones activan a las SnRKs (Umezawa *et al.* 2009, Vlad *et al.* 2009) quedando activa la vía de transducción al núcleo. La abundancia y especificidad de las interacciones PP2Cs-SnRKs hace pensar en que las PP2C puedan estar centralizando la recepción de ABA con diferentes líneas efectoras en respuesta a diferentes tipos de estrés (Umbrasaite *et al.* 2011). Se ha descrito, además, la interacción de PP2CA con el canal de K^+ AKT2 lo que sugiere que la señalización por ABA también puede controlar el transporte de iones en situaciones de estrés (Cherel *et al.* 2002).

1.2.3 Protein Kinasas de la superfamilia SNF (SnRKs)

En los procesos de señalización participan muchas kinasas ya que la fosforilación es de las modificaciones más rápidas y reversibles. Dos grupos de protein kinasas de la superfamilia SNK (Sucrose-Nonfermenting Kinases) están especialmente relacionadas con la señalización por ABA: las independientes de Ca^{+2} (SnRK2s) y las dependientes de Ca^{+2} (SnRK3s). Las SnRKs añaden un grupo fosfato a determinadas proteínas que se encuentran en el núcleo, como son los miembros de la familia de los factores de transcripción bZIP (ABF/AREB) (Furihata *et al.* 2006, Kobayashi *et al.* 2005), y en la membrana, como canales de iones que controlan la apertura de los estomas. Por lo que parece, esta actividad kinasa es bastante específica de sustrato y permite especializar la respuesta al estímulo como por ejemplo, la kinasa OST1 (Open Stomata 1)/SnRK2.6 que controla la apertura en las células de estomas (Mustilli *et al.* 2002) mientras que las kinasas SnRK2.2 y SnRK2.3 actúan en la geminación de la semilla y en el crecimiento de la raíz (Fujii *et al.* 2007). Pero

el triple mutante *snrk2.2-snrk2.3-snrk2.6*, cuya geminación es insensible a concentraciones de ABA de 50 μ M, deja clara la importancia de estas tres kinasas en la respuesta a ABA (Nakashima, *et al.* 2009).

1.2.4 Factores de transcripción

Los factores de transcripción conocidos que regulan directamente la respuesta génica a ABA son ABFs/AREBs (ABA binding factors/ ABA- Responsive Element Binding Factors), proteínas con dominio bZIP que reconocen secuencias de tipo ABRE (ABA Responsive Elements; ACGTGG/TC). El caso más estudiado es el de ABI5 (ABA INSENSITIVE 5) que fue encontrado a través del fenotipo de insensibilidad a ABA del mutante *abi5-1* (Finkelstein and Lynch 2000). Estos factores de transcripción son fosforilados por las protein kinasas SnRK2s lo que aumenta su afinidad por el DNA. Por otro lado, la inactivación de estos factores de transcripción parece depender de otra modificación basada en la adición de un grupo SUMO (Small Ubiquitin Related MODifier), la sumoilación, que realizan proteínas como SIZ1 (Miura and Hasegawa 2009). Otra proteína de la familia de las ABFs/AREBs conocida es ABF4/AREB2; en este caso las protein kinasas dependientes de Ca^{+2} (SnRK3s) se encargan de su activación (Zhu *et al.* 2007).

Otro factor de transcripción que contribuye a la señalización del ABA es ABI3 (ABA INSENSITIVE 3), el cual posee un dominio de tipo B3 y cuyos mutantes *abi3* presentan un grave fenotipo de viviparismo, es decir, su semilla germina antes de separarse de la planta madre (Parcy *et al.* 1994). Se cree que su unión a ABI5 en un complejo ABI3-ABI5 pueda estar potenciando la transcripción de los genes de respuesta a ABA (Lopez-Molina, *et al.* 2002).

También se conoce la acción positiva de algunos reguladores de tipo MYC/MYB y la de ABI4 (ABA INSENSITIVE 4), un factor de transcripción de tipo AP2/APETALA (Finkelstein, *et al.* 1998) cuyo mutante *abi4-1* presenta un desarrollo alterado de la semilla.

Curiosamente, dentro de los factores de transcripción se conoce un caso de bucle auto-regulatorio donde un factor de transcripción b-ZIP (AtBH6) interacciona directamente con una PP2C (ABI1) reactivándola y suprimiendo, por lo tanto, la respuesta a ABA (Himmelbach *et al.* 2002).

1.2.5 Cambios epigenéticos asociados a la respuesta a ABA

El ABA tiene un comportamiento pleiotrópico en la respuesta génica causando muy diferentes fenotipos en las plantas mutantes. Esto puede indicar la participación de reguladores de remodelación de cromatina, lo cual está siendo motivo de investigación actualmente. Algunos cambios en la metilación de la cromatina y las modificaciones de histona ya han sido asociados a condiciones de crecimiento de estrés en plantas y células en cultivo (Manzanero *et al.* 2002, Sokol

et al. 2007). Además, se ha visto que los niveles de varias marcas epigenéticas ligadas a la activación de la transcripción como las acetilaciones de la H3 aumentan en genes de respuesta a estrés como *RD29A*, *RD29B*, *RD20* y *RAP2.4* bajo condiciones de estrés salino (Kim *et al.* 2008).

Algunas funciones fisiológicas del ABA han sido directamente relacionadas con la actividad de remodeladores de la cromatina como las deacetilasas de la histona H4 en el cierre estomático (Chinnusamy *et al.* 2008) o la monoubiquitinación de la histona H2 en la síntesis del ABA (Liu *et al.* 2007). El análisis de la distribución global de H3K27me3 en el genoma de *Arabidopsis*, modificación a la que se asocia a una represión transcripcional tanto en plantas como en animales, ha revelado que los genes de expresión específica de semilla (*SSPs*) exhiben un enriquecimiento en esta marca epigénica durante el estadio vegetativo (Zhang *et al.* 2008). En este sentido, algunos mutantes de los componentes del complejo PcG (Polycomb-Group) que participan en esta modificación como *fie* presentan mayores niveles de estos transcritos en fase vegetativa lo cual indica que la remodelación epigénica del PcG a través de la H3K27me3 sea un mecanismo de control de la transición de semilla a planta (Bouyer *et al.* 2011).

Además, ha sido descrita la unión de la fosfatasa HAB1 a SWI3B que forma parte del complejo de remodelación de cromatina lo que sugiere que exista, incluso, una relación directa de la acción de las PP2C sobre la cromatina en la regulación transcripcional de la respuesta a ABA (Saez A *et al.* 2006).

1.2.6 Respuesta génica

Los factores de transcripción activados por las kinasas en respuesta a ABA reconocen determinados promotores y su unión a ellos atrae a la RNA polimerasa que los transcribe abundantemente. En *Arabidopsis thaliana*, aproximadamente un 10% de los genes se activan en respuesta a ABA, curiosamente, otro 10% de genes se reprime (Matsui *et al.* 2008). Entre los genes que se activan se encuentran, genes que codifican para componentes del propio sistema de señalización, como *ABA1*, *PYR/PYL/RCARs*, *ABI1*, *ABI2* o *SnRKs*, genes de enzimas de la pared celular, como *LOX4* (*LIPOXIDASE 4*), *LTP3* (*LIPID TRANSFER 3*) o *PLC* (*PHOSPHOLIPASE C*), genes de proteínas que protegen a la célula contra la deshidratación, como los *LEAs* o las deshidrinas *COR47* (*COLD RESPONSE 47*), genes de metabolismo, como la *CHI* (*CHITINASE*), y genes que codifican para otros factores de transcripción. Los niveles de inducción (*fold induction* o *induction factor*) de estos genes a veces son muy altos y están caracterizados por lo que se usan como marcadores, por ejemplo *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 29A*), *RD20* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 20*) o *RAB18* (*RAB GTPASE HOMOLOG 18*).

Entre los genes de factores de transcripción que se inducen y participan en la respuesta se han caracterizado alrededor de 20 familias génicas, los más importantes: genes del homeodominio *HD-ZIP* (Ariel *et al.* 2007), miembros de la familia de los *NAC* (Fujita *et al.*, 2004), miembros de los *WRKY* (Xie *et al.* 2005), genes *bHLH* (basic hélix-loop-helix), genes *DREB* (Drought Response Elements Binding) y factores de transcripción Zn-Finger. Actualmente, se intenta aclarar la especialización de la respuesta que determinadas familias de factores de transcripción pueden tener según el estímulo sea, por ejemplo, un determinado tipo de estrés o un estadio de desarrollo como la dormición.

1.2.7 Silenciamiento génico post-transcripcional

Algunas proteínas de unión a RNA han sido encontradas en búsquedas de mutantes con fenotipo hiperinducido o hipersensible. Algunos ejemplos son la exoribonucleasa 5'-3' específica de la secuencia CAP del mensajero ABH1 (ABA HYPERSENSITIVE 1) cuyo mutante *abh1* acumula el transcrito producto de genes *PP2C* (Hugouvieux, *et al.* 2001), y la exonucleasa 3'-5' específica de poli(A) AHG2 (ABA HYPERSENSITIVE AT GERMINATION) cuyo mutante *ahg2* acumula transcrito de varios genes de respuesta a ABA (Nishimura *et al.* 2005). Estas proteínas actuarían como reguladores negativos, silenciando en condiciones normales, a los transcritos de genes de estrés.

1.2.8 Mensajeros secundarios: los PIPs

Los fosfatidilinositolfosfato (PIPs) son productos de la fosforilación de los fosfatidilinositoles (PtdIns) en las posiciones 3, 4 y 5 de la cabeza del lípido. Su metabolismo ha sido descrito en animales donde diferentes kinasas dan lugar a los fosfatidilinositoles mono-fosfato: PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P; bifosfato: PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂; y al trifosfato: PI(3,4,5)P₃. Con la excepción del PI(3,4,5)P₃, todas las demás especies han sido encontradas también en plantas (Meijer and Munnik 2003)(Fig. 10).

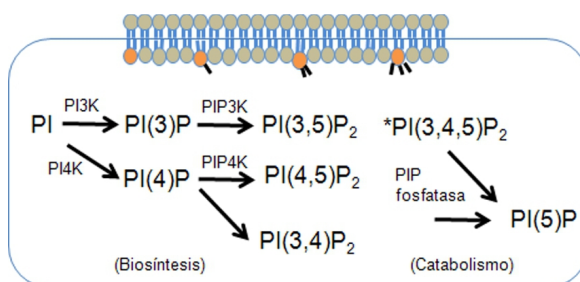


Fig. 10 Metabolismo de los PIPs.

Se ha descubierto que los PIPs funcionan como segundos mensajeros de la señalización intracelular y extracelular. Sus diferentes especies funcionarían como ligandos específicos de un buen número de proteínas modificando su actividad o su localización (Meijer and Munnik 2003). Mediante marcaje radioactivo se ha visto que su abundancia y distribución cambia en diferentes estadios de desarrollo y condiciones ambientales. La especie de PI(5)P aumenta bajo tratamientos de estrés debido a un aumento en la actividad catalítica desde los diferentes precursores por acción de enzimas fosfatasa de PIPs como la PLC (Fosfolipasa C). La distribución de los PIPs se asocia con un cambio en la movilidad de la cadena lateral de su ácido graso como se ha visto en la especie PI(4,5)P₂ en condiciones de estrés hiperosmótico (Konig *et al.* 2007).

El análisis de los mutantes en alguna especie de PIP ha revelado su relevancia en funciones fisiológicas, de desarrollo y de respuesta a estrés siendo PI(4,5)P₂ la más descrita. El mutante *fra3* que afecta a una fosfatasa de PI(4,5)P₂, se caracteriza por tener débiles paredes celulares en el tejido vascular que provocan unos tallos débiles (Zhong *et al.* 2004). Otros ejemplos son las plantas mutantes para las kinasas de PI(4,5)P₂, *pip5K4*, en las que se ve afectado el cierre estomático (Lee *et al.* 2007) o para PI(3,5)P₂, *pip5k3*, en las que el crecimiento de los pelos radiculares está reducido (Stenzel *et al.* 2008). La relación con la respuesta a estrés se ve clara en el fenotipo constitutivo de estrés del mutante de una fosfatasa que acumula este PI(4,5)P₂, *sac9* (Williams, *et al.* 2005). Mediante el uso de reporteros fluorescentes se pudo observar esta especie PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática de las células de los pelos radiculares (Vincent *et al.* 2005). Entre las uniones lípido-proteína conocidas llama la atención la implicación del dominio PH (PLECKTRIN HOMOLOGY) que se encuentra en numerosas proteínas de unión a lípido en animales y en plantas, como la PI4K de *Arabidopsis thaliana* que se une específicamente a PI(4)P (Mueller-Roeber and Pical 2002, Stevenson *et al.* 1998). Este dominio puede unirse a lípidos y a otras proteínas, además, en animales se ha visto que proteínas con dominio PH que se unen a la misma especie lipídica se localizan en diferentes sitios dependiendo de la proteína a la que se unen (Varnai *et al.* 2005), un hecho que todavía no ha sido demostrado en plantas.

1.3 Funciones del ABA

El ABA es una hormona esencial para el desarrollo de la planta y sus funciones han sido abordadas desde diferentes puntos debido a su interés agronómico. Sabemos que es necesario durante el crecimiento de la planta, en su capacidad de respuesta a cambios medioambientales y que controla el desarrollo en estadios clave para su supervivencia. Todos los mutantes deficientes de ABA aislados hasta la fecha son pleiotrópicos lo que es indicativo de la complejidad funcional de este regulador del crecimiento. Además, muchos mutantes insensibles a ABA tienen niveles alterados de la hormona, ya que algunos genes de la biosíntesis están regulados por estos mismos genes de señalización, lo que significa que el metabolismo del ABA está sujeto a un bucle regulatorio (Finkelstein, *et al.* 2002). No obstante, la homeostasis del ABA se describe como un proceso complejo y se conoce poco acerca de la especificidad de tejido y la compartimentación subcelular de sus reguladores.

1.3.1 Control del crecimiento

El ABA regula la homeostasis del crecimiento durante toda la vida de la planta y su falta en mutantes como *aba1* provoca fenotipos de enanismo. Pero, en altas concentraciones, el ABA tiene un efecto drástico sobre la división celular, concretamente, sobre la fase G1 donde las células quedan retenidas (Swiatek *et al.* 2002). Al igual que de manera exógena el ABA deja el meristemo radicular y las yemas florales en estado quiescentes, la elevada concentración de ABA en las semillas retiene las células del embrión en la fase G1, impidiendo la replicación y el progreso del ciclo celular (Gendreau *et al.* 2008, Sanchez Mde *et al.* 2005).

Se han estudiado las posibles dianas, reguladores del ciclo celular sobre los que puede actuar el ABA, no obstante, es una cuestión todavía pendiente de una investigación profunda. Uno de los reguladores que participan en el ciclo celular es la proteína CDT1A, una proteína de iniciación de la replicación cuya expresión se ha visto que se reprime con la aplicación de ABA y en condiciones de sequía (Castellano Mdel *et al.* 2004). Otros reguladores del ciclo celular cuya expresión se ve afectada por el ABA o condiciones de estrés son la kinasa *CDKA*, y los inhibidores *KRP* y *SIAMESE* (Pettko-Szandtner *et al.* 2006, Schuppler *et al.* 1998, Wang *et al.* 1998).

Tal vez, como consecuencia, el ABA también afecta a la salida a endoreplicación del ciclo celular. Así, se ha demostrado que tratamientos con ABA y estrés por sequía hacen disminuir la ploidía durante el desarrollo de la hoja. Contrariamente, la aplicación de GA hace aumentar la ploidía, lo que se manifiesta con un mayor número de ramificaciones en los tricomas (Hulskamp *et al.* 1999, Skirycz *et al.* 2011).

1.3.2 Dormición o inhibición de la germinación

La dormición de las semillas es una propiedad de quiescencia y tolerancia a desecación que les permite sobrevivir a condiciones no favorables para la germinación. Su intensidad y duración es característica de cada la especie siendo adquirida tras años de evolución. Así, semillas de la misma especie que se han desarrollado en localizaciones geográficas distintas han adaptado su dormición a las condiciones del lugar. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, las semillas tienen una dormición no profunda que desaparece a las pocas semanas después de la recolección. En cambio, las semillas de la subespecie *Arabidopsis Cvi* originaria de las islas Cabo Verde poseen una dormición más profunda, de meses (Cadman *et al.* 2006). El estado de *dormición* es causado por una alta concentración de ABA en la semilla lo cual está controlado principalmente a través de los genes de su metabolismo, *NCEDs* (síntesis) y *CYP707As* (catabolismo) (Lefebvre, *et al.* 2006, Millar, *et al.* 2006). La *dormición primaria* es aquella que se adquiere durante la maduración de la semilla, cuando el embrión alcanza más o menos su tamaño final, en la planta madre y forma parte del programa de desarrollo. También puede existir una *dormición secundaria* desarrollada en la semilla ya madura y no-durmiente (after-ripening) causada por estímulos externos de condiciones desfavorables. En ambos casos, el aumento de ABA lo produce la propia semilla (Kanno, *et al.* 2010) y se sabe que varios factores de transcripción con expresión específica participan en esta etapa. Entre ellos, además de los factores de transcripción ABI4 y ABI5 se sabe que participan las proteínas con dominio B3: ABI3, LEC1 (LEAFY COTYLEDON 1), y FUS (FUSCA), responsables de la inducción de genes de proteínas de almacenaje o *SPP* (Seed Storage Proteins), lípidos y ácidos grasos que se acumulan en las células vacuolizadas del endospermo de la semilla (Monke *et al.* 2012, Nambara *et al.* 2000, Parcy *et al.* 1997, Reeves *et al.* 2011). Así, las semillas mutantes *abi3*, *lec1* y *fus* acumulan menos proteínas *LEAs* (Late Embryogenesis Abundant) y germinan prematuramente si se las extrae de la siliqua (To *et al.* 2006). No obstante, los niveles de transcrito de estos genes y de los *LEAs* no aumentan en esta fase lo que indica la relevancia de procesos post-traduccionales en la dormición de la semilla (Baumbusch *et al.* 2004).

El paso de *semilla durmiente* a *no-durmiente* está determinado por una bajada en la concentración de ABA y su germinación está determinada por un aumento en la concentración de GA. La *germinación* se define estrictamente como la emergencia de la radícula a través de la testa de la semilla lo que define el punto en el que el balance ABA/GA se ha decantado hacia las GA. Este paso está determinado genética y ambientalmente. Así, la hidratación de la semilla (*imbibición*), la luz o un tratamiento de estratificación (*chilling*) fomentan la acumulación de GA. La *estratificación* es un tratamiento de baja temperatura, en general 4°C y oscuridad, que suele usarse previamente a la siembra de las semillas de *Arabidopsis* en investigación. A pesar de la preponderancia del balance ABA/GA en la transición de dormición a germinación, otras hormonas

que participan promoviendo la germinación son el etileno, los brasinoesteroides (BRs) y el óxido nítrico (NO) (Alboresi *et al.* 2005, Beaudoin *et al.* 2000, Clouse and Sasse 1998).

1.3.3 Inhibición de la floración

Un buen número de plantas mutantes deficientes de ABA e insensibles han sido descritas con fenotipo de floración adelantada (*early flowering*), lo que indica un papel del ABA en la regulación de la transición de estadio vegetativo al reproductivo. Un trabajo que fue más tarde retractado propuso que el ABA regulaba directamente la floración mediante su unión a FCA, una proteína de unión a RNA (Razem *et al.* 2006). Aunque esta unión se ha comprobado que no se produce, los demás resultados de este trabajo son coherentes y describen que la aplicación de ABA reduce los tiempos de floración de la planta de una manera correlativa con el aumento de expresión de *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), el más importante represor floral. En la misma dirección, se ha visto que esta inhibición está mediada por las proteínas DELLA, reguladores negativos de la señalización de GA (Achard, *et al.* 2006). Recientemente, se ha publicado que *FLC* es, además, un represor de la transición de semilla a plántula que supone la germinación. Este trabajo relaciona las variaciones naturales que existen del locus de *FLC* con las diferencias en la dormición de sus semillas y describe un pico de expresión de *FLC* durante la maduración de la semilla que correlaciona con un cambio en la expresión del gen *CYP70A2* del catabolismo del ABA (Chiang *et al.* 2009).

1.3.4 Respuesta a estrés

El ABA se define como una hormona de estrés por su rápida síntesis tras diferentes tratamientos de estrés y desactivación una vez que el estrés ha pasado. Evita el daño en los tejidos dirigiendo una respuesta fisiológica y génica para la supervivencia de la planta. Además de su acción a nivel celular, el ABA actúa como una señal a larga distancia transportándose a través del xilema en respuesta a sequía, desde las raíces hasta la parte aérea (Hartung *et al.* 2002).

Su responsabilidad en la respuesta a sequía y su efecto sobre el cierre estomático ha sido extensamente descrito aunque también regula la respuesta a otros tipos de estrés conocidos: osmótico, salino, por frío, por hipoxia, por radiación UV, por herida o por patogénesis (Chan 2012, Lee and Luan 2012). La respuesta a estrés ha sido clásicamente dividida en respuesta *dependiente* o *independiente de ABA* según el tratamiento de estrés reproduzca o no los cambios de expresión asociados a una aplicación exógena de ABA. En este tipo de ensayos se han clasificado multitud de genes de estrés según su actividad en diferentes tratamientos como los genes de respuesta a frío (*CORs*), desecación (*RDs*) o patogénesis (*PRs*) en cuya regulación están complejamente intrincadas varias rutas de señalización hormonales donde el ABA comparte esta función con otras hormonas

como el SA (ácido salicílico) en la respuesta a patógeno (Durrant and Dong 2004) o el JA (ácido jasmónico) en la respuesta a mordedura o herida (Suza and Staswick 2008).

1.3.5 Funciones ligadas al reloj circadiano

El reloj circadiano es un sistema molecular altamente conservado en organismos superiores, que se caracteriza por un sistema de bucles de auto-regulación negativa, principalmente, transcripcionales. Actúa con autonomía en la sincronización de funciones fisiológicas a lo largo del día en función de las fluctuaciones ambientales externas como la luz o la temperatura que “aprende” en las primeras horas de vida de la plántula (“entrainment”) (McClung 2006). El movimiento de las hojas, la apertura y cierre de estomas, la activación de la fotosíntesis o el paso de la fase vegetativa a la fase reproductiva son actividades fisiológicas controladas por el reloj circadiano aunque se calcula que tiene influencia, más o menos directa, sobre la mayoría de actividades (Covington *et al.* 2008).

En plantas, el principal bucle auto-regulatorio está basado en la recíproca regulación de *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*) con *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) y *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTIL*) (Alabadi *et al.* 2001). Más tarde se han descrito otros bucles interconectados que explican la robustez del sistema (Fig. 11).

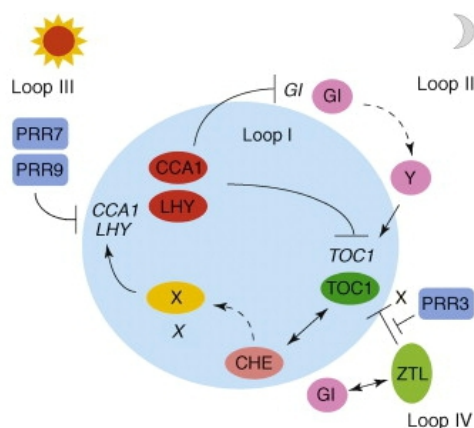


Fig. 11 Esquema de los principales bucles regulatorios del reloj circadiano

Como organismos sésiles, el reloj circadiano tiene un papel muy notable en plantas y está especialmente conectado con redes de señalización hormonal. Un ejemplo de esta estrecha relación es la regulación de la apertura y cierre de estomas diariamente. Esta actividad depende de las necesidades de transpiración de la planta pero no es totalmente dependiente de estímulo, sino que, a su vez, está supeditada a la regulación por el reloj circadiano que limita la sensibilidad a la hormona a la fase diurna cuando se producen las horas de mayor calor. Esta restricción en el horario de respuesta a estímulo se denomina “gating”. Como síntoma de esto se han registrado fluctuaciones diarias en las concentraciones de hormonas como el ABA en varias especies de

plantas (Cornforth, *et al.* 1966, Novakova *et al.* 2005) así como en la concentración de Ca^{+2} citoplasmático (Dodd *et al.* 2007). La existencia de la regulación de la señalización por el ABA se demuestra claramente por la alta proporción de genes encargados de la regulación hormonal que se transcriben circadianamente. Cerca de un 40% de los genes inducidos por ABA tienen regulación del reloj circadiano, la mayoría de los cuales se expresan en las primeras horas de la mañana subjetiva. Contrariamente, cerca de un 40% de los genes activados por su antagónico, la giberelina (GA), se expresa circadianamente en las últimas horas del día estableciéndose una separación temporal para funciones opuestas (Covington, *et al.* 2008) (Fig. 12)

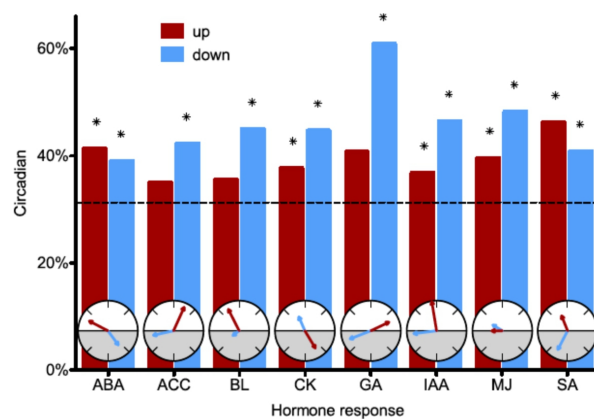


Fig. 12 Proporciones de genes de señalización hormonal que son regulados por el reloj circadiano y horas del día (blanco) y de la noche (gris) en las que se expresan (Covington, *et al.* 2008)

La manera en que el reloj circadiano regula la actividad de las redes hormonales se empieza a conocer gracias a publicaciones recientes donde se señalan varios componentes de la regulación del ABA como objetivos directos de la regulación de *TOC1* (Huang *et al.* 2012). Pero, al mismo tiempo, el ABA también ejerce una regulación transcripcional menos conocida de algunos componentes del reloj circadiano. Uno de ellos es *TOC1*, el cual se induce fuertemente por ABA y participa en la resistencia a deshidratación cuando la planta sufre estrés por sequía (Legnaioli *et al.* 2009).

2. El dominio GRAM

La respuesta transcripcional que las diferentes condiciones de estrés o el ABA desencadenan en el núcleo genera la aparición de una serie de proteínas, muchas de las cuales tienen una función desconocida. Entre ellas, las proteínas del dominio GRAM (Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and mytotubularins) han sido identificadas en varios tipos de respuesta a estrés en plantas (Jiang *et al.* 2008). Este dominio, descrito en el año 2000, fue caracterizado en organismos como *C. elegans*, *Drosophila* o humanos formando parte de proteínas con actividad transferasa, activadora de GTPasa o fosfatasa que se encontraban asociadas a la membrana celular (Doerks *et al.* 2000). No obstante, las proteínas que contienen este dominio en plantas no encajan en esta definición y se desconoce su función en la mayoría de los casos. Dentro de este grupo de proteínas con dominio GRAM vegetales se encuentra la proteína GEM (GL2 EXPRESSION MODULATOR) la cual ha sido identificada en nuestro laboratorio por su interacción con los dos homólogos de CDT1 en *Arabidopsis* los cuales participan en la regulación de la replicación del DNA en todos los organismos (Caro *et al.* 2007) y cuya expresión se inhibe por ABA (Castellano Mdel, *et al.* 2004).

2.1 Filogenia y taxonomía del dominio GRAM

Desde su descripción, las bases de datos europeas como PFAM (Sanger Institute, UK) han recogido cerca de 1500 secuencias que poseen este dominio en las 255 especies de organismos secuenciados. Este dominio de unos 70 aminoácidos es un dominio antiguo encontrándose ya un gen con esta secuencia en las primeras *Archaeas* desde donde ha seguido diversificándose especialmente en eucariotas (Fig. 13). En estos organismos es frecuente encontrar varias

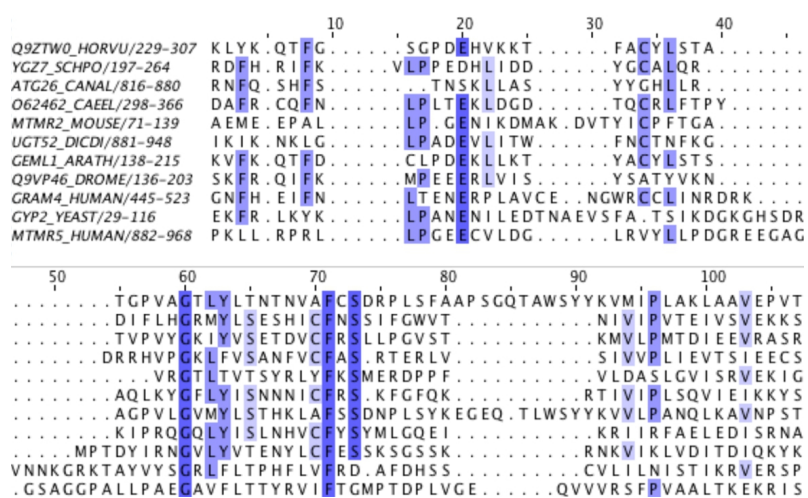


Fig. 13 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio GRAM en proteínas de diferentes organismos (en violeta, niveles de conservación)

duplicaciones en el mismo genoma las cuales han asumido diferentes patrones de expresión, esto debe haber asegurado su expansión (Jiang, *et al.* 2008). El nivel de conservación del dominio entre organismos es bajo, de hecho, sólo una glicina se mantiene conservada en todos, lo que significa que la secuencia ha sufrido variaciones a lo largo de su evolución (Fig. 13).

Entre las proteínas que lo poseen el dominio GRAM puede encontrarse como un dominio único o asociado a otros dominios adoptando diversas arquitecturas. Entre los dominios con los que se asocia se encuentran: el dominio glucosiltransferasa como ocurre en la proteína UGT51 de *Saccharomyces cerevisiae*, el dominio TBC asociado con la activación de las proteínas Rab-GTPasas en varios organismos, el dominio C2 también presente en plantas, el dominio fosfatasa de fosfolípidos encontrado en miotubularinas, el dominio PH (PLECKSTRIN HOMOLOGY) con el que se relaciona estructuralmente o dominio WD40 de unión a otras proteínas (Jiang, *et al.* 2008) (Fig. 14).

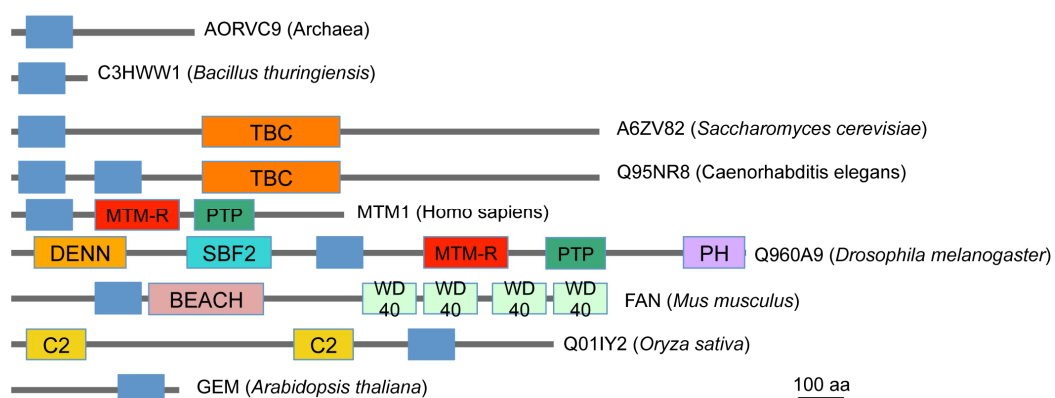


Fig. 14 Arquitectura de algunas proteínas que contienen el dominio GRAM en varios organismos

En *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína UGT51 está implicada en procesos de autofagia a través de la síntesis de PI(4)P que es requerida para la degradación del peroxisoma (Yamashita *et al.* 2006). En humanos, este dominio ha sido relacionado con la unión a fosfoinosítoles y forma parte de las proteínas miotubularinas donde se piensa que participe en la localización subcelular de otras proteínas y en su actividad (Begley *et al.* 2003, Choudhury *et al.* 2006, Laporte *et al.* 1998). En plantas, ABA45 de *Hordeum vulgare* (cebada) fue el primer miembro de la familia GRAM aislado donde se vió que su expresión era específica de la aleurona de la semilla y que era inducida por el ABA (Liu *et al.* 1999).

2.2 Estructura terciaria del dominio GRAM, las miotubularinas

Las miotubularinas (MTM) y las proteínas relacionadas con las miotubularinas (MTMR) forman parte de la superfamilia de las protein- tyrosine fosfatasas (PTPs) que participan en varios procesos celulares como el crecimiento, el metabolismo, la diferenciación, la motilidad y la muerte programada. El sustrato sobre el que actúan todas las PTPs es siempre una proteína fosforilada salvo en el caso de este grupo de proteínas miotubularinas cuyo sustrato es un fosfoinositol (Laporte, *et al.* 1998). Además del dominio PTP estas proteínas poseen un dominio GRAM en la parte N-terminal de su secuencia.

Desde su descubrimiento, se han identificado 14 proteínas de este grupo en humanos donde han sido, con diferencia, más estudiadas en la lucha contra la enfermedad muscular que provoca su alteración genética denominada Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (Bolino *et al.* 2000). Sorprendentemente, algunas de las proteínas MTMR contienen sustituciones en su dominio fosfatasa que las hacen inactivas como fosfatasas pero que han sido conservadas a lo largo de la evolución y que cuya mutación también se ha visto que causa miopatía por lo que se piensa tengan una función biológica (Senderek *et al.* 2003). Algunos datos indican que funcionan como adaptadores para los miembros activos de la familia alterando su localización o actividad (Robinson and Dixon 2005).

La estructura del cristal de la proteína MTMR2 (MYOTUBULARIN-RELATED PROTEIN 2) ha puesto en evidencia el parecido de la conformación del dominio GRAM con el dominio estructural PH (PLECKSTRIN HOMOLOGY). Los 70 aminoácidos del dominio GRAM conformarían 5 cadenas β que se integrarían como una parte de las 7 cadenas β y una hélice α de los 110 aminoácidos del dominio PH. Ambos dominios han sido renombrados como dominio estructural GRAM/PH (Begley, *et al.* 2003) (Fig. 15).

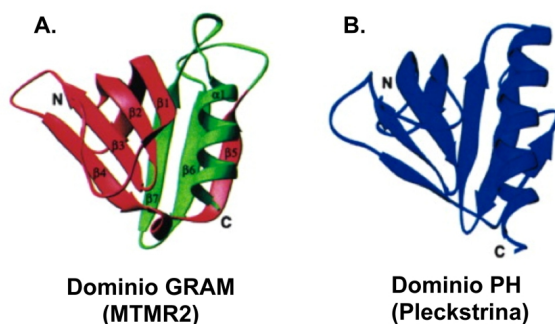


Fig. 15 Estructura tridimensional del dominio GRAM/PH en dos proteínas cristalizadas. A, dominio GRAM (rojo) y dominio PH (rojo + verde) en la proteína MTMR2 de humanos. B, dominio PH en la proteína pleckstrina de humanos (Begley *et al.*, 2003)

El dominio estructural PH es común a varias proteínas que no comparten similitudes de secuencia significativas. Lo poseen proteínas con funciones de unión a fosfolípido, de unión a fosfotirosina y mediadoras en la unión de proteínas (Pawson 1995).

2.3 Unión a fosfolípido de las miotubularinas MTM y las MTMR

Se ha visto en una gran variedad de casos que las proteínas MTM y MTMR de humanos desfosforilan específicamente a los fosfolípidos PI(3)P y PI(3,5)P₂ a través de su dominio catalítico fosfatasa (Taylor et al. 2001, Blondeau et al., 2000, Zhao et al., 2001, Walker et al., 2001; Kim et al., 2002 Berger et al., 2002; Schaletzky, et al., 2003). La unión a estos segundos mensajeros se ha relacionado con funciones de señalización, tráfico vesicular y respuesta a estrés celular (Taylor et al. 2000). Además, esta unión a fosfolípido ha podido observarse estructuralmente en la proteína cristalizada MTMR2 donde se han registrado las dos uniones: a PI(3) y a PI(3,5) a través del bolsillo que forma el dominio fosfatasa que estas proteínas poseen (Begley, et al. 2003). A diferencia de las otras fosfatasas PTPs, el bolsillo de unión es más profundo lo que parece conferir especificidad por el sustrato fosfolípido. Por la posición del dominio GRAM/PH en la estructura se piensa que tenga un contacto con la membrana, idea reforzada por estudios de incorporación de deuterio para conocer la parte accesible de la estructura y de polarización y que indican que el dominio GRAM/PH posee zonas accesibles para solventes y cargadas positivamente en sus cadenas $\beta 5/\beta 6/\beta 7$ y $\alpha 1$. No obstante, el dominio GRAM/PH no ha sido cristalizado unido a fosfolípidos por lo que se piensa que se trate de una unión de baja afinidad que contribuye a la unión a sustrato mediante interacciones electroestáticas (Begley et al. 2006). Por lo tanto, la función del dominio GRAM/PH en la proteína humana MTMR2 no queda clara pero sí se sabe de su importancia funcional ya que acumula algunas mutaciones son causantes del Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (Fig. 16).

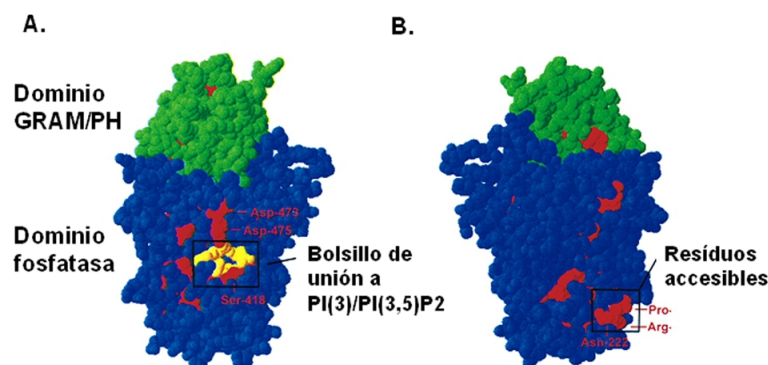


Fig. 16 Estructura en superficie del cristal de MTMR2 y de la localización de las mutaciones que causan enfermedad (rojo). A, vista donde se aprecia el sitio activo del dominio fosfatasa (amarillo). B, vista de la proteína con una rotación de 180° respecto de la figura A.

La actividad fosfatasa de las miotubularinas humanas estudiadas es muy específica. Un ejemplo es la miotubularina MTMR6 de la que se ha descrito que inhibe específica y exclusivamente a la proteína del canal de potasio KCa3.1 mediante la desfosforilación de PI(3)P (Srivastava *et al.* 2006). El estudio de proteínas quiméricas de los diferentes dominios GRAM/PH y fosfatasa ha permitido saber que la especificidad de sustrato y de localización se debe al dominio GRAM/PH. Así, proteínas construidas a partir de otras miotubularinas a las que se sustituye el dominio GRAM/PH por el de la miotubularina MTMR6 funcionan como la misma MTMR6. La imposibilidad de detectar interacción significativa del dominio GRAM/PH con fosfoinosítoles sugiere que este dominio debe unirse a otra proteína (Choudhury, *et al.* 2006).

Objetivos

1. Caracterización del dominio GRAM en la proteína GEM de *Arabidopsis thaliana*
2. Descripción del patrón temporal y espacial de expresión de *GEM*
3. Caracterización de la proteína GEM y su localización subcelular
3. Identificación de genes diana de GEM a nivel genómico
4. Estudiar la implicación de GEM en el reloj circadiano
5. Estudiar la implicación de GEM en la señalización por ABA

Materiales y métodos**Material vegetal**

Para este trabajo se han empleado semillas y plantas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia (Col-0), Wassilewskija (Ws-2) y Landsberg erecta (Ler). Para el estudio de la función de GEM hemos usado una línea homocigota de inserción de T-DNA *gem-1* (SALK_145846) y una línea sobreexpresora *GEMoe* obtenidas y descritas anteriormente (Caro *et al.* 2007). Para el estudio de la regulación de *GEM* por el reloj circadiano hemos usado una línea mutante de RNAi de CCA1 y CCA1 (*cca1lhy*) y una línea sobreexpresora (*CCA1ox*) además de los cruces de plantas *gem-1* y *GEMoe* con la planta portadoras del gen reportero *LUC* bajo el promotor de *TOC1*, todo ello gracias a la colaboración del laboratorio de Paloma Mas. Para el estudio de la regulación de *GEM* por ABA hemos usado varias líneas de plantas insensibles a ABA amablemente proporcionadas por los laboratorios de Roberto Solano (*abi1-2*), Pedro Rodríguez (*hab1-1 abi1-2, pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8, snrk2.2-snrk 2.3-snrk 2.6*) y Óscar Lorenzo (*abi1-1, abi3-1, abi4-1, abi5-1*). Además hemos usado dos líneas de plantas con el gen reportero *GUS* bajo dos tamaños distintos del promotor de *GEM*, *GEM²⁰⁴⁹:GUS* y *GEM²⁷⁷⁴:GUS* desarrolladas por Elena Caro y Antonio Pichel, respectivamente, en este laboratorio (Tabla 2).

El crecimiento de las plantas menores de 10 días de edad, incluidas las semillas, se llevó a cabo en placas estériles de 0,8% de agar suplementadas con sales MS y 1% de sacarosa bajo condiciones de luz de día largo (16L/8D) a 22°C y 70% de humedad relativa. Las plantas mayores de 10 días fueron cultivadas en maceta con una mezcla 3:1 de tierra y vermiculita bajo las mismas condiciones.

Tabla 2: Genotipos de *Arabidopsis thaliana* usados:

	Línea mutante	Ecotipo	Tipo	Descripción
GRAM	<i>gem-1</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Caro, <i>et al.</i> 2007)
	<i>GEMoe</i>	Col-0	transgen <i>35S:HA-GEM</i>	(Caro, <i>et al.</i> 2007)
	<i>GEM²⁰⁴⁹:GUS</i>	Col-0	transgen <i>GEM²⁰⁴⁹:GUS</i>	No publicado
	<i>GEM²⁷⁷⁴:GUS</i>	Col-0	transgen <i>GEM²⁷⁷⁴:GUS</i>	No publicado
Reloj circadiano	<i>TOC1:LUC</i>	Col-0	transgen <i>TOC1:GUS</i>	(Millar <i>et al.</i> 1992)
	<i>gem-1 x TOC1:LUC</i>	Col-0	mutante T-DNA x transgen <i>TOC1:GUS</i>	No publicado
	<i>GEMoe x TOC1:LUC</i>	Col-0	transgen <i>35S:HA-GEM</i> x transgen <i>TOC1:GUS</i>	No publicado

	<i>cca1lhy</i>	Ws-2	Factor de transcripción	(Alabadi <i>et al.</i> 2002)
	<i>CCA1ox</i>	Col-0	transgen <i>35S:CCA1-YFP</i>	(Wang and Tobin 1998)
Respuesta a ABA	<i>pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Gonzalez-Guzman <i>et al.</i> 2012)
	<i>abi1-1</i>	Ler	mutación puntual	(Koornneef <i>et al.</i> 1984)
	<i>abi1-2</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Saez <i>et al.</i> 2006)
	<i>hab1-1 abi1-2</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Saez, <i>et al.</i> 2006)
	<i>snrk2.2-snrk 2.3-snrk 2.6</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Nakashima <i>et al.</i> 2009)
	<i>abi3-1</i>	Ler	mutante T-DNA	(Koornneef, <i>et al.</i> 1984)
	<i>abi4-1</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Finkelstein <i>et al.</i> 1998)
	<i>abi5-1</i>	Col-0	mutante T-DNA	(Finkelstein and Lynch 2000)

Generación de anticuerpos

Para la obtención de anticuerpos contra la proteína GEM se siguieron dos estrategias distintas que han dado lugar a dos tipos de anticuerpos específicos de GEM. En una, el antígeno usado contenía la secuencia entera de GEM (versión GEM.1) generada en bacteria *E.Coli* con un epítipo GST-GEM y cuyo producto fue purificado en columna de G-agarosa (Invitrogen) unida al anticuerpo anti-GST (1:1000, Roche). Con la proteína purificada se inmunizaron varios conejos en el Servicio de Animalario (CBMSO) de cuyo suero se purificaron los anticuerpos policlonales de *anti-GEM* mediante columna de HA-GEM. La otra estrategia fue usar como antígeno un péptido de la proteína con secuencia correspondiente con los aminoácidos 39-53 de la región N-terminal (LSDEVEIETKGSDS). El péptido así diseñado fue sintetizado e inoculado en conejo por la empresa Biogenes (Alemania) obteniendo un suero con los anticuerpos policlonales *anti-GEMpep* que fueron posteriormente purificados en columnas de HA-GEM. Ambos anticuerpos han sido validados para su uso en ensayos de Western-Blot.

Análisis de los niveles de proteína GEM

A partir del tejido vegetal congelado en nitrógeno líquido se extrajo la proteína soluble mediante molturado en un buffer de extracción BEG (Buffer de Extracción de GEM: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2% Nonidet P-40, inhibidores de proteasas (Cocktail, Roche)) fue purificado en columna de G-agarosa (Invitrogen). Mediante el ensayo colorímetro de Bradford se midió la concentración de proteína total de cada muestra igualándose a 10-20 µg

finales. Esta cantidad de proteína por pocillo fue separada en un gel de poliacrilamida y transferida a membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante electroforesis siguiendo la técnica de Western-Blot. Tras un bloqueo previo de 30 min con solución de hibridación (0,1% PBS-Tween, 5% de leche) se incubó la membrana con los anticuerpos primarios de anti-GEM y anti-GEMpep en una dilución 1:2000 y 1:5000, respectivamente, durante al menos 4 horas. Tras tres lavados de 10 min con solución de hibridación se añadió el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG-HRP (Amersham) en dilución 1:10000 y se incubó durante otras 4 horas. Después de tres lavados de 10 min con solución 0,1% PBS-Tween la proteína GEM unida a la membrana fue revelada mediante quimiluminiscencia (ECLplus, Millipore) sobre película fotográfica en cámara oscura. En estas condiciones la proteína GEM se visualiza dentro de tiempos de exposición menores a 5 minutos. La proteína total de la membrana fue teñida con azul de Coomassie y algunas de sus bandas usadas como control de carga. La estimación de la cantidad de proteína GEM ha sido visual o mediante densitometría (Bio-Rad) de la banda de GEM de la película fotográfica respecto de las bandas de proteínas total de la membrana.

Ensayo de degradación por proteosoma

La acción del proteosoma sobre la proteína GEM fue analizada mediante ensayos a temperatura ambiente (del Pozo *et al.* 2002) donde el extracto de proteína HA-GEM de plantas *GEMoe* fue expuesto a diferentes tiempos de degradación: cortos (0, 2, 5 y 10 min) y largos (1.5, 3 y 5 h) siendo suplementado o no con el inhibidor del proteosoma MG132 (10 μ M, Millipore). Los niveles de proteína fueron analizados mediante WB con el anticuerpo anti-HA (1:1000; Roche).

Estado de modificación por fosforilación

El estado de fosforilación de la proteína GEM fue analizado sobre la proteína recombinante HA-GEM de extracto de plantas *GEMoe* la cual fue fraccionada en geles de poliacrilamida e identificada mediante Western-Blot con anti-HA (1:1000; Roche). El extracto de proteína fue tratado con un cocktail inhibidor de fosfatasas (20 mM NaF, 0,1 mM ortovanadato sódico, 5 mM pirofosfato sódico) o con fosfatasa λ durante 4 h.

Unión de proteína a fosfolípidos

Para los ensayos de unión a lípidos biológicos se usó proteína recombinante obtenida de cultivo de bacteria. Las construcciones usadas para este ensayo fueron: His-GEM, His-Nt e His-Ct, tres fragmentos diferentes de secuencia codificante de GEM: (1-299 aa), (1-170 aa) y (171-299 aa), respectivamente, fusionadas a una cola de His. El clonaje se hizo en el vector pSET-B bajo un promotor inducible por IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Caro *et al.*, 2007). Después

de la transformación de *Escherichia coli* (cepa BL21 Rosetta) con estas construcciones mediante shock térmico, una colonia fue usada para el precultivo en medio líquido LB. Una vez el cultivo alcanzó la densidad óptica óptima el inductor IPTG fue añadido induciéndose la producción de las proteínas recombinantes durante las siguientes 3 h a 30°C. Pasado este tiempo se recolectaron por centrifugación las células del cultivo y se extrajeron las proteínas que fueron purificadas por su afinidad a las bolas de Ni-NTA (Qiagen).

Para analizar la afinidad de las proteínas purificadas a fosfolípidos se han usado las bandas PIP-Strip (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT) que consisten en unas membranas hidrofóbicas sobre las que hay depositadas 15 muestras de diferentes tipos de lípidos biológicos en una concentración de 100 pmoles y un control negativo. Cada membrana fue previamente bloqueada con solución de hibridación (TBS-Tween 0,1% y 3% de BSA libre de ácidos grasos) durante una hora en agitación suave. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 4 horas con 0,5 µg de proteína purificada en solución de hibridación: His-GEM, His-NtGEM o His-CtGEM, suplementado o no con 100 µg de proteína total extraída de plantas silvestres en TBS-Tween 0,1%. Después de tres lavados de 10 min con solución de hibridación se incubaron las membranas con anticuerpo monoclonal anti-His (1:3000; Roche). Tras 4-12 horas se lavaron las membranas y se añadió el anticuerpo secundario anti-mouse IgG-HRP (1:10000; Amersham). Finalmente, la unión fue revelada por quimioluminiscencia de la misma forma que en un ensayo de Western-Blot.

Fraccionamiento subcelular y localización de la proteína

- Fraccionamiento subcelular nuclear

Para el fraccionamiento de núcleos se siguió un protocolo adaptado del descrito (Villar and Köhler 2010) usando 1g de polvo fino de partida, obtenido cuidadosamente del molturado de planta entera de 10 días congelada en nitrógeno líquido, y resuspendido en 10 ml de solución de extracción de núcleos 1 (0,4 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂) a la que se añadieron inhibidores de proteasas (Roche). La mezcla fue filtrada dos veces a través de una capa doble de nylon de poro de 50 µm para retirar los restos de tejido roto y el líquido filtrado fue centrifugado a 3000 g durante 20 min. El sobrenadante fue guardado en hielo para su posterior análisis como fase no-nuclear mientras que el pellet fue resuspendido con pipeteo suave en 1 ml de solución de extracción de núcleos 2 (0,25 sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM MgCl₂, 1% Triton X-100) y centrifugado otra vez a 12000 g durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en 400 µl de solución de extracción de núcleos 3 (1,7 M sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 % Triton X-100). Esta solución viscosa fue añadida sobre un colchón del mismo volumen de solución de extracción 3 y centrifugada a 16000 g. Finalmente, el pellet fue

resuspendido en 100 μ l de solución de lisis de núcleos (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS). La fase no-nuclear guardada en hielo fue precipitada con TCA (ácido tricloroacético) 80%, lavada con acetona y resuspendida en 100 μ l de BEG (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.2% Nonidet P-40). La proteína GEM de ambas fases fue analizada mediante WB usando anti-GEMpep (1: 5000) para su detección.

Para el fraccionamiento subcelular total se siguió el protocolo descrito (Leivar *et al.* 2005) con leves modificaciones, partiendo de 1 g de polvo molido cuidadosamente de plantas *GEMoe* congeladas en nitrógeno líquido. El polvo fue resuspendido en 3 ml de solución de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1% Ficoll, 0.1% BSA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM dithiothreitol, 20% sucrose) y centrifugado a 16000 g durante 20 min obteniendo la fase de pellet (P16) y la fase de sobrenadante (S16). 1 ml de S16 conteniendo 1,5 mg de proteína se cargó a través de la pared del tubo sobre 10 ml de un gradiente continuo de 20% a 40% de sacarosa recién preparado. También, 1,5 mg de proteína de P16 fue resuspendida en 1 ml de 35 % de sacarosa y pipeteada sobre 10 ml de un gradiente continuo de sacarosa de 35% a 55%. Ambos gradientes fueron centrifugados en una ultracentrífuga (Beckman) con rotor oscilante (SW 28) a 25000 g durante 6 h obteniéndose 10 fracciones de aproximadamente 1 ml de cada uno. Cada gradiente fue recolectado cuidadosamente y la cantidad de proteína GEM analizada mediante WB con anti-GEMpep (1:5000).

- Fraccionamiento de membrana

Para este ensayo se usaron plantas *pGEM::GEM-GFP* obtenidas anteriormente por Elena Caro en nuestro laboratorio mediante el clonaje del promotor de *GEM* junto a la secuencia de su gen con su extremo 5'UTR fusionados a la secuencia de la proteína GFP en el vector pROCKII. Las plantas transformadas producen proteína recombinante fácilmente detectable mediante Western-Blot. A partir de ellas se aislaron protoplastos de mesófilo según lo descrito (Sheen 2001) y se fraccionaron para extraer la proteína de membrana con 1% de Tritón X-114 a 30°C siguiendo el protocolo descrito (Bordier 1981). Se obtuvieron tres fases correspondientes a la proteína periférica, la proteína integral y una fase intermedia entre ambas. Los niveles de GEM-GFP se analizaron mediante WB usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-GFP (Roche, 1:1000). Las plantas 35S:PIP2A-GFP se usaron como control positivo del experimento ya que se conoce que esta proteína se localiza en la membrana (Cutler *et al.* 2000).

Co-purificación y análisis por espectrometría de masas

Para la inmunoprecipitación de proteína GEM, 1g de polvo de plantas *GEMoe* de 14 días crecidas en medio líquido MSS fue homogeneizado en el buffer de extracción de proteína BEG suplementado con inhibidores de fosfatasas. Tras una centrifugación a 10000 g, el sobrenadante fue sonicado en hielo durante 10 seg x 5 veces y preincubado con 50 μ L de agarosa-G (10% flurry; Santa Cruz) durante 15 min para evitar uniones inespecíficas. Tras una centrifugación a 3000 g, el extracto fue incubado con rotación durante 1 h con agarosa-G previamente unida a anti-HA (1:1000, Roche). Después de cinco lavados con buffer de extracción la proteína unida a la agarosa-G fue eluida con 0,2 M glycine y 2 M Tris-HCl pH 8. La proteína inmunoprecipitada fue fraccionada en gel de acrilamida y transferida a membrana de mediante electroforesis. Las bandas de proteína observadas mediante varias técnicas de tinción (Coomassie, plata y Sypro-Ruby) que co-purificaban con la proteína HA-GEM de forma específica fueron extraídas para su análisis peptídico en la Unidad de Proteómica (Parque Científico de Madrid, UAM). Los fragmentos producto de la digestión con tripsina fueron analizados (MALDI) y la secuencia resultante comparada por homología con la base de datos de proteína TAIR.

Construcción de plantas *GEM*²⁷⁷⁴:*GUS* y *GEM*²⁰⁴⁹:*GUS*

Para un análisis visual de la expresión de *GEM* en planta se usaron dos fusiones distintas del promotor de *GEM* al gen reportero *GUS* con una diferencia de 700 pares de bases del extremo 5'. Para su construcción fueron amplificados a partir del BAC F14M13 (GenBankAC006592) dos fragmentos de 2,8 Kb (*GEMpro2774:GUS*) y 2,1 Kb (*GEMpro2046:GUS*) del extremo 5' del ATG más 40 pares de bases del extremo 3' usando las pareja de oligos correspondientes (5'-GTCGACGCCAAGAAACCAAGAAAGAT-3' junto a 5'-TTTAGGATCCACCTCAGTCTTCACTACG-3', y 5'-TATAAAGCTTATACGAGCAAGGGCTG-3' junto a 5'-TTTAGGATCCACCTCAGTCTTCACTACG-3', respectivamente. Estos fragmentos fueron clonado aguas arriba del ATG del gen *GUS* dentro del plásmido binario pBI101 (Clontech). Después de comprobar por secuenciación la correcta unión de inserto y plásmido las construcciones fueron transformadas en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58CRifR) por choque térmico. El cultivo de una colonia portadora del transgen fue usado para su transformación en planta de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-O) mediante el método de inmersión floral (Clough and Bent, 1988). Las semillas resultantes T₁ fueron seleccionadas en medio suplementado con 60 μ g ml⁻¹ de kanamicina y de las plantas portadoras del transgen se obtuvo la siguiente generación T₂. Sus semillas fueron seleccionadas por resistencia llegando a una línea homocigota que fue confirmada mediante la amplificación del segmento clonado por PCR.

Ensayo de tinción en plantas con el gen reportero

La expresión del gen reportero GUS bajo el promotor de GEM se visualizó en diferentes tejidos de la planta mediante la reacción de su producto génico, la enzima β -glucuronidasa, con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronide) siguiendo el protocolo descrito (Jefferson *et al.* 1987). Así, la expresión se siguió durante en las diferentes etapas del ciclo vital de la planta desde la germinación de la semilla hasta la formación de nuevas semillas. Semillas, plántulas y órganos florales fueron sumergidos en solución de tinción GUS (100mM NaPO₄, , pH 7.0, 0,5 mM K₃Fe(CN)₆, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆, 0,1% Tween-20 and 4mM X-Gluc) e infiltrados mediante vacío durante unos 10 min dependiendo de la dureza del tejido. Tras la infiltración fueron incubados a 37°C en oscuridad para favorecer la reacción enzimática. Para los ensayos de inducción con ABA en raíces de plántulas de 5-7 días el tiempo de incubación necesario fue de 8 h y para la descripción del patrón de expresión en planta adulta fue de 24 h. El tejido verde fue desteñido mediante lavados de etanol 70%. Los diferentes tejidos fueron examinados en un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) y fotografiados mediante una cámara acoplada digital Coolsnap FX color (Roper Scientific).

Análisis transcripcional

- A nivel genómico

Para los análisis transcripcionales a nivel genómico de las plantas *gem-1* y *GEMoe* se usaron plantas de 10 días crecidas en las condiciones de rutina de ambos genotipo junto al control de plantas silvestres. El RNA total se extrajo usando Trizol (Invitrogen) y purificado en columna (RNeasy Plant Kit, Qiagen). La amplificación del cDNA a partir de 10 μ g of total RNA, marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5, hibridación, cuantificación y análisis fue realizado por la Unidad de Genómica del CNB (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid). El soporte utilizado fueron los microarrays de 22K de Affymetrix (GeneChip Arabidopsis ATH1 Array) cuyas sondas representan aproximadamente 24.000 genes del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Para el análisis de los resultados se estableció un filtro de fiabilidad de p-value menor de 0,005 donde se consideraron desregulados aquellos genes con un cambio de expresión $\geq 1,8$ veces (en valor absoluto) la expresión en la planta silvestre. Para establecer categorías en la localización subcelular y la función de los genes desregulados se usó la base de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go>). Para el análisis comparativo con otros análisis transcripcionales de tratamientos con ABA, sequía y alta sal se usaron los datos publicados (Matsui *et al.* 2008).

- A nivel génico

El material de partida para las extracciones de RNA fue planta entera de 10 días de crecimiento, usándose 7-10 plántulas en, al menos, dos réplicas biológicas. En los ensayos de tratamiento con (\pm)ABA, las plantas fueron pasadas a medio sólido suplementado en presencia o ausencia de 100 μ M de ABA o no (A1049, Sigma) durante 2 horas. Este material fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y posteriormente se extrajo el RNA total con Trizol (Invitrogen). El DNA residual de estas extracciones fue eliminado mediante un tratamiento con DNAsa (Roche). El cDNA fue obtenido a partir de 500 ng totales de RNA mediante la reacción de la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) usando los oligos dT para la selección de los transcritos de mRNA. La cuantificación de los diferentes transcritos se hizo mediante RT-qPCR usando para la reacción la polimera FastStart DNA Master Green I en el sistema LightCycler (Roche) partiendo de una dilución 1:3 del cDNA total y usando primers específicos de cada transcrito (Tabla 3). Los niveles de transcrito de *ACT2* y *ACT8* fueron determinados y usados para la normalización de las diferencias de expresión en cada muestra en los ensayos de reloj circadiano y ABA, respectivamente.

Tabla 3: Oligos usados para la cuantificación de transcrito

	AGI	siglas	oligo directo	oligo inverso
Control	AT3G18780	ACT2	ACGGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	TTGGAGATCCACATCTGCTGGAATG
	AT1G49240	ACT8	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
GERs	AT2G22475	GEM	AGATAGCCTTGTCGATGAG	TCTCCATCGTATCTTTCAAC
	AT5G13200	GER5	TCTGGCACAATCTGAAGACAGG	TGGTCAGCAGATGATGCGTAGC
Reloj circadiano	AT2G46830	CCA1	TGGTGGGCTGCCAATGGATTATTACC	ACCCTCGTCAGACACAGACTTCCAT
	AT1G01060	LHY	TCCAACCTCAGCAATGACTGAAATGG	CCTGAAACGCTATACGACCTCTT
	AT5G61380	TOC1	TAAGTCACCAGGAAAATGAGTG	CACCCCGATGAAGATGATGTGAGC
	AT2G46790	PRR9	CAAGATTTGAGGAAAGCAAGTCAG	CTTCTCTCTGGCTTCTACTCCAACG
Floración	AT1G68050	FKF1	GAAGAAGCAGAAGAATACTGTAACG	CAACCAATGGGTGACGCCTTTGAGC
	AT5G62430	CDF1	GCTGATGAAGAAGAAGAAAAGAACC	GTTGGTGAGTTGTTCTTGTCTTGC
	AT5G15840	CO	GAGGAAGGTGAAGAAGGTGATAAGG	TGGATGAAATGTATGCGTTATGGTT
Respuesta ABA	AT5G59320	LTP3	TCAGTCGATGCTGCAATCTC	GCGGTCTGGTGTGGTTTTAG
	AT2G33380	RD20	TCAGCTACGTTACACTTCCGAGT	TGGCTTTGTGTATGTTGTGCAT
	AT5G52310	RD29A	TTGGGACAGAGGATGATGAATCG	CTCAACACACACCAGCAGCACCCA
	AT4G26080	ABI1	AGAGTGTGCCTTTGTATGGTTTTA	CATCCTCTCTACAATAGTTTCGCT
	AT5G13630	ABAR	CGATGTTCTTACCTTGTGGCAG	CACGACCAGCGAAAACGATTG

Análisis fenotípicos

- Seguimiento del reloj circadiano

Para el estudio de la respuesta génica en un contexto circadiano hemos usado plantas de 10 días crecidas bajo fotoperiodo de día largo salvo para el seguimiento de genes de floración en el que se usaron otras dos condiciones de fotoperíodo: día corto (8L/16D) y día intermedio (12L/12D). Se tomaron muestras cada 4 horas durante un día entero: 0, 4, 8, 12, 16, 20 horas desde el inicio de la luz (CT) en dos condiciones distintas, luz discontinua (16 luz/ 8 oscuridad) y luz continua (24 horas de luz), esta última con un acondicionamiento previo de 48 horas. La condición de luz discontinua describe patrones diurnos de expresión regulados por la luz y/o por el sistema autónomo del reloj circadiano mientras que la condición de luz continua solamente muestra patrones circadianos, es decir, dependientes directamente del reloj.

De otra manera, el patrón de expresión circadiano ha sido cómodamente analizado a través del sistema de bioluminiscencia del gen reportero *LUC* bajo el promotor de *TOC1*, el cual se analizó en fondos de planta mutante y sobreexpresora de GEM. Para la preparación hemos se transplantó una plántula de 5 días a cada pocillo de una placa multipocillo con el medio adecuado de agar y sustrato luciferina. Pasado un período de adaptación en cámara de cultivo se registraron las emisiones de fotones de cada plántula mediante un aparato contador de centelleo o luminómetro (LB-960, Berthold Technologies) durante varios días.

- Floración

Para cuantificar las diferencias relativas a la transición floral se midieron dos parámetros: el día de floración y el número de hojas de la roseta. El día de floración ha sido establecido como el día en que el tallo floral alcanza 1cm de altura y el número de hojas como las hojas verdaderas, no cotiledones, que surgen de manera visible de la roseta en este día.

- Germinación

Para los ensayos de germinación unas 100 semillas por triplicado fueron recién recolectadas y sembradas sobre placas horizontales con el medio de crecimiento descrito anteriormente. El conteo de su germinación fue registrado durante 10 días desde su entrada en la cámara de crecimiento. Para los ensayos de estratificación las semillas sembradas fueron tratadas previamente con frío (4°C) y oscuridad durante 0, 24 y 48 horas. Para los tratamientos con hormona y estrés el medio de crecimiento fue suplementado con diferentes concentraciones de ABA (0,1 µM, 1 µM y 10 µM), PAC (0,1 µM, 1µM y 3µM) y NaCl (50 mM, 100 mM y 150 mM). El conteo de la germinación de la semilla fue analizado en lupa (Leica) considerando la geminación positiva como el momento en el que la radícula había penetrado la testa.

- Crecimiento radicular

El crecimiento de la raíz fue analizado en plantas crecidas en placa vertical con medio de crecimiento suplementado con diferentes concentraciones de ABA (0,5 μM , 10 μM y 50 μM) durante 10 días.

- Supervivencia a sequía

Para el ensayo de supervivencia a sequía, plantas de 25-28 días crecidas en maceta con un régimen de irrigación regular cada dos días fueron sometidas a un período de sequía de unos 10 días hasta la aparición de clorosis. Pasado ese período las plantas fueron rehidratadas y observadas un día después considerando la pérdida de viabilidad en aquellas que no exhibieron signos físicos de rehabilitación.

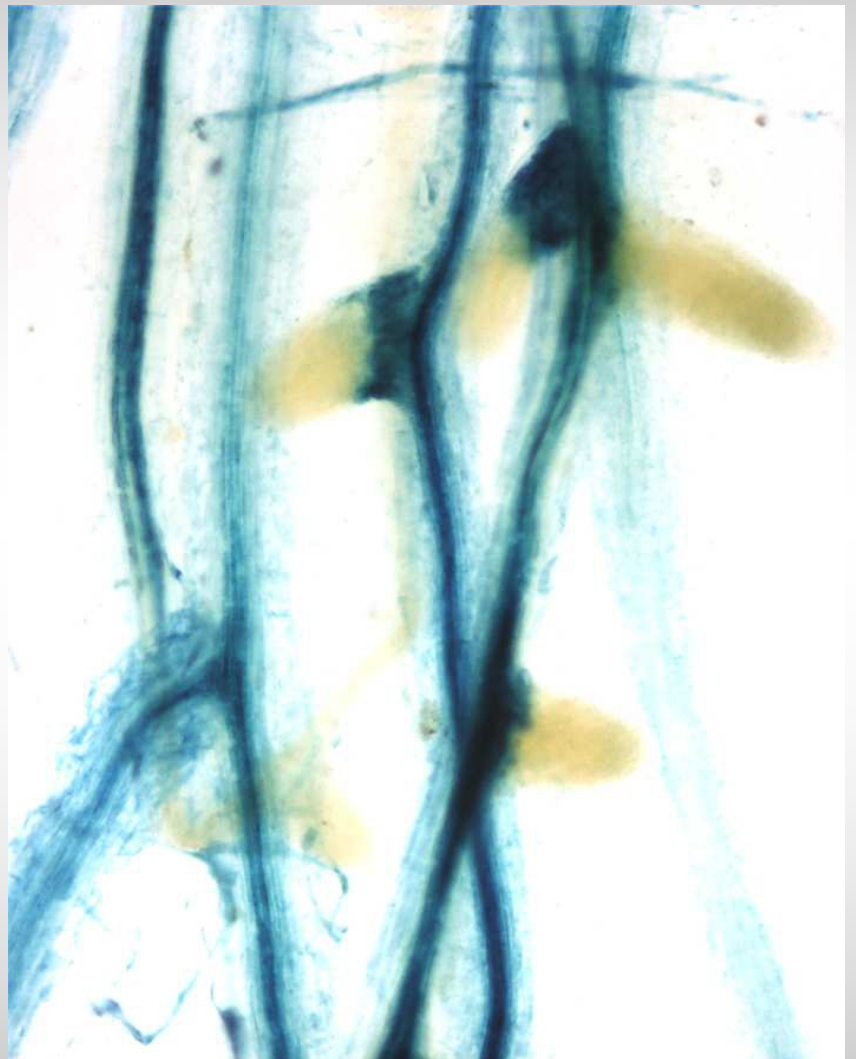
Alineamiento de proteínas

Para el alineamiento de proteínas con el dominio GRAM se usaron las secuencias de aminoácidos de diferentes organismos recogidas en la base de datos de PFAM versión 26.0 (Sanger Institute, UK). Las secuencias de proteínas con el dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana* se contrastaron con la base de datos de TAIR (Carnegie Institution and Ohio University, USA). La representación de las arquitecturas de las proteínas se ha basado en los modelos de PFAM. Los métodos usados para el alineamiento múltiple de las proteínas han sido CLUSTALW (Larkin *et al.* 2007), para las secuencias del dominio entre organismos, y MUSCLE (Edgar 2004), para las secuencias completas de las proteínas del grupo GER. El análisis evolutivo de las secuencias y la elaboración del árbol filogenético fue elaborado mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.* 2007) mediante el método Neighbor-Joining y bajo el modelo p-distance.

Predicción de motivos y dominios

Para la predicción de segmentos de proteína transmembrana se ha usado el programa MEMSAT3 (Jones 2007) y para la predicción de su orientación el servidor web RHYTHM (Rose *et al.* 2009). Para la predicción de señales de exportación nuclear (NES) en secuencia de las proteínas se ha usado el programa NetNES 1.1 (la Cour *et al.* 2004). Para la predicción de los sitios de fosfolización se ha usado la base de datos PhosPhAt (Durek *et al.* 2010).

Resultados



**Bloque I: Clasificación y
caracterización de GEM**

Bloque I: Clasificación y caracterización de GEM

1. La familia del dominio GRAM en plantas

Así como el dominio GRAM ha sido ampliamente estudiado en animales donde está presente en glucosiltransferasas, proteínas activadoras de Rab-GTPasas y miotubularinas, en plantas, no ha sido caracterizado en este tipo de proteínas y su función permanece sin conocerse. Recientemente, su estudio en plantas ha sido abordado por varios grupos de investigación y este trabajo es un esfuerzo más para avanzar en su conocimiento.

A diferencia de lo que ocurre en animales, donde el dominio se encuentra ampliamente diversificado, en plantas verdes (*Viridiplantae*) el árbol filogenético del dominio GRAM conserva las tres líneas evolutivas que se originaron inicialmente en *Bacteria* (Fig. 17) y el cual está representado en un total de 260 genes identificados. Además, los genes del dominio GRAM suelen tener duplicaciones dentro del mismo organismo que adquieren patrones de expresión locales distintos por lo que se piensa que ésta ha sido su mayor fuente de diversificación en plantas (Doerks *et al.* 2000).

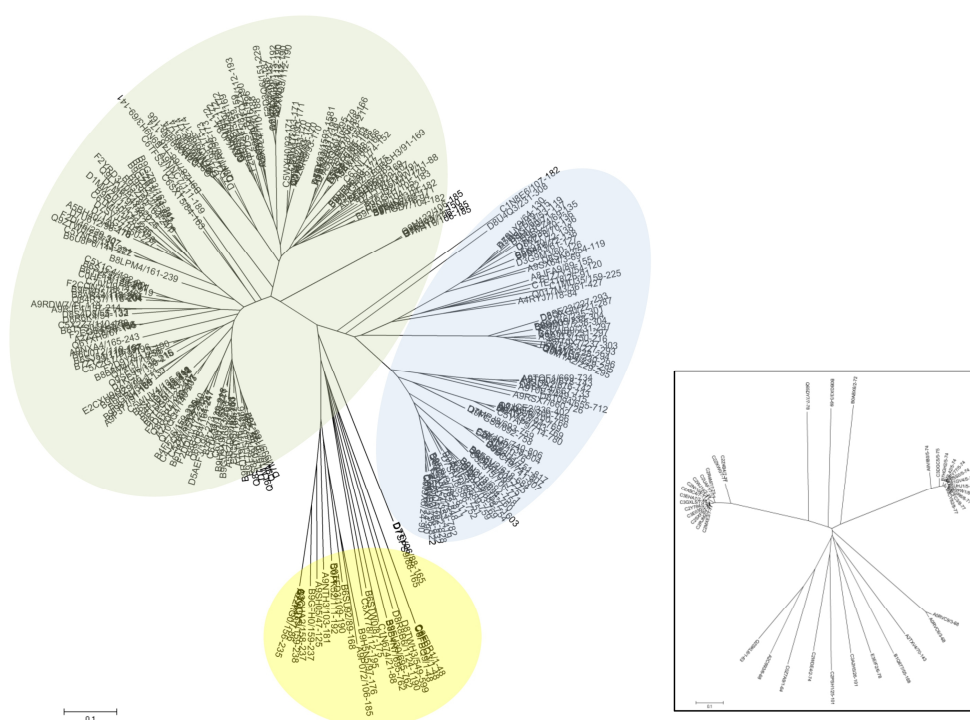


Fig. 17 Árbol filogenético del dominio GRAM en *Viridiplantae* (plantas verdes). A la derecha las líneas evolutivas marcadas desde *Bacteria*

Por otro lado, la arquitectura de las proteínas GRAM en plantas es principalmente monodominio (o bidominio en algunos casos) mientras que, en animales, suele encontrarse asociado a otros dominios llegando a encontrarse hasta seis dominios en la misma proteína.

1.1 La nueva subfamilia GER (GEM RELATED) en *Arabidopsis thaliana*

En el organismo *Arabidopsis thaliana* se han identificado quince genes que codifican proteínas que poseen un dominio GRAM. Estas proteínas pueden diferenciarse por su tamaño y por poseer, o no, otro dominio asociado al dominio GRAM (Tabla 4).

Tabla 4: Proteínas que poseen un dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana* (*proteínas descritas durante la elaboración de esta tesis)

	AGI	Nombre	Tamaño (aa)	GRAM (aa)	Otros dominios
1	AT2G22475	GEM	299	176-251 (75)	-
2	AT1G28200	FIP1	259	138-215 (77)	-
3	AT4G01600	-	233	107-183 (76)	-
4	AT4G40100	PRSL1*	225	129-163 (34)	-
5	AT5G08350	-	222	95-173 (78)	-
6	AT5G13200	-	272	143-221(75)	-
7	AT5G23350	-	280	160-235 (75)	-
8	AT5G23360	-	210	90-165 (75)	-
9	AT5G23370	-	219	98-173 (75)	-
10	AT1G02120	VAD1	598	70-135 (65)	-
11	AT3G59660	-	594	229-295 (66)	C2
12	AT1G03370	-	1020	688-754 (66)	C2 (2)
13	AT5G50170	-	1027	692-758 (66)	C2 (2)
14	AT3G10550	ATMTM1*	840	42-109 (67)	Myotubularin PPasa
15	AT5G04540	ATMTM2*	833	45-112 (67)	Myotubularin PPasa

El alineamiento de la secuencia del dominio en *Arabidopsis* muestra la conservación de dos aminoácidos comunes a todas las proteínas: el residuo glicina (G), que comparten todos los organismos, y, además, un residuo de ácido glutámico (E) (Fig. 18).

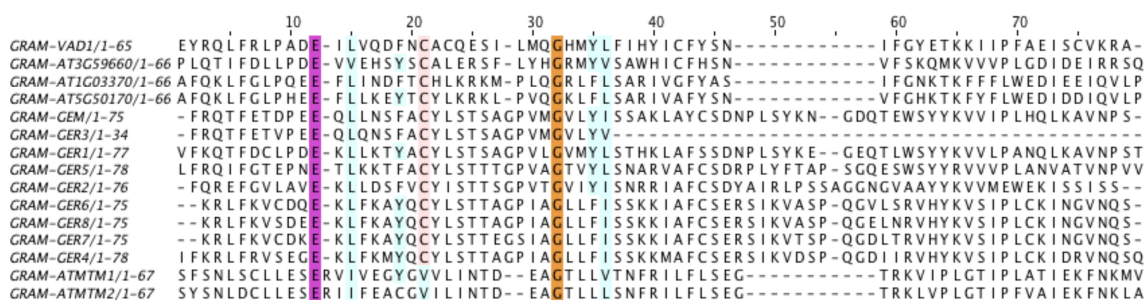


Fig 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GRAM en las proteínas de *Arabidopsis thaliana*

Como en el resto de plantas, las proteínas que contienen un dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana* son mayoritariamente de dominio único encontrando solamente cinco miembros bidominio en los que, además, GRAM sólo se asocia con dos tipos de dominio: C2 y miotubularina (Fig. 19). Curiosamente, ambos dominios son conocidos por su participación en procesos de membrana. Por un lado, el dominio miotubularina ha sido descrito en las proteínas animales MTM y MTMR con una actividad fosfatasa de fosfolípidos que genera segundos

mensajeros de la señalización celular y cuyos genes homólogos en *Arabidopsis*, *AtMTM1* y *AtMTM2*, han sido publicados recientemente (Ding *et al.* 2012). Por otro lado, el dominio C2 es un dominio conservado tanto en plantas como en animales donde ha sido descrito como un dominio de localización en la membrana formando parte de fosfolipasas o proteínas de la biosíntesis de fosfolípidos (Reddy and Reddy 2004).

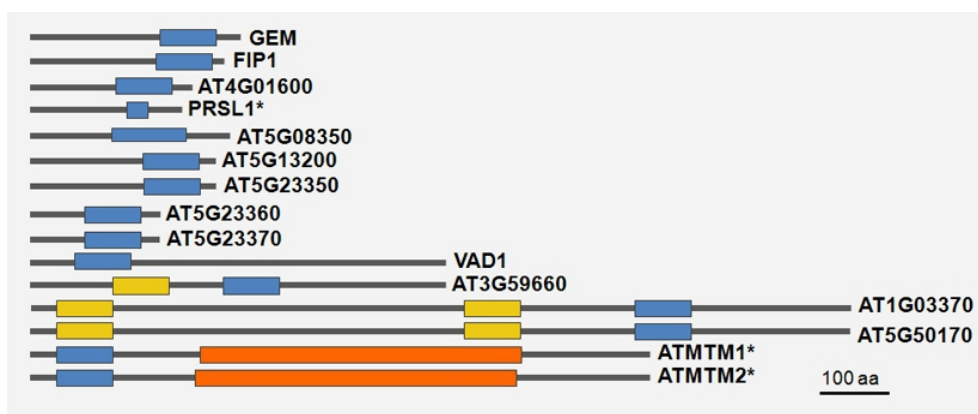


Fig. 19 Arquitectura de las proteínas del dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana*: dominio GRAM, en azul; dominio C2, en amarillo; y dominio miotubularina, en naranja (*proteínas descritas durante la elaboración de esta tesis)

Entre las proteínas con único dominio GRAM conocidas en *Arabidopsis* se encuentra VAD1 (VASCULAR ASSOCIATED DEATH 1) que ha sido caracterizada funcionalmente dentro de la respuesta hipersensible al observarse que la falta de la proteína en los mutantes *vad1-1* provoca lesiones en el sistema vascular tras una infección con patógeno (Lorrain *et al.* 2004). También se ha descrito FIP1 (FH INTERACTING PROTEIN 1) por su interacción con la proteína formin-like AFH1, localizada en la membrana y ligada a la organización del citoesqueleto (Banno and Chua 2000) aunque se desconoce su función. Y más recientemente, PRSL1 (PP1 REGULATORY SUBUNIT2-LIKE PROTEIN 1) ha sido descrita como una subunidad reguladora de la fosfatasa 1 con función mediadora de la luz en la apertura de los estomas (Takemiya *et al.* 2013). Finalmente, GEM (GL2 EXPRESSION MODULATOR) ha sido identificada previamente en nuestro laboratorio mediante ensayos de doble híbrido habiéndose demostrado que interacciona con los dos homólogos de CDT1 en *Arabidopsis*, los cuales participan en la regulación de la replicación del DNA en todos los organismos (Caro *et al.* 2007).

Basándonos en análisis de secuencia hemos clasificado a GEM y a otras ocho proteínas con dominio GRAM en un nuevo grupo de homología en *Arabidopsis* al que hemos denominado subfamilia GER (GEM RELATED) formado por: GEM, FIP1/GER1, GER2, PRLS1/GER3, GER4, GER5, GER6, GER7 y GER8. Esta nueva subfamilia posee características específicas de secuencia dentro y fuera del dominio y, además, reúne proteínas de dominio único y con un tamaño pequeño, comprendido entre 200-300 aminoácidos (Tabla 5).

Tabla 5: Proteínas de la subfamilia GER (P.M.P: peso molecular predicho para la proteína)* PRLS1 ha sido recientemente descrita (Takemiya, *et al.* 2013)

	AGI	Nombre	Versión de <i>splicing</i>	Tamaño (aa)	P.M.P (kDa)	GRAM (aa)
1	AT2G22475	GEM	.1	299	32,21	175-252 (75)
			.2	248	26,65	175-252 (75)
2	AT1G28200	FIP1/GER1		259	27,95	138-215 (77)
3	AT4G01600	GER2	.1	233	25,91	106-185 (76)
			.2	228	24,34	106-185 (76)
4	AT4G40100	PRLS1*/GER3		225	24,85	129-163 (34)
5	AT5G08350	GER4		222	25,25	95-173 (78)
6	AT5G13200	GER5		272	30,07	143-221(75)
7	AT5G23350	GER6		280	31,43	160-235 (75)
8	AT5G23360	GER7		210	23,64	88-166 (78)
9	AT5G23370	GER8		219	24,55	96-174 (75)

La masa molecular predicha para estas proteínas no supera los 35 kDa siendo GEM la mayor. En ellas, el dominio GRAM se encuentra en la mitad C-terminal de la proteína y tiene una extensión de unos 70 aminoácidos, salvo en el caso de PRLS1/GER3 que parece haber sufrido una delección de parte del dominio y sólo cuenta con 34 aminoácidos (Fig. 20).

A diferencia de las otras proteínas GRAM, la secuencia de las proteínas GER posee dos motivos específicos que las diferencia filogenéticamente del resto del grupo. Uno de ellos se encuentra dentro del dominio GRAM y su secuencia es, sobre todo, rica en aminoácidos polares (CYLSTTAGPVAGVLY; 20-35 aminoácidos desde el inicio de GRAM). El otro motivo lo identificamos fuera del dominio, en el lado C-terminal, con una secuencia principalmente abundante en aminoácidos apolares (DGF-FWFMGFVSY; 19-31 aminoácidos desde el final de GRAM). Además, específicamente, encontramos en el lado N-terminal unos residuos conservados de prolina (P) y lisina (K), y más adelante, una la secuencia GG-E, justo antes de empezar el dominio GRAM (Fig.20).

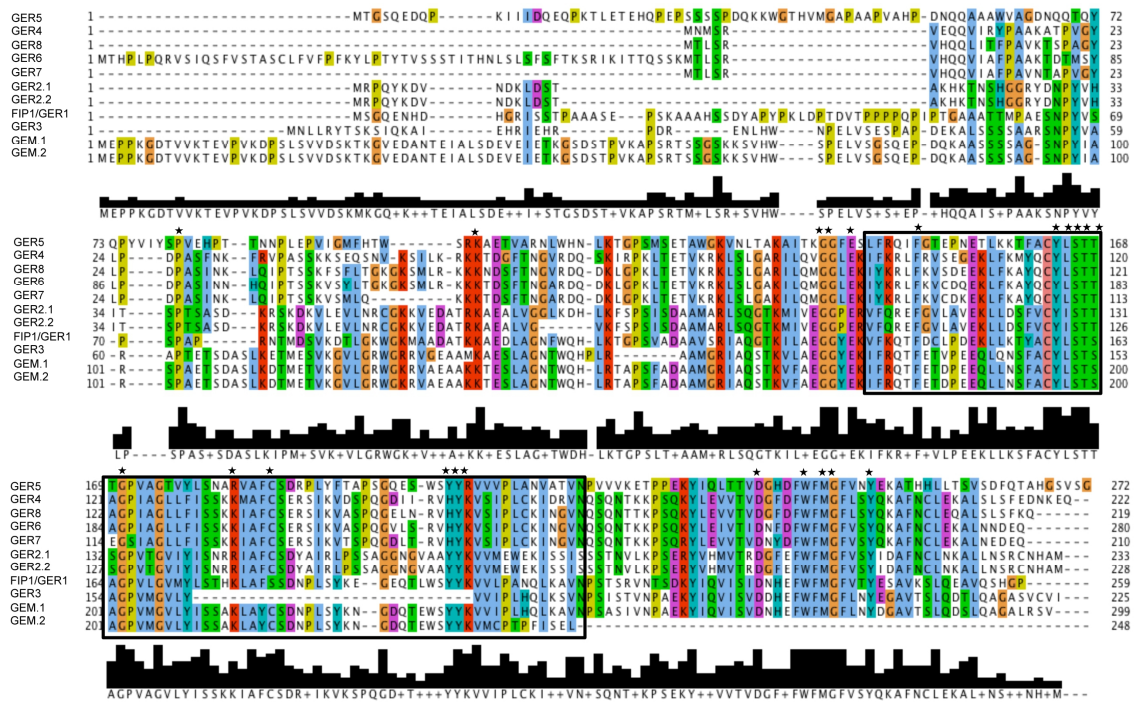


Fig. 20 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los miembros de la subfamilia GER en *Arabidopsis thaliana*. Debajo de cada línea se representa, en negro, el índice de homología junto con la secuencia consenso. El dominio GRAM está señalado dentro del cuadro y los aminoácidos específicos de estas secuencias se representan con una estrella (se ha usado MUSCLE Multiple Sequence Alignment para el alineamiento)

El dominio GRAM ha sido relacionado en animales con proteínas unidas directamente con la membrana (Doerks, *et al.* 2000) por lo que analizamos esta posibilidad mediante programas de predicción de segmentos transmembrana. El programa MEMSAT3 (Jones 2007) muestra que las proteínas GER podrían ser proteínas transmembrana debido a sus características de hidrofobicidad. Según esta predicción existe una región de 15 aminoácidos que corresponde enteramente con el motivo del dominio GRAM descrito antes, con secuencia CYLSTTAGPVAGVLY, y que por sus características es susceptible de unirse a membrana (Fig.21).

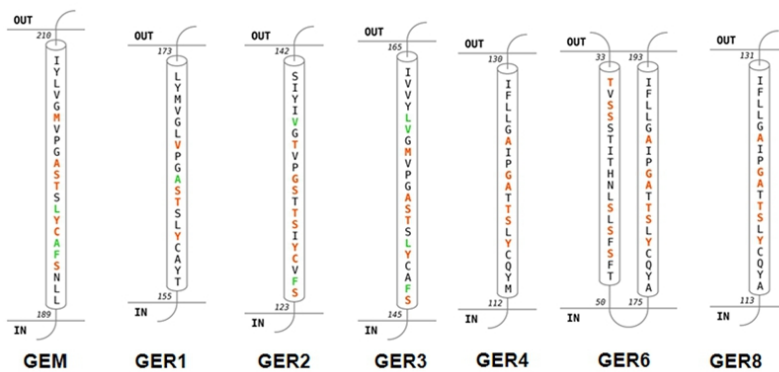


Fig. 21 Predicción de hélice transmembrana en proteínas GER mediante el programa RHYTHM (Rose et al., 2009). En verde, los aminoácidos de unión a membrana y en rojo, los de unión a la hélice

Otro programa de predicción de proteínas de membrana y canales (Rose *et al.* 2009) también señala a estos aminoácidos como capaces de formar un segmento transmembrana, aunque no en todas las proteínas GER (no en GER5, ni en GER7). La predicción de direccionalidad de estas proteínas indica que el extremo N-terminal quedaría, hipotéticamente, del lado citoplasmático y el extremo C-terminal del lado extracelular (Fig. 21).

Según los estudios elaborados con proteínas animales, el dominio GRAM es necesario y específico para la localización subcelular de la proteína que lo posee (Choudhury *et al.* 2006, Robinson and Dixon 2005) por lo que hemos analizado la predicción de localización para las proteínas GER a través de diferentes programas sin encontrar ningún consenso entre los diferentes programas usados.

También hemos buscado regiones ricas en leucina típicas de señales de exportación nuclear o NES (Nuclear Export Signals) mediante el programa NetNES 1.1 (la Cour *et al.* 2004), encontrando una región entre los aminoácidos 38 y 46 del extremo N-terminal en la proteína GEM pero no en el resto de proteínas GER.

En cuanto a la filogenia del grupo, el alineamiento de aminoácidos mediante MUSCLE (Edgar, 2004) y posterior reconstrucción filogenética usando el método Neighbor-Joining siguiendo el modelo p-distance en MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) muestra a este grupo como una línea evolutiva independiente del resto de proteínas con dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana* que se ha diversificado en dos ramas donde se agrupan, por un lado: GEM, GER1, GER2, GER3 y GER5, y por otro: GER6, GER7, GER8 y GER4. Usando de referencia a una proteína GRAM de *Bacillus cereus* (B5UHJ) se aprecia la distancia evolutiva que sitúa a GER2 más cerca de la antecesora (Fig. 22).

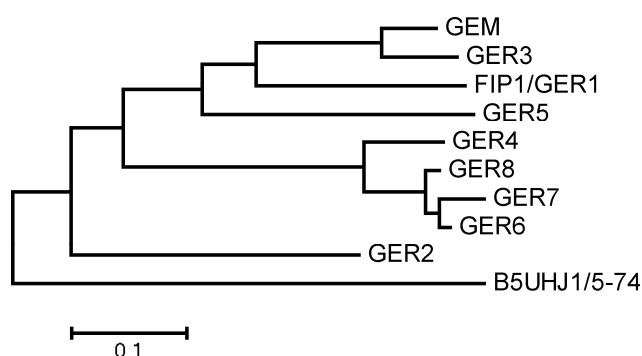


Fig.22 Árbol filogenético de las proteínas GER

Los genes *GER6* (At5G23350), *GER7* (At5G23360) y *GER8* (At5G23370) están muy cercanos en el cromosoma 5 (*GEM7* se encuentra en la cadena sentido mientras que *GEM6* y *GEM8* se localizan en la antisentido), y junto a *GER4* codifican secuencias casi homólogas que parecen ser producto de duplicaciones (Fig. 20).

1.2 Homología de las proteínas GER con ABA45 (*Hordeum vulgare*)

La primera proteína con dominio GRAM descrita en plantas fue ABA45 en la cebada (Liu *et al.* 1999), la cual fue encontrada en una búsqueda general de proteínas que interaccionaran con el ABA. El método usado fue la expresión de una librería de cDNA y su detección con un nuevo anticuerpo que mimetizaba la estructura del ABA. El gen al que correspondía el clon positivo era, además, inducible por ABA y se expresaba en la aleurona de la semilla lo que hacía pensar que se trataba de un nuevo receptor de ABA, una sugerencia que no ha podido ser comprobada posteriormente. Al analizar la homología de ABA45 con las proteínas del dominio GRAM en *Arabidopsis* encontramos que ésta es homóloga del grupo de las proteínas GER y más específicamente de GER5, GEM y GER1 (Tabla Suplementaria 1) con las que comparte el motivo intradominio (CYLSTTAGPVAGVLY) que hemos caracterizado en las proteínas GER (Fig. 23).

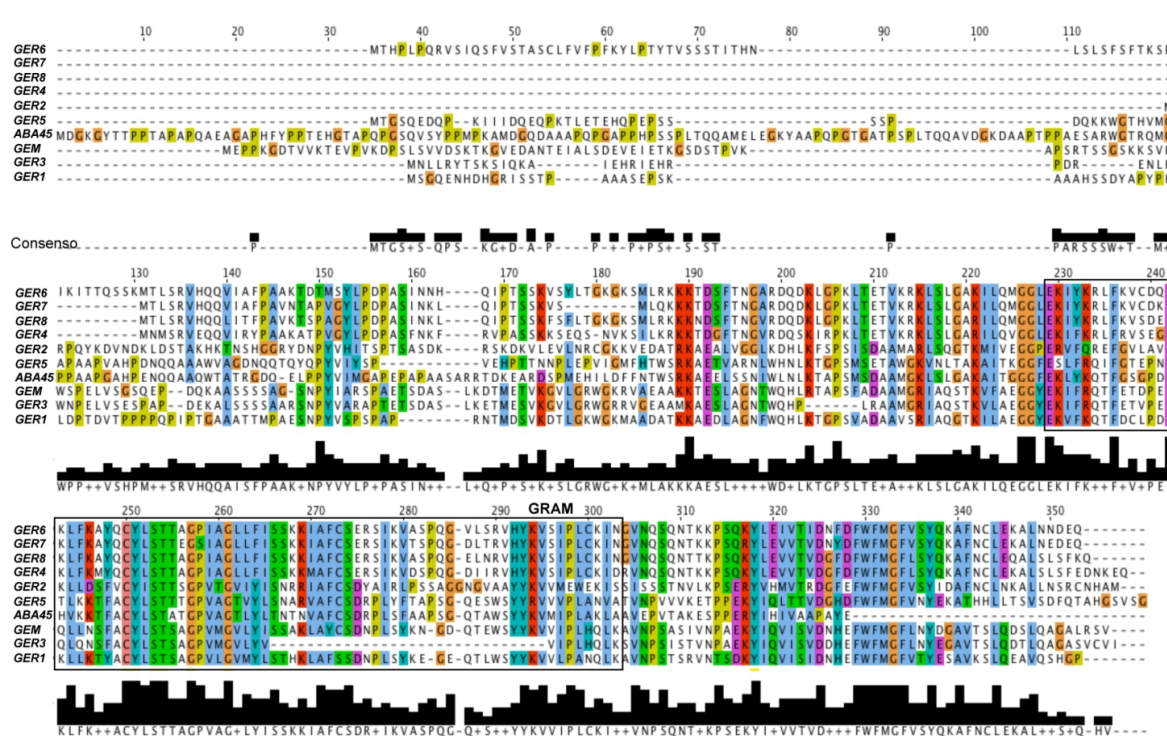


Fig. 23 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína ABA45 de *Hordeum vulgare* con sus homólogas de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia consenso se representa abajo. El dominio GRAM se representa dentro del cuadro.

La existencia de esta homología entre proteínas GER de dicotiledóneas (*Arabidopsis*) y monocotiledóneas (*Hordeum*) podría extender a otros organismos las conclusiones que se extraigan de este trabajo.

2. Caracterización de la proteína GEM

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento funcional de las proteínas con dominio GRAM en plantas, y especialmente de la subfamilia GER, nos focalizamos en uno de los miembros del grupo, GEM. Para la caracterización y estudio de esta proteína contamos con varias herramientas desarrolladas en nuestro laboratorio durante la elaboración de trabajos anteriores como las plantas mutantes (*gem-1*) y sobreexpresoras (*GEMoe*) (Caro, *et al.* 2007) (Fig. 24).

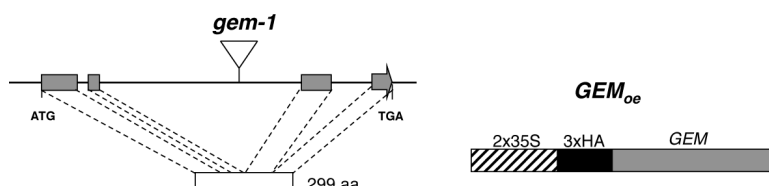


Fig. 24 Inserción de T-DNA en la línea mutante de plantas *gem-1* y transgen de la línea sobreexpresora *GEMoe*.

Las plantas *gem-1* corresponden a una línea de inserción de T-DNA (145846, Salk) y las plantas *GEMoe* han sido generadas mediante transformación con el plásmido pBHA que contiene 3 veces la secuencia de la hemaglutina (HA) en fase con el cDNA de *GEM* (AT2G22475) bajo el promotor 35S. A pesar de la modificación de la expresión de GEM en ambas plantas no aparece un fenotipo macroscópico detectable por lo que es necesario un análisis más profundo para conocer la función de la proteína GEM (Fig. 25)

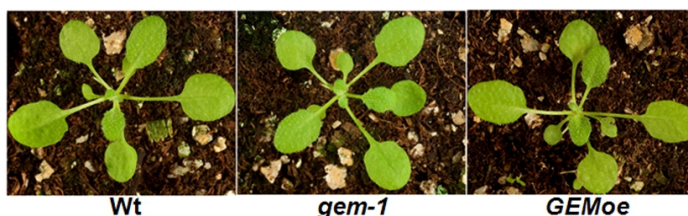


Fig. 25 Plántulas de 14 días de los genotipos Wt, *gem-1* y *GEMoe*

2.1 Generación de anticuerpos contra GEM

Para el estudio de la proteína GEM hemos generado anticuerpos policlonales a través de dos estrategias diferentes. En una, los anticuerpos llamados *anti-GEM* fueron producidos en conejo inoculado con proteína GST-GEM expresada en E.Coli y purificada en columna (Servicio de Animalario, CBMSO) mientras que, en la otra, los anticuerpos denominados *anti-GEMpep* fueron obtenidos también de conejo pero inoculado con un péptido sintético de tan sólo catorce aminoácidos que corresponde con una secuencia exclusiva de GEM (LSDEVEIETKGS) y situada en el extremo N- terminal de la proteína (Biogenes, Alemania).

Sabemos por las bases de datos que *GEM* se transcribe en dos versiones de *splicing* a las que denominamos *GEM.1* y *GEM.2* y que estos transcritos corresponden con dos isoformas de proteína de 299 y 248 aminoácidos, respectivamente, cuya masa molecular predicha se sitúa en los 32,21 kDa para *GEM.1* y 26,65 kDa para *GEM.2*. La secuencia usada para producir los anticuerpos *anti-GEM* fue la isoforma completa sin *splicing* (*GEM.1*) y, bajo criterios de especificidad y propiedades inmunogénicas, el péptido elegido para generar los anticuerpos *anti-GEMpep* se encuentra en las dos formas de *splicing* (LSDEVEIETKGS; aminoácidos 39-53) por lo que ambos anticuerpos probablemente reconozcan las dos isoformas (Fig. 26).

> GEM.1

```

1 MEPPKGDVV KTEVPVKDPS LSVVDSKTKG VEDANTEIAL SDEVEIETKG
51 SDSTPVKAPS RTSSGSKKSV HWSPELVSGS QEPDQKAASS SSAGSNPYIA
101 RSPAETSDAS LKDTMETVKG VLGRWGRVA EAAKKTESLA GNTWQHLRTA
151 PSFADAAMGR IAQSTKVFAE GGYEKIFRQT FETDPEEQLL NSFACYLSTS
201 AGPVMGVLYI SSAKLAYCSD NPLSYKNGDQ TEWSYKVVV PLHQLKAVNP
251 SASIVNPAEK YIQVISVDNH EFWFMGFLNY DGAVTSLQDS LQAGALRSV

```

> GEM.2

```

1 MEPPKGDVV KTEVPVKDPS LSVVDSKTKG VEDANTEIAL SDEVEIETKG
51 SDSTPVKAPS RTSSGSKKSV HWSPELVSGS QEPDQKAASS SSAGSNPYIA
101 RSPAETSDAS LKDTMETVKG VLGRWGRVA EAAKKTESLA GNTWQHLRTA
151 PSFADAAMGR IAQSTKVFAE GGYEKIFRQT FETDPEEQLL NSFACYLSTS
201 AGPVMGVLYI SSAKLAYCSD NPLSYKNGDQ TEWSYKVMC PTPFISEL

```

Fig. 26 Secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de *GEM* en *Arabidopsis thaliana*. En negrita, la secuencia del péptido usado para generar anticuerpos y en verde, la secuencia del dominio GRAM

Los sueros inmunes generados en ambos casos fueron purificados contra sus respectivos antígenos obteniéndose dos líneas de anticuerpos capaces de detectar la misma banda de proteína con alta especificidad (Fig. 27). Además, la banda que reconocen estos anticuerpos desaparece en las plantas mutantes *gem-1* por lo que podemos concluir que *anti-GEM* y *anti-GEMpep* reconocen específicamente a *GEM*. La masa que corresponde con esta banda es de 37 kDa, lo cual es significativamente mayor al tamaño predicho (32,21 kDa). Esta diferencia puede ser indicativa de que la proteína sufre algún tipo de modificación post-traduccional, una posibilidad que analizaremos más adelante.

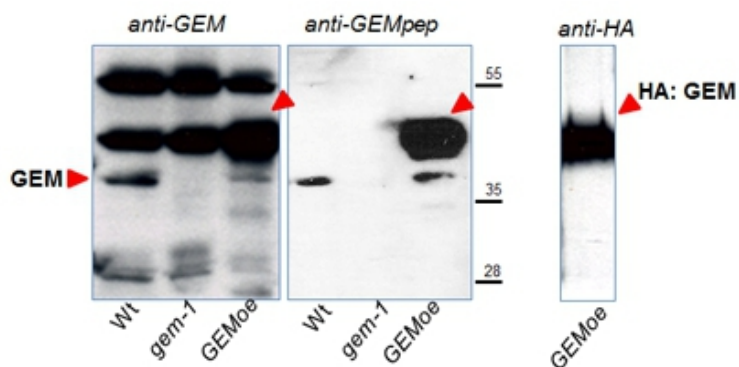


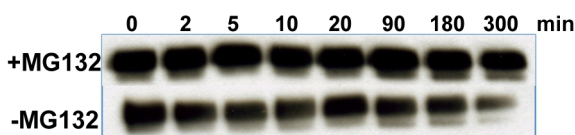
Fig. 27 WB de extracto de plantas Wt, *gem-1* y *GEMoe* revelado con anticuerpos *anti-GEM* y *anti-GEMpep*

Ambos anticuerpos detectan, además, otra banda en el extracto de plantas *GEMoe* que coincide con la reconocida por el anticuerpo *anti-HA* por lo que queda bastante claro que se trata de la banda de proteína transgénica 3xHA-GEM. La masa molecular de esta banda es de unos 48 kDa lo que podría concordar con la masa molecular de GEM (37 kDa) sumada al epítipo 3xHA (Fig. 27).

2.2 Degradación por proteosoma

El proteosoma es un complejo proteolítico que actúa sobre numerosas proteínas que han sido marcadas previamente con ubiquitina para su reconocimiento y posterior degradación. Tiene una importancia mayor en proteínas cuya presencia ha de ser controlada eficazmente como las proteínas que participan en el ciclo celular. Sabemos que GEM se une a CDT1A, una proteína que participa en la fase S del ciclo celular y aunque se ha comprobado que GEM no participa directamente en la regulación del ciclo celular es posible que sea diana del proteosoma. Usando el programa de predicción UbiPred (Tung et al., 2008) encontramos un único sitio de posible ubiquitinación con una probabilidad bastante baja en la lisina K5. Comprobamos esta posibilidad mediante ensayos de degradación sobre extractos de plantas *GEMoe* añadiendo o no a la proteína soluble el inhibidor del complejo del proteosoma MG132 y observando su efecto sobre los niveles de proteína a lo largo del tiempo. En este experimento observamos que la proteína GEM tiene una vida media muy alta en el extracto alcanzando las cinco horas de exposición y siendo el efecto del inhibidor poco relevante por lo que concluimos que en estas condiciones GEM no se degrada por el proteosoma (Fig. 28)

Fig. 28 *Time-course* de degradación por proteosoma sobre extracto de planta *GEMoe*



2.3 Estado de fosforilación

El dominio GRAM ha sido relacionado en animales con funciones de señalización celular en las que la fosforilación es la modificación más habitual para una regulación rápida de la actividad de las diferentes proteínas implicadas (Luan 2002). Utilizando la base de datos de sitios de fosforilación PhosPhAt 4.0 (Durek et al. 2010) analizamos la secuencia peptídica de GEM y comprobamos que contiene tres sitios susceptibles de ser fosforilados: S69, S78 y T117. Para analizar el estado de fosforilación de GEM se fraccionó un extracto soluble de plantas *GEMoe* en dos condiciones distintas: una en la que se previene la pérdida de fosforilaciones mediante la adición de un cóctel general de inhibidores de fosfatasa (20 mM NaF, 0,1 mM ortovanadato

sódico, 5 mM pirofosfato sódico) y otra en la que se eliminan las posibles fosforilaciones mediante la actividad fosfatasa general de la fosfatasa λ sobre el extracto. Observamos que en el extracto digerido con fosfatasa λ se han degradado unas bandas de proteína HA-GEM dejando una única banda inferior mientras que en el extracto tratado con inhibidores de fosfatasa estas bandas se mantienen. Las bandas degradadas corresponden con las de menor movilidad en el gel por lo que concluimos que GEM debe sufrir una modificación post-traducciona por fosforilación (Fig. 29).

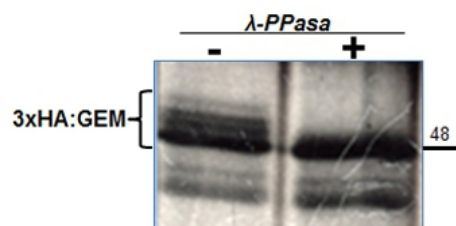


Fig. 29 Bandas de proteína HA-GEM en un tratamiento con fosfatasa λ (Tinción de plata)

2.4 Localización subcelular de GEM: membrana y núcleo

Sabemos que GEM es una proteína interactora de CDT1 la cual forma parte de un complejo de proteínas que actúa en el núcleo, el *complejo pre-replicative*, durante la fase G1 y S del ciclo celular. Pero desconocemos si GEM también se localiza en el núcleo o la interacción ocurre en otro lugar. Para analizar esta posibilidad realizamos experimentos basados en fraccionamiento mediante gradientes de sacarosa. En una primera aproximación mediante la purificación de núcleos siguiendo el protocolo descrito (Villar and Köhler 2010) a partir de extractos de plantas Wt, *gem-1* y *GEMoe* analizamos la cantidad de GEM en una fracción enriquecida en material nuclear donde observamos que GEM se encuentra más abundantemente (Fig. 30 A, pellet).

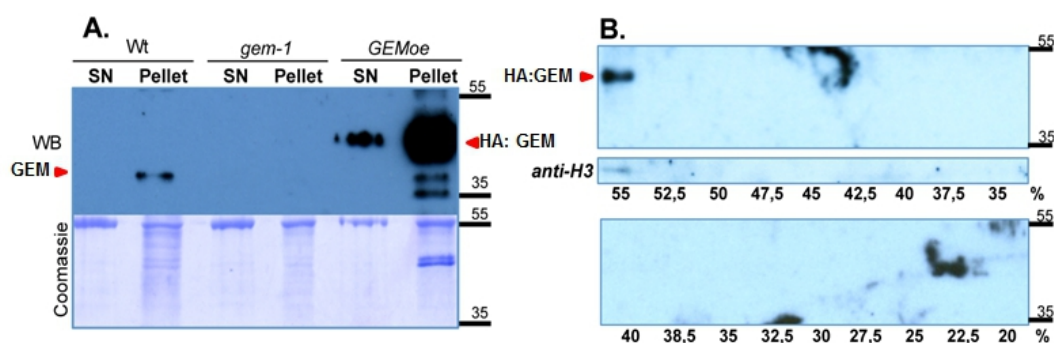


Fig. 30 Localización subcelular de GEM por enriquecimiento en núcleos en plantas Wt, *gem-1* y *GEMoe* (A) y mediante gradiente continuo de 20-55 % de sacarosa en plantas *GEMoe* (B). Ambos WB fueron revelados con anti-GEMpep

En segundo lugar, mediante un fraccionamiento subcelular en gradiente continuo de sacarosa (Leivar *et al.* 2005) separamos las diferentes fracciones subcelulares donde se distribuyen los orgánulos celulares por densidad de un extracto total de plantas *GEMoe* (Fig. 30, B). El análisis por Western-Blot con anti-GEMpep de las distintas fracciones localiza a GEM en la fracción de 55% de sacarosa que corresponde con la fracción nuclear como indica el control de proteína nuclear, la histona 3, analizado en las mismas fracciones con el anticuerpo *anti-H3*. Por ambos resultados concluimos que GEM se localiza en el núcleo.

Por otra parte, existen indicios de la interacción de las proteínas con dominio GRAM con estructuras lipídicas como ocurre con las miotubularinas o los activadores de RabGTPasas de otros organismos donde además se ha visto que desempeñan un funciones de señalización celular (Lorenzo *et al.* 2006). Para conocer la posible relación de la proteína GEM con las membranas celulares realizamos un ensayo de fraccionamiento subcelular de membranas a 30°C donde el uso de detergente Tritón X-114 y/o sales necesarios para extraer a la proteína discrimina entre proteínas integrales y proteínas periféricas (Bordier 1981). Para ello se generaron protoplastos a partir de células del mesófilo de plantas *pGEM::GEM-GFP* mediante la técnica descrita (Sheen 2001), que poseen un transgen que transcribe GEM bajo su propio promotor fusionado a GFP, lo cual nos sirve para localizar a la proteína. Como control del experimento se usa la proteína PIP2A de la cual se sabe que es una proteína periférica (Cutler *et al.* 2000). Los resultados de este ensayo son claros y no corroboran la predicción de que GEM podría ser una proteína transmembrana. Sin embargo, nos indican que la proteína GEM es una proteína periférica que se adhiere, superficialmente, a la membrana de forma débil pudiéndose separar sin romper la membrana, simplemente con una elevada concentración de sal (Fig. 31).

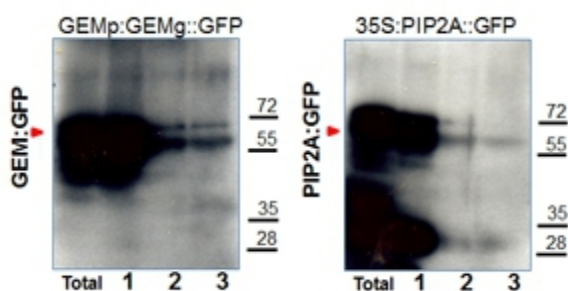


Fig. 31 Localización subcelular de GEM en extracto de membrana: (total) proteína de membrana total, (1) proteína periférica, (2) interfase, (3) proteína integral

2.5 Unión a fosfolípidos

Varias proteínas con dominio GRAM, o su homólogo estructural, el dominio PH, se unen específicamente a fosfolípidos. Las miotubularinas humanas han sido descritas en una función de biosíntesis lipídica a través de su dominio fosfatasa de fosfolípidos pero además su localización en la célula, analizada mediante ensayos con proteínas quimera, parece depender de la identidad del dominio GRAM (Choudhury, *et al.* 2006). Por otra parte, el dominio PH, ha sido ampliamente descrito interaccionando con este tipo de biolípidos formando parte de proteínasquinas como AKT, varias fosfolipasas o proteínas de su biosíntesis como la PI4K en *Arabidopsis thaliana* (Stevenson *et al.* 1998).

Según esto, ensayamos la capacidad de unión de GEM a diferentes tipos de fosfolípidos usando un soporte hidrofóbico impregnado con ocho tipos de inositoles y otros siete lípidos biológicos importantes (PIP strips, Echelon). Para analizar la funcionalidad del dominio GRAM en este contexto y teniendo en cuenta que se encuentra entre los aminoácidos 176 y 251 de la secuencia de GEM produjimos en bacteria tres formas de proteína recombinante de GEM fusionada a His: la secuencia completa de aminoácidos (His-GEM), la secuencia de 1-170 aminoácidos del extremo N-terminal (His-NtGEM), y la secuencia de 171-299 aminoácidos del extremo C-terminal (His-CtGEM) (Fig. 32 A).

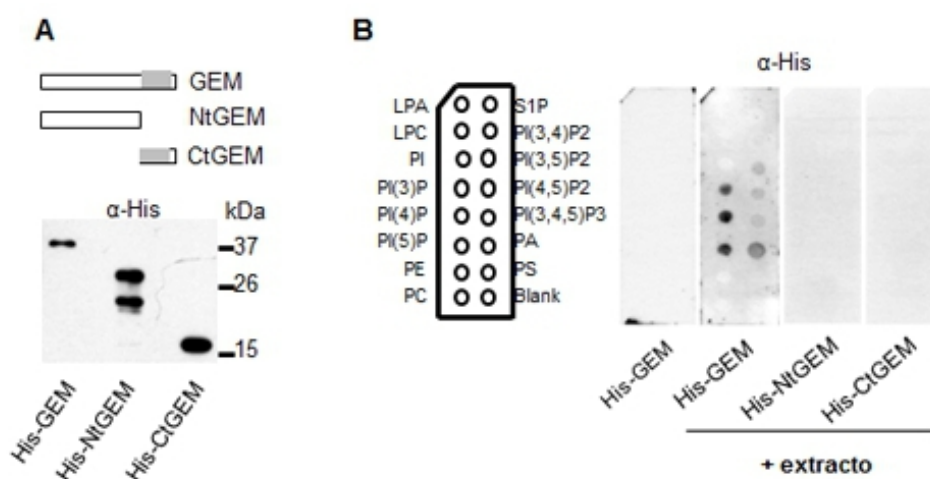


Fig.32 (A) Proteína His-GEM, His-NtGEM e His-CtGEM producida en bacteria, (B) Unión proteína-lípido sobre tiras de fosfolípidos y lípidos de proteína purificada sin y con extracto de plantas Wt añadido (n=2 réplicas independientes).

Usando una cantidad de 0,5 μg de proteína purificada para cada ensayo incubamos la membrana con el extracto proteínico de cada tipo por separado y durante un tiempo corto. Finalmente, como en un Western-Blot, analizamos la proteína unida revelando con el anticuerpo monoclonal anti-His (Roche). Los ensayos realizados de esta manera no revelaron ninguna unión de las diferentes proteínas recombinantes a la membrana. Por ello, añadimos a la solución de proteína recombinante 100 μg de un extracto total de plantas silvestres e incubamos en las mismas condiciones. De esta forma observamos unión de la proteína His-GEM, y no, en cambio, de las formas incompletas His-NtGEM ni His-CtGEM, a varios tipos de fosfolípidos. De manera más intensa, se observa unión a los monofosfolípidos PI(3)P, PI(4)P y PI(5)P, aunque también, se observa señal del anticuerpo en PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ y al ácido fosfatídico (PA) (Fig. 32 B). Esto indica que la unión de GEM a los fosfolípidos existe pero que es necesaria la participación de alguna otra proteína o determinadas condiciones proporcionadas por el extracto.

2.6 Unión a otras proteínas

Para conocer mejor las posibles interacciones de GEM con otras proteínas se realizó un ensayo de co-purificación usando como cebo a la proteína transgénica HA-GEM sobreexpresada en plantas *GEMoe*. Su inmunoprecipitación mediante unión a agarosa-antiHA y posterior elución arrastra una nueva banda de proteína, además de la asociada a la proteína HA-GEM (48 kDa), que no aparece cuando se usan extractos de plantas Wt y que posee una movilidad de unos 63 kDa (Fig. 33).

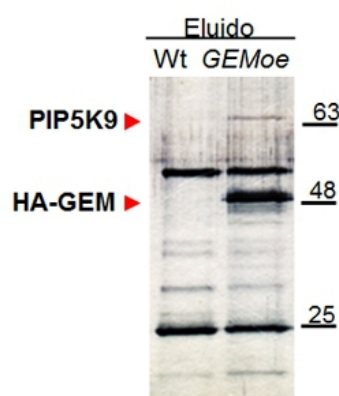


Fig. 33 Gel de proteína eluida de una co-purificación con anti-HA-GEM agarosa en extractos de plantas Wt y *GEMoe*. Las bandas señaladas han sido identificadas por espectrometría de masas (Tinción de Coomassie)

Las banda co-purificadas son visibles mediante varias técnicas de tinción (Coomassie, tinción de plata y tinción de Sypro Ruby) lo que permite extraerlas y analizarlas mediante espectrometría de masas (Servicio de Proteómica, Parque Científico de Madrid). Como ya habíamos interpretado con los ensayos de WB anteriores, el análisis de los péptidos confirma que

el doblete que aparece a la altura de los 48 KDa pertenece a la proteína transgénica de HA-GEM pero además identifica a la banda con masa molecular de unos 63 KDa como PIP5K9, una kinasa que fosforila al fosfatoinositol 4 en la posición 5 dando como producto un PIP(4,5)P₂ (Lou *et al.* 2007). Esta unión puede estar directamente relacionada con la unión a fosfolípidos demostrada anteriormente y sugiere que GEM esté implicada, de alguna manera, en el metabolismo de fosfoinositoles, lo que se discutirá más adelante. Por otra parte, el producto de PIP5K9, el PIP(4,5)P₂ está relacionado con la respuesta a estrés siendo ésta la especie más descrita (Lee *et al.* 2007, Stenzel *et al.* 2008, Williams *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2004).

En el mismo sentido se analizaron los ensayos de doble híbrido (Y2H) hechos con anterioridad en el laboratorio (comunicación personal, Elena Caro) con una batería de proteínas de *Arabidopsis* expresadas en levaduras. Al ensayar su interacción con GEM los resultados de la interacción fueron positivos para dos proteínas que corresponden con los genes con código: At3G55020 y At1G100650. El primero (At3G55020) codifica para una proteína con dominio RabGAP (GTPase-ACTIVATING PROTEINS), el cual se sabe que se une a proteínas GTPasas estimulando su actividad hidrolítica de GTP (Pan *et al.* 2006). El otro gen (At1G100650) codifica para una proteína SBP (S-RIBONUCLEASE BINDING PROTEIN) con dominio Zinc-finger FYVE. Este dominio se une a PI(3)P en una manera dependiente de pH y participa en señalización (Gaulhier *et al.* 1998) (Fig. 34).

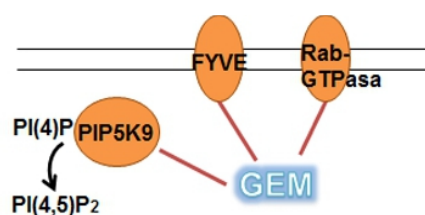


Fig.34 Interacciones de GEM con proteínas relacionadas con procesos de membrana

Ambas proteínas están directamente relacionadas con la membrana lo cual refuerza los resultados de localización en membrana y unión a fosfolípidos pero, además, los dominios de ambas proteínas se asocian al dominio GRAM en las proteínas multidominio de animales lo que sugiere que su conexión en plantas sea modular pero análogo al de animales.

3. Patrón de expresión de *GEM* durante el ciclo vital de la planta

Para conocer en qué momentos del desarrollo, en qué localizaciones y bajo qué condiciones se activa la expresión de *GEM* se construyeron plantas que expresan el gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*) bajo el promotor de *GEM* (*GEM*²⁷⁷⁴:*GUS*). Para ello, se tomó como región promotora aquella comprendida entre los pares de bases -2774 a +44, respecto al codón de inicio de la traducción. La observación de la actividad de este reportero a lo largo del ciclo vital de la planta ha aportado mucha información que resuelve algunas dudas y, además, deja abiertas nuevas vías de investigación alrededor de la función de *GEM* en la planta. Así, hemos visto que *GEM* tiene una expresión específica de tejido y ligada a determinados momentos del desarrollo de la planta.

3.1 Estadio vegetativo

Desde el inicio del estadio vegetativo, que empieza con la salida de la plántula de la semilla, no se observa tinción del reportero *GUS* hasta el día 2-3, cuando observamos que la expresión se localiza específicamente en la raíz donde se mantiene de manera constante hasta el final de la vida de la planta (Fig. 35). A este nivel, distinguimos que la expresión se detecta en la capa de la epidermis dentro de la zona de elongación celular, por encima del meristemo radicular. También se da en las raíces laterales pero no en el momento que surgen sino cuando las células empiezan a elongar. Cuando la plántula alcanza los 8-10 días de desarrollo vemos aparecer tinción, por primera vez, en la parte aérea; en las células de las estípulas que empiezan a desarrollarse y en los hidatodos de las hojas verdaderas.

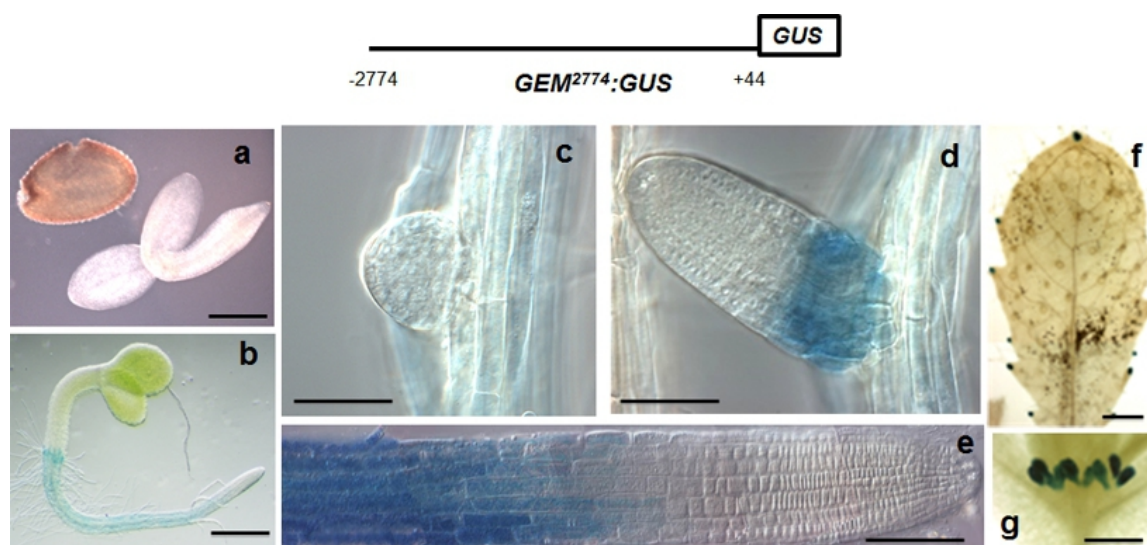


Fig. 35 Expresión de *GEM*²⁷⁷⁴:*GUS* durante el desarrollo vegetativo de la planta. (a) embrión; (b) plántula entera 5d; (c) yema de raíz secundaria d10 (d) raíz lateral d10; (e) epidermis de la raíz principal; (f) estípulas d10; (g) hidatodos d14

Para comprobar si estos cambios en la expresión suceden también a nivel de la proteína realizamos ensayos de Western-Blot donde separamos los tejidos de raíz, hojas y base del meristemo apical donde se insertan las estípulas, todo ello en plántulas de 14 días de desarrollo. Comprobamos que la cantidad de proteína es, como en la tinción de GUS, mayor en la raíz y que, a pesar de no ver expresión con el reportero en las hojas, estas también contienen cierta cantidad de proteína GEM. En general, concluimos que el patrón de expresión del transcrito es paralelo al patrón de expresión de la proteína y que la expresión del gen reportero es real (Fig. 36).

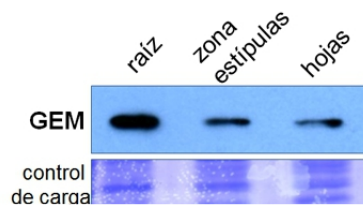


Fig. 36 Expresión de GEM en el tejido de la raíz, las estípulas y las hojas de plantas de 14 días

3.2 Estadio reproductivo

Al hacer un seguimiento de la expresión en las sucesivas etapas del desarrollo de la planta observamos que, sorprendentemente, al llegar al estadio reproductivo se produce una nueva activación en la expresión del gen reportero en la flor durante la gametogénesis (Fig. 37).

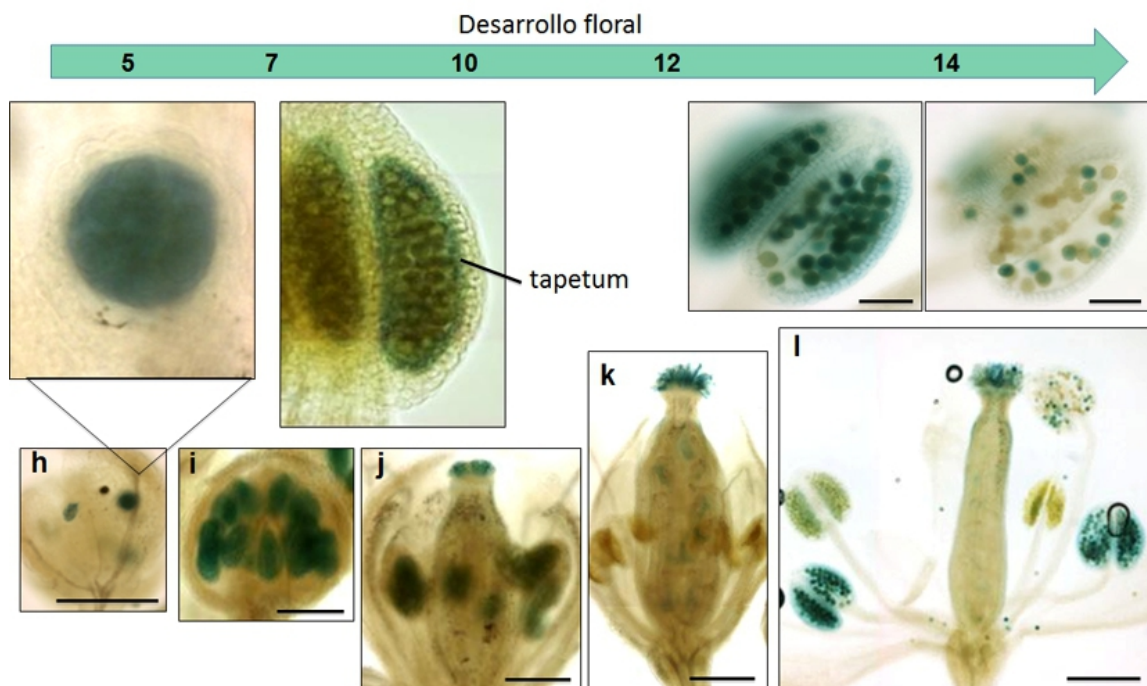


Fig. 37 Expresión de GEM^{GUS} durante el desarrollo floral: (h) estadio 5, primordio de estambre; (i) estadio 7, sacos polínicos; (j) estadio 10, estigma; (k) estadio 12, ovarios; (l) estadio 14, polen (estadios referidos al surgimiento del botón floral)

La expresión aparece en el estadio 5 del desarrollo floral, es decir, 5 días después del surgimiento del botón floral (Smyth *et al.* 1990), al comienzo de la gametogénesis masculina (Scott *et al.* 2004). Se localiza en un grupo de células dentro de los primordios de estambre que empiezan a desarrollarse. Primero, surgen los cuatro primordios que darán lugar a estambres largos y, luego, los otros dos que desarrollarán los estambres cortos. Al llegar el estadio 7, cada uno de los estambres desarrolla dos sacos polínicos (una antera) y su filamento empieza a crecer. En este momento, la expresión se sitúa dentro de cada saco polínico, en una capa denominada *tapetum* que rodea a los esporocitos. Esta señal desaparece después coincidiendo con la degeneración de la capa. En el estadio 10, cuando los pétalos han crecido hasta alcanzar la altura de los estambres largos, la expresión se detiene en el androceo y empieza en el gineceo. Observamos la expresión en las papilas del estigma hasta que la flor alcanza su madurez. En el estadio 12, los óvulos del gineceo también se tiñen suavemente. Finalmente, en el estadio 14, observamos una fuerte expresión en los granos de polen ya formados que empiezan a salir de las anteras en su fase dehiscente.

Una vez se produce la fecundación de la flor, los estambres caen, el ovario elonga y empiezan a desarrollarse los embriones en su cavidad (Scott *et al.* 1998). En este momento, la flor tiene unas 3 semanas y observamos la activación de la expresión de *GEM* dentro de los sacos embrionarios al nivel de la capa del endospermo (Fig. 38). Durante la embriogénesis, el embrión crece paralelamente a la proliferación del endospermo gracias a la alimentación del tejido materno que les rodea (García *et al.* 2005, Olsen 2004). Así lo observamos en las tinciones de GUS donde el endospermo aparece al inicio de la embriogénesis como un tejido viscoso encerrado en las paredes del óvulo. En este momento el embrión se encuentra en la transición entre estadio globular y corazón. Un paso más tarde, durante la maduración de las semillas en silicuas de 4 semanas, el embrión alcanza su tamaño final y el endospermo ocupa el espacio de las paredes de la testa.

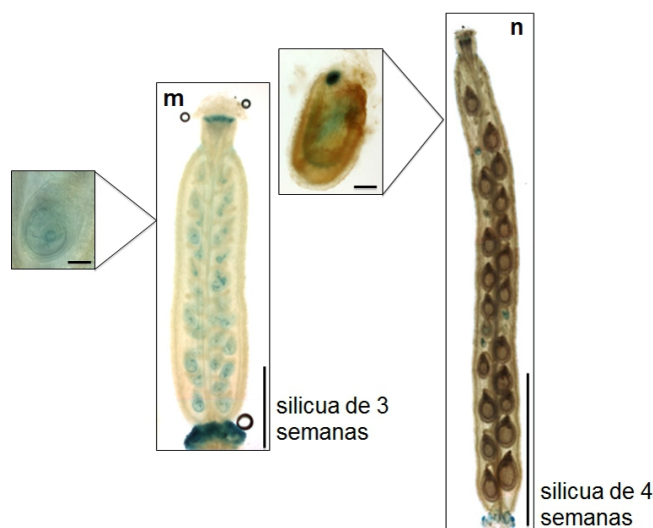


Fig. 38 Expresión de *GEM*²⁷⁷⁴:*GUS* durante la embriogénesis y el desarrollo de la semilla en la silicua. (m) silicua de 3 semanas, sacos embrionarios; (n) silicua de 4 semanas, semillas

Una vez madura la semilla, la testa empieza a oscurecerse, lo cual nos impide seguir viendo la señal. Una vez se produce de la dehiscencia de la silicua, se observa que la expresión se mantiene en las células del endospermo que cubren internamente la testa y que no hay tinción visible en las células del embrión (Fig. 39)

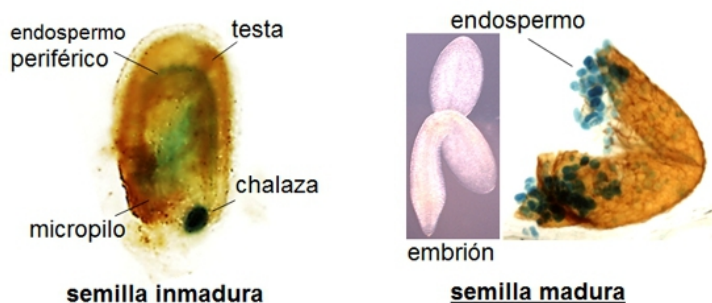


Fig. 39 Expresión de $GEM^{2774}:GUS$ en semilla inmadura de una silicua de 4 semanas y semilla madura de una silicua dehiscente

Contrastamos estos resultados de la expresión del gen reportero con los niveles de proteína mediante la extracción de proteína de las diferentes fases de la embriogénesis y maduración de la semilla: flor madura (estadio 12-14), silicua (semana 3-4), semilla seca, semilla embebida y, como referencia con el estadio vegetativo, plántula de 10 días. Para la imbibición hemos sumergido a la semilla en agua durante 48 h lo cual genera la movilización de las proteínas de reserva y la pérdida de dormición. Comparando las semillas en este tratamiento con las semillas secas concluimos que GEM no se acumula en la semilla pero que sus niveles se ven influenciados ligeramente por la vacuolización del endospermo en la semilla imbibida. Observamos que la cantidad de proteína alcanza un pico máximo en el estadio de la silicua verde de entre 3 y 4 semanas de desarrollo coincidiendo con lo que habíamos visto en la tinción de GUS siendo mayor que la cantidad en plántula entera (Fig. 40).

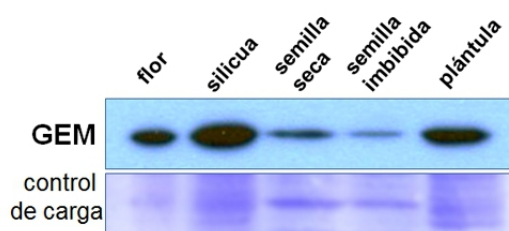


Fig. 40 Expresión de GEM en diferentes estadios del desarrollo: flor en estadio 12-14, silicua de 3-4 semanas, semilla seca, semilla imbibida y plántula entera de 10 d

4. Análisis transcriptómico de plantas *gem-1* y *GEMoe*

Como forma de empezar a establecer el marco funcional en el que participa GEM se llevaron a cabo análisis de la expresión génica, a nivel de todo el genoma, de plantas mutantes *gem-1* y *GEMoe* de 10 días de desarrollo. Para ello se usaron los *microarrays* GeneChip Arabidopsis ATH1 de *Affymetrix* cuyas sondas representan aproximadamente 24.000 genes del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Tras la extracción y purificación del RNA, las muestras fueron procesadas en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

Los datos resultantes de las hibridaciones fueron tratados estadísticamente aplicando un criterio de $p\text{-value} \leq 0,005$ ($p\text{-value}$ es la probabilidad de que el resultado obtenido aparezca por azar). Así, el total de genes considerados para el análisis fue de 622 para las plantas *gem-1*, y 691 para las plantas *GEMoe*. De éstos, se encontraron significativamente desregulados, con un cambio de expresión o *fold change* $\geq 1,8$, a 57 y 76 genes, respectivamente (Tablas suplementarias 2 y 3). Esta cantidad de genes desregulados representa un cambio del 9,16 % y del 11 %, respectivamente, del total de genes de los genes considerados. En el análisis observamos que en la planta deficiente de la proteína GEM los genes se desregulan, mayoritariamente, por activación transcripcional (44 genes de 57), mientras que en las plantas que sobreexpresan GEM ocurre al contrario y los genes desregulados están reprimidos en casi su mayoría (51 genes de 76), lo que sugiere que la proteína GEM podría ejercer una función represora sobre la transcripción (Fig. 41)

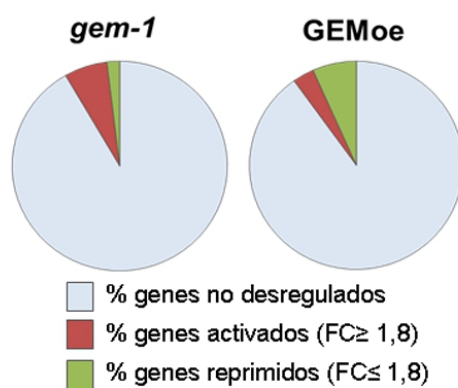


Fig. 41 Representación por sectores de los genes desregulados, activados (en rojo) y reprimidos (en verde) en los microarrays de plantas *gem-1* y *GEMoe* de 10 días

Sin embargo, los genes que se activan en *gem-1* no son los mismos que se reprimen en *GEMoe* lo que complica la identificación de los posibles genes diana directos de GEM y sugiere que GEM no actúa directamente sobre la transcripción como discutiremos más adelante. Contrariamente, se encuentran 17 genes que se desregulan en el mismo sentido en ambos genotipos lo que corresponde con una coincidencia de casi el 30% en la desregulación.

4.1 Categorización por localización subcelular y función

Para la interpretación de los datos que ofrecen los *microarrays* hemos realizado un análisis de los genes desregulados usando las anotaciones de la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource Database) agrupando los genes desregulados en categorías de localización subcelular y funcionales.

Cuando hacemos este análisis para las categorías de localización subcelular vemos que la clase más representada en la planta mutante *gem-1* son las proteínas asociadas a membrana. Por otro lado, también con un alto porcentaje de genes de membrana, la clase más representada en las plantas *GEMoe* son las proteínas asociadas al núcleo. Curiosamente, la pared celular también tiene una fuerte proporción de genes desregulados en ambos genotipos (Fig. 42).

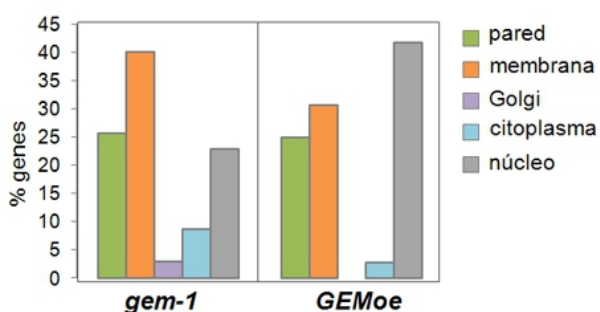


Fig. 42 Clasificación por localización subcelular de los genes desregulados en los microarrays de *gem-1* y *GEMoe*

La clasificación funcional de los genes desregulados señala que, en ambos genotipos, la mayor parte de genes desregulados son genes que responden a algún tipo de estímulo: lumínico, hormonal, de estrés, u otros, lo que puede indicar que GEM participe en alguna vía de señalización celular (Fig. 43).

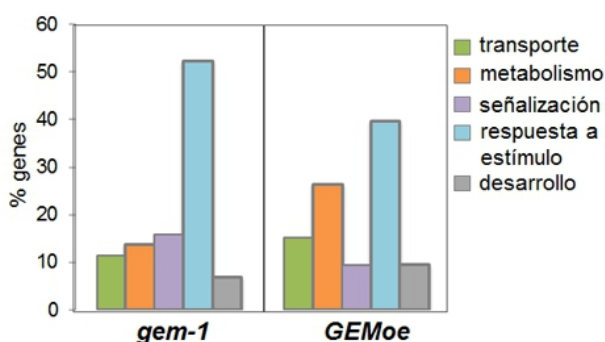


Fig. 43 Clasificación por localización subcelular de los genes desregulados en los microarrays de *gem-1* y *GEMoe*

4.2 Meta-análisis

Entre los genes desregulados en los análisis transcriptómicos de las plantas *gem-1* y *GEMoe* figuran algunos que pertenecen al reloj circadiano como *PRR9* (*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9*), componente del segundo bucle regulatorio del reloj, y varios genes cuya expresión está controlada por el oscilador, especialmente genes que se expresan en la fase subjetiva de mañana, como *RVE1* (*REVEILLE 1*). Además, encontramos desregulados genes típicos de respuesta a estrés como *RD20* (*RESPONSE TO DEHIDRACION 20*) o *ANAC019* (*NAC TRANSCRIPTION FACTOR 19*) por lo que comprobamos el índice de enriquecimiento en los grupos funcionales de Reloj Circadiano y respuesta a ABA usando los datos de análisis transcripcionales globales ya publicados.

Para el análisis de los genes regulados por el reloj usamos los datos publicados en plantas sobreexpresoras y mutantes del componente principal del reloj *TOC1* (Legnaioli *et al.* 2009). Estos datos proceden de análisis de *microarrays* con los que se ha obtenido una lista de genes que se desregulan por el efecto de *TOC1* y que definen el porcentaje que esta categoría funcional representa sobre el total del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Comparamos estas listas con las lista de genes desregulados por efecto de GEM y comprobamos que los porcentajes de genes que responden a *TOC1* están muy por encima de lo esperado al azar en las plantas mutantes y sobreexpresoras de GEM. Por un lado, mientras que la sobreexpresión de *TOC1* (*TOC1ox*) genera una desregulación de un 2% del genoma de *Arabidopsis*, en la mutación de GEM casi un 10% de este grupo de genes están desregulados. Por otro lado, la falta de *TOC1* en el mutante *toc1-2* provoca que un 1% del genoma se desregule siendo en las plantas *GEMoe* de cerca del 6%. El enriquecimiento de los genes del grupo funcional de *TOC1* en estas plantas puede indicar que GEM cumpla algún papel en el Reloj Circadiano. Además, el patrón de genes desregulados en *gem-1* parece acercarse más al patrón de genes que se desregulan en *TOC1ox* y, al contrario, en las plantas *GEMoe* se parece más al patrón de *toc1-2*, lo que podría significar que GEM regule negativamente las funciones de *TOC1* (Fig. 44).

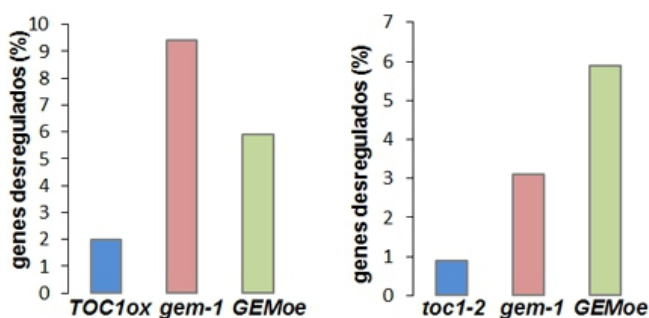


Fig. 44 Meta-análisis de los genes desregulados en plantas *gem-1* y *GEMoe* frente a los porcentajes de genes desregulados en plantas *TOC1ox* y *toc1-2*

De la misma manera, usamos los perfiles de desregulación publicados en tres tratamientos diferentes de estrés abiótico (Matsui *et al.* 2008), concretamente, un tratamiento con ABA (100 μ M) de dos horas, un tratamiento con NaCl (150 μ M) de 10 horas, y un tratamiento por deshidratación de 10 horas de duración. Al comparar nuestros análisis transcripcionales con estos datos, observamos que las plantas *gem-1* y *GEMoe* presentan una elevada coincidencia con los patrones de genes que se desregulan por estos tratamientos. Mientras que el tratamiento con ABA en plantas Wt provoca una desregulación de cerca del 20% del genoma, en las plantas *gem-1* y *GEMoe*, en condiciones normales, este grupo de genes representa cerca del 60%. Los niveles de enriquecimiento son similares en los otros tratamientos de estrés salino y deshidratación son similares, lo que podría indicar que GEM tenga una función en la respuesta a estrés abiótico mediada por ABA (Fig. 45)

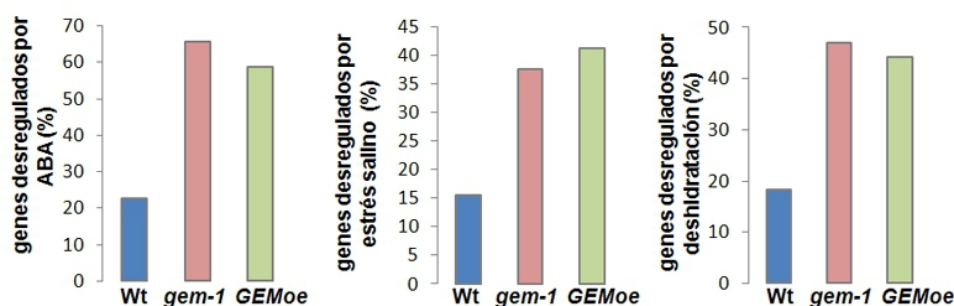
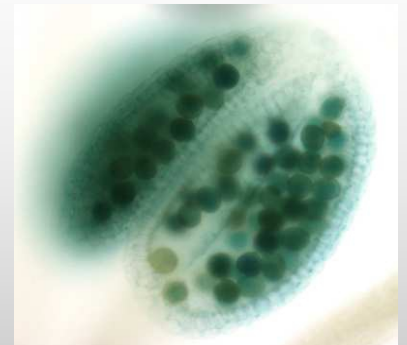
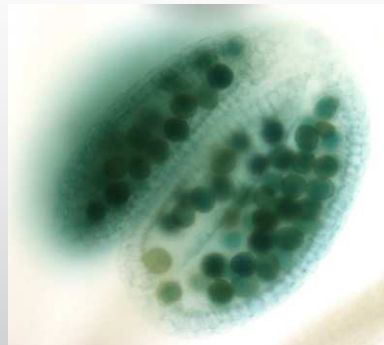
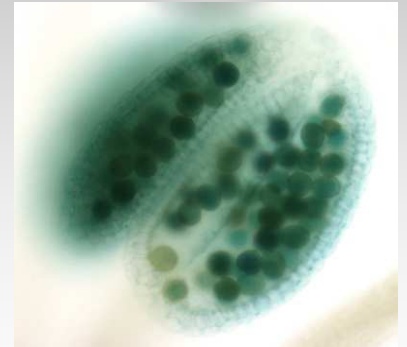
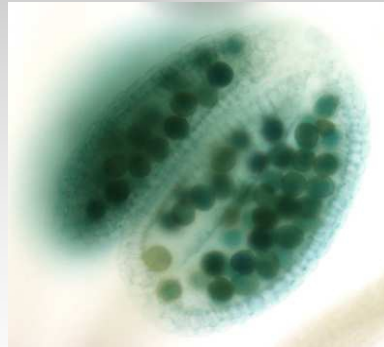


Fig. 45 Meta-análisis de los genes desregulados en plantas *gem-1* y *GEMoe* frente a los porcentajes de genes desregulados en tratamientos de ABA, estrés salino y deshidratación en plantas Wt

Resultados



**Bloque II: Implicación de GEM
en el reloj circadiano**

Bloque II: Implicación de GEM en el reloj circadiano

Los meta-análisis de los *microarrays* de plantas *gem-1* y *GEMoe* han indicado que existe un enriquecimiento significativo, en estas plantas, de genes que están controlados de una manera directa o indirecta por TOC1, un componente del oscilador, principalmente inhibidor, del reloj circadiano (Alabadi *et al.* 2001, Huang *et al.* 2012). Los genes así regulados o genes circadianos se caracterizan por tener una expresión rítmica, es decir, con un ciclo de unas 24 horas incluso en condiciones externas de luz y/o temperatura. Además, entre los genes circadianos desregulados en estas plantas observamos que abundan los de expresión de mañana como *PRR9*. Un 25% de los genes de *Arabidopsis* tiene una expresión circadiana, lo que significa que este sistema de homeostasis se encarga de una buena parte de las funciones vitales de la planta (Hazen *et al.* 2009). Por todo ello, analizamos en este apartado una posible implicación de GEM en el reloj circadiano.

5. Regulación de los componentes del reloj circadiano por GEM

Para estudiar la posibilidad de que GEM regule al reloj circadiano estudiamos los cambios de expresión en las plantas *gem-1* y *GEMoe* de los componentes del oscilador principal del reloj formado por *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*), *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) y *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION*) (Alabadi, *et al.* 2001), y, también, del componente del segundo bucle regulatorio del reloj *PRR9* (*PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9*) (Nakamichi *et al.* 2005).

Todos estos genes se caracterizan por mantener una férrea expresión circadiana, independiente de luz y temperatura, y por estar auto-regulados, a nivel principalmente transcripcional por otros componentes del reloj. Si GEM regulara a estos componentes, lo cual implicaría que ella misma forma parte del reloj, deberíamos observar cambios en la fase de expresión o pico de máxima expresión de estos componentes. Si, además la expresión de GEM fuera independiente del estímulo (luz, temperatura) externo este cambio de fase debería suceder, incluso, en condiciones continuas.

Para analizar esto llevamos a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa con muestras de plantas *gem-1* y *GEMoe* de 10 días donde medimos los niveles de expresión de *CCA1*, *LHY*, *TOC1* y *PRR9* referidos a los de la planta silvestre. El registro de variaciones en el reloj circadiano obliga a hacer un muestreo en las diferentes horas del día: 0, 4, 8, 12, 14, 16 y 20 CT (Circadian Time), donde CT indica el número de horas que han pasado desde el inicio de la luz.

En primer lugar, analizamos los cambios de expresión en condiciones de luz variable en un fotoperíodo largo, es decir, de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, en las que no observamos un cambio en la fase en *CCA1* y *LHY* pero sí, en cambio, parece modificar el patrón de expresión de *TOC1* y *PRR9*. Por un lado, el pico de expresión de *TOC1* parece adelantarse a la fase 8 CT mientras que en las plantas Wt se sitúa a las 12 CT, aunque con muy poca diferencia en nuestros experimentos. Y por otro lado, la fase de *PRR9* en las plantas *GEMoe* se retrasa a las 8 CT siendo a las 4 CT en las plantas Wt, lo que parece coincidir con la represión detectada en los microarrays (Fig. 46).

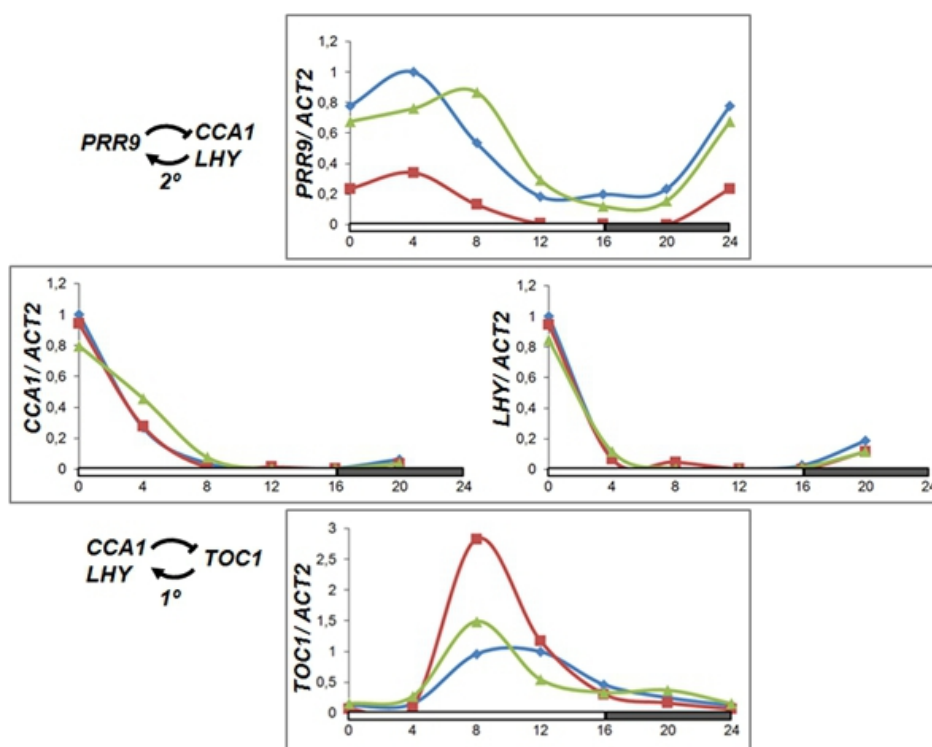


Fig. 46 Time-course de la expresión de los genes *PRR9*, *CCA1*, *LHY* y *TOC1* que pertenecen al segundo (2) y primer (1) bucles regulatorios del reloj medida a lo largo de un día: 0, 4, 8, 16, 20 CT (horas) en plantas **Wt** (azul), **gem-1** (rojo) y **GEMoe** (verde) (n=2 réplicas independientes)

TOC1, también denominado *PRR1*, y *PRR9* pertenecen a la misma familia de pseudo-reguladores de la familia del dominio CheY-like, dominio homólogo al que posee el primitivo reloj de bacterias, pudiendo ser este grupo de proteínas en el que interviene GEM.

En segundo lugar, para verificar que estas modificaciones en la expresión de *TOC1* corresponden realmente a una regulación de reloj circadiano realizamos un seguimiento temporal de mayor duración y en las condiciones más estrictas de luz continua. Para ello, usamos el gen reportero de luciferasa (*LUC*) bajo el promotor de *TOC1* en plantas con un fondo mutante *gem-1* y sobreexpresor *GEMoe* crecidas durante cinco días en condiciones de luz/oscuridad a partir del

cual son transplantadas a un medio con el sustrato luciferina y puestas a luz continua durante dos días en un entrenamiento previo a ser analizadas. Esto nos permite hacer un ensayo más exhaustivo en el que se recogen datos individuales de, al menos, 12 plantas en cada medición con cuya media se elabora la gráfica (Fig. 47).

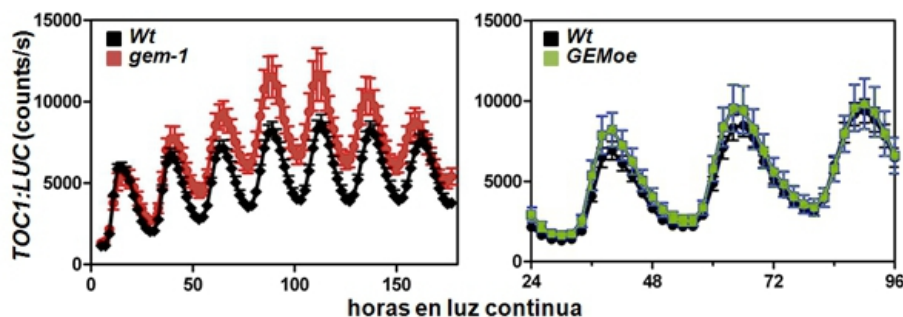


Fig. 47 *Time course* de la expresión de *TOC1:LUC* en plantas *gem-1* y *GEMoe* a lo largo de varios días en condiciones de luz continua

Para la cuantificación de las emisiones de fotones producto de la reacción de la luciferasa usamos un contador de centelleo que nos permite registrar los cambios de expresión durante varios días. Este proyecto se desarrolló durante una estancia en el laboratorio dirigido por Paloma Mas en el IBM (Institut de Biologia Molecular de Barcelona), actual CRAG (Centre de Reserca Agroenòmica). Los resultados obtenidos no indican una perturbación significativa en la fase de la expresión de *TOC1* lo que significa que GEM no es una proteína de reloj y que las variaciones observadas en condiciones de luz/oscuridad pueden estar causadas por una regulación de GEM indirecta y dependiente de luz sobre otros reguladores del reloj circadiano.

6. Regulación de *GEM* por reloj circadiano

Hemos comprobado que GEM no forma parte del reloj circadiano pero la cantidad de genes regulados por el reloj encontrados en el análisis transcriptómico, muchos de los cuales corresponden a genes expresados en las primeras horas de la mañana, nos plantea la posibilidad de una regulación circadiana del propio transcrito de *GEM*. Para analizar esta posibilidad, estudiamos los motivos de unión relacionados con el reloj que se pueden encontrar en el promotor de *GEM*. Sorprendentemente, encontramos dos cajas de unión de *CCA1* o *CBS* (*CCA1 BINDING SITE*) en posiciones muy cercanas entre ellas, ambas a una distancia de unos 1500 pares de bases del codón *ATG* (Fig. 48).

La frecuencia de aparición de este motivo en genes regulados por el reloj circadiano es, de alrededor, el 10% siendo algo más frecuente en genes que se expresan en las primeras horas del día (Covington *et al.* 2008).

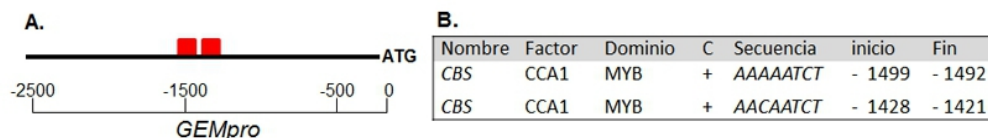


Fig. 48 (A) promotor de GEM y sitios CBS; (B) Tabla de los sitios de CBS

Analizamos la expresión de *GEM* por RT-qPCR bajo condiciones normales en un fotoperíodo de día largo (16L/8D) y observamos que el transcrito presenta un pico de expresión máxima en la hora 4 CT siendo el mínimo cuatro horas antes, en la transición de la oscuridad a la luz, cuando *CCA1* tiene su máxima expresión por lo que pensamos que *CCA1* pueda estar controlando de manera inhibitoria la expresión de *GEM* en este punto (Fig. 49).

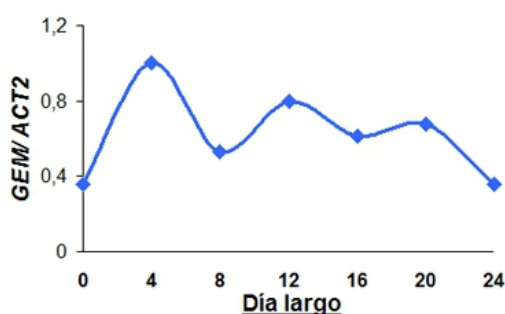


Fig. 49 *Time course* de la expresión del transcrito de *GEM* durante un ciclo de día largo (n=3 réplicas independientes)

Para averiguar si el patrón de expresión diurno de *GEM* es dependiente de luz y si este punto de mínima expresión es debido a la inhibición por *CCA1* analizamos los niveles de transcrito *GEM* en condiciones de luz continua de plantas silvestres y plantas sobreexpresoras de *CCA1* *CCA1ox* (Col-0) y mutante de *CCA1* y *LHY*, *cca1 lhy rna1* (Ws-2). Para ello, crecemos estas plantas durante ocho días y tras un entrenamiento previo de dos días en luz continua realizamos las mediciones del transcrito a lo largo de 24 horas (Fig. 50).

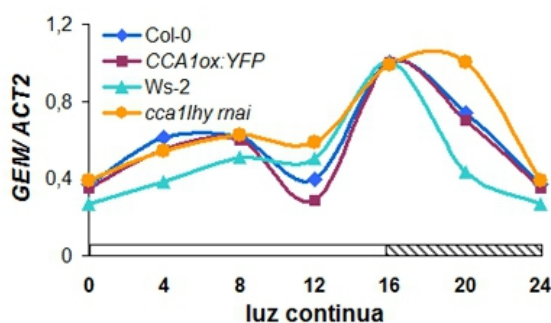
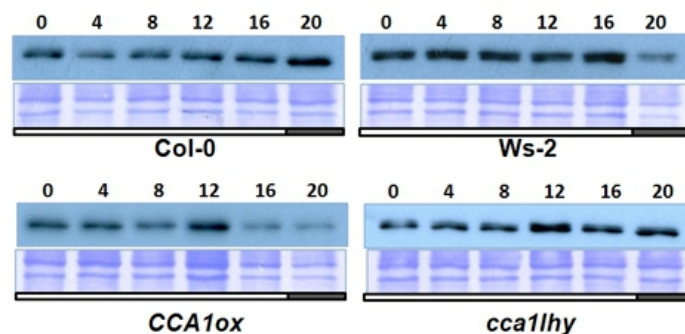


Fig. 50 *Time course* de la expresión del transcrito de *GEM* durante un ciclo circadiano en condiciones de luz continua en plantas Col-0, *CCA1ox* (Col-0), Ws-2 y *cca1lhy* (Ws-2) (n=1 réplicas independientes)

Observamos que en condiciones de luz continua el patrón de expresión de *GEM* en plantas silvestres sigue manteniendo una ritmicidad aunque se modifica el patrón respecto a los niveles vistos en condiciones de luz/oscuridad apareciendo un nuevo pico de expresión máxima a las 16 CT. Además, la fase de expresión de *GEM* no cambia en las horas en las que *CCA1* se expresa (0 CT) por lo que concluimos que esta ritmicidad no es dependiente de *CCA1* y que, por lo tanto, los sitios *CBS* del promotor de *GEM* no son funcionales o, al menos, en un contexto circadiano. Por otro lado, las plantas mutantes *cca1lhy* tienen un desfase en la expresión de *GEM* a la hora 20 CT lo cual debe obedecer a otro tipo de desregulación independiente de reloj que desconocemos (Fig. 50). Coherentemente, los resultados de expresión de *GEM* en condiciones de luz continua en plantas Wt son similares a los recogidos en la base de datos de experimentos de expresión transcripcional PHASER (<http://phaser.cgrb.oregonstate.edu/>).

Finalmente, estudiamos una posible regulación post-transcripcional analizando los niveles de proteína en estas mismas condiciones de luz continua en plantas sobreexpresoras *CCA1ox* y mutantes *cca1lhy* (Fig. 5). A este nivel, no observamos cambios significativos de *GEM*, una vez cuantificadas las bandas de proteína mediante densitometría (BioRad), a lo largo de 24 horas en las plantas silvestres. Tampoco observamos cambios en los niveles de *GEM* provocados por la falta o abundancia de *CCA1* por lo que concluimos que no existe una regulación post-traducciona ligada a *CCA1*.

Fig. 51 *Time course* de la expresión de *GEM* proteína durante un ciclo circadiano en condiciones de luz continua en plantas *Col-0*, *CCA1ox* (*Col-0*), *Ws-2* y *cca1lhy* (*Ws-2*) (n=2 réplicas independientes)



7. Floración dependiente de fotoperíodo

El reloj circadiano es un sistema de homeostasis que controla funciones tan importantes como la floración. Hemos comprobado que *GEM* no regula directamente al reloj circadiano aunque los análisis transcripcionales de las plantas *gem-1* y *GEMoe* presentan un alto porcentaje de genes que son regulados de manera circadiana, sobre todo genes de la fase de mañana. Aparte de estos genes también se encuentran desregulados otros que participan en el desarrollo de la floración, el más importante, *COL2* (*CONSTANS-LIKE 2*). Este gen es homólogo de otro mucho más

estudiado, *CO* (*CONSTANS*) cuya regulación ocurre a través de *FKF* (*KELCH REPEAT F-BOX 1*), *GI* (*GIGANTEA*) y *CDF1* (*CYCLING DOF FACTOR 1*) (Sawa *et al.* 2007).

7.1 Regulación de genes de floración por GEM

Para comprobar el efecto de la desregulación de *GEM* sobre la expresión de *CO* analizamos el patrón de expresión diurno en fotoperiodo de día largo en las plantas *gem-1* y *GEMoe*, comparadas con plantas silvestres, por RT-PCR. Observamos que los niveles de transcrito de *CO* varían siendo menores en la hora 12 CT en las plantas *GEMoe* y mayores en la hora 20 CT en las plantas *gem-1*, lo que indicaría una represión de *GEM* sobre este regulador de la floración (Fig. 52)

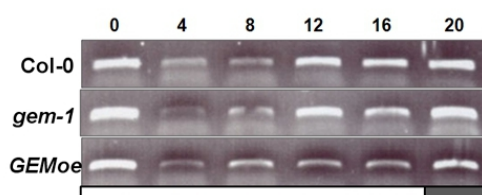


Fig. 52 *Time course* de un día de la expresión de *CO* bajo fotoperiodo de día largo en plantas Wt, *gem-1* y *GEMoe*

Con la intención de estudiar si la respuesta de *CO* en las plantas *gem-1* y *GEMoe* varía según el fotoperiodo utilizado realizamos experimentos en tres fotoperiodos distintos: día largo (16L/8D), día intermedio (12L/12D) y día corto (8L/16D). A lo largo de estos fotoperiodos cuantificamos las variaciones en la expresión de *CO* y de los genes responsables de su regulación, *FKF1* y *CDF1*, mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 53).

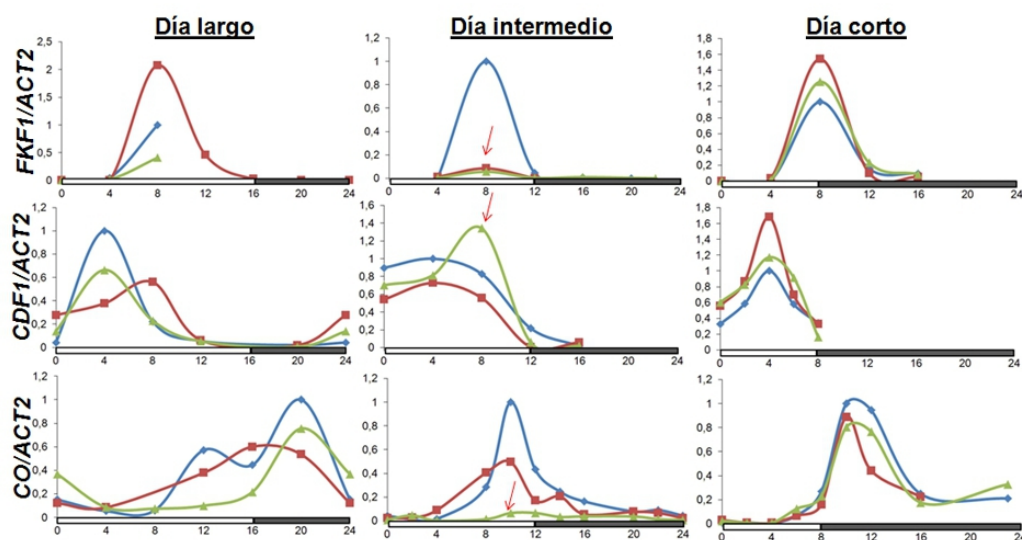


Fig. 53 *Time course* de la expresión de los genes *FKF1*, *CDF1* y *CO* a lo largo de un día (0, 4, 8, 16, 20 CT) en plantas Wt (azul), *gem-1* (rojo) y *GEMoe* (verde) en tres fotoperiodos (día largo, día intermedio y día corto)

Los resultados indican que GEM influye en la expresión de *CO* y, también, en la de sus reguladores. Así, afecta a *CDF1*, que es el represor directo de la transcripción de *CO*, pero también a *FKF1*, cuya proteína acumulada se une a GI para reprimir la expresión de *CDF1* (Fig. 53). Como habíamos visto por RT-PCR, los niveles de transcrito *CO* en fotoperiodo de día largo se reprimen en el pico 12 CT en las plantas *GEMoe* recuperándose sus niveles en el siguiente pico, a las 20 CT del día, lo que no se asocia con un mayor nivel de expresión del represor *CDF1* en estas plantas. De manera más clara, en el fotoperiodo intermedio la sobreexpresión de GEM provoca una disminución de la expresión de *FKF1* a las 8 CT y, tal vez, como consecuencia, la expresión de *CDF1*, que se reprimiría por la unión del complejo FKF1-GI a su promotor, sufre un aumento. Este aumento de *CDF1* en las plantas *GEMoe* si puede verse asociado, en este fotoperiodo, a una mayor represión de la expresión de *CO*. Por otro lado, en las condiciones de fotoperiodo corto, en las que esta ruta de floración no es activa, no se observan cambios significativos en estos transcritos por lo que concluimos que GEM regula, de alguna manera, la floración dependiente de fotoperiodo.

7.2 Fenotipo de floración de las plantas *gem-1* y *GEMoe*

El desarrollo floral se puede determinar mediante dos medidas: el *tiempo de floración*, definido como el número de días desde la germinación hasta el momento de la floración, y el *número de hojas* de la roseta en dicho momento. Se establece como momento de floración el día en que el tallo floral alcanza un centímetro de altura. Ambas medidas pertenecen a una misma variable determinada por el ecotipo y por el ambiente que provoca que la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva sea lenta, caracterizada por tiempos largos de floración y alto número de hojas en la roseta (*late flowering*), o rápida caracterizada por tiempos cortos de floración y bajo número de hojas en la roseta (*early flowering*) (Koornneef *et al.* 1998).

Para estudiar cómo afectan las variaciones en la expresión de los reguladores de la floración (*FKF1*, *CDF1* y *CO*) observados en las plantas *gem-1* y *GEMoe* al desarrollo floral cuantificamos el tiempo de floración y el número de hojas en la roseta bajo los tres fotoperíodos analizados en los experimentos de expresión transcripcional (día largo, día intermedio y día corto) (Tabla 5). Observamos que las plantas *gem-1* presentan un tiempo de floración algo menor en los tres fotoperíodos pero que los cambios en el nº de hojas no es significativo, lo que indica que el ritmo de crecimiento de estas plantas es mayor pero que no existe una activación real de la floración o *early flowering* en el patrón de desarrollo.

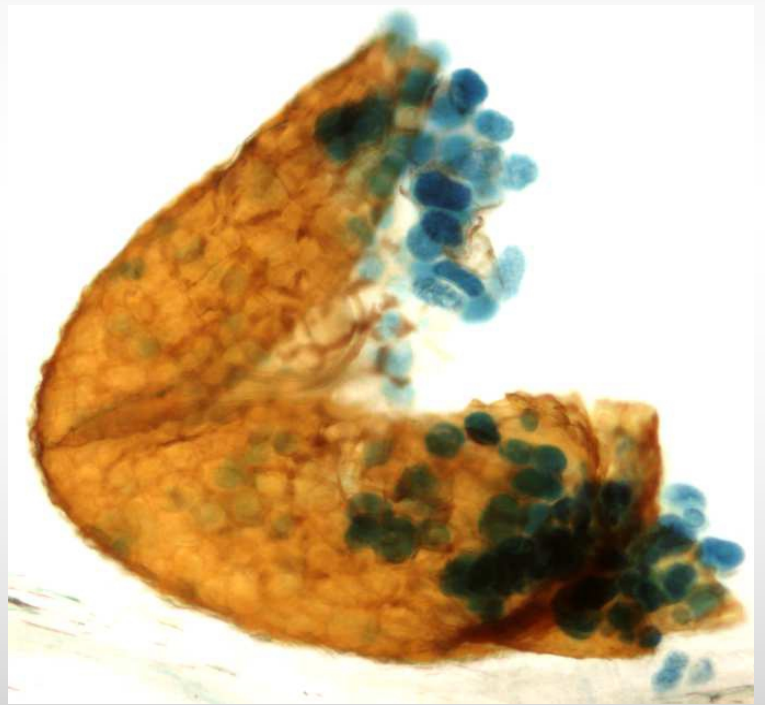
Por otra parte, en las plantas *GEMoe*, tanto el tiempo de floración como el número de hojas de la roseta es significativamente mayor en el fotoperiodo intermedio, lo cual corresponde con la represión vista en la expresión del transcrito de *CO* en los experimentos de RT-PCR cuantitativa. Curiosamente, en fotoperiodo de día largo no se observan cambios significativos del fenotipo de floración como se esperaría de la disminución de los niveles de *CO* observados por RT-PCR y RT-PCRq, lo que significa que el efecto de estos cambios transcripcionales es contrarrestado de alguna manera.

	Día largo (16L/8D)		Día intermedio (12L/12D)		Día corto (8L/16D)	
	Tiempo de floración	Nº de hojas de la roseta	Tiempo de floración	Nº de hojas de la roseta	Tiempo de floración	Nº de hojas de la roseta
Wt	27±2,0	10,3 ± 1	41±4,2	16,41 ± 3,1	76±2,5	46,8 ± 1,3
<i>gem-1</i>	25±1,8	9,3 ± 0,9	39±3,3	19,5 ± 3,2	68±2,8	48,2 ± 1,8
<i>GEMoe</i>	27±3,8	10,6 ± 0,9	49±5,2	25,9± 7,3	66±4,3	47,7 ± 2,5

Tabla 5. Tiempo de floración y nº de hojas de la roseta en plantas *Wt*, *gem-1* y *GEMoe* en tres fotoperíodos (día largo, día intermedio y día corto). Media y desviación de una población de 36 plantas por genotipo.

Concluimos de estos experimentos que la transición floral, bajo fotoperiodo de día intermedio, está afectada por GEM a nivel transcripcional a través de sus reguladores.

Resultados



**Bloque III: Implicación de GEM
en la señalización por ABA**

Bloque III: Implicación de GEM en la señalización por ABA

Dado que los meta-análisis o análisis comparativos de los genes desregulados en los *microarrays* de plantas *gem-1* y *GEMoe* mostraban un enriquecimiento significativo en genes de respuesta a ABA y estrés, analizamos la posible implicación de GEM en la función de respuesta a ABA o señalización mediada por ABA. Además, sabemos que un homólogo de la familia GER (ABA45), en la planta de la cebada, tiene una función vinculada a la señalización del ABA (Liu *et al.* 1999, Finkelstein *et al.* 2002) y, por lo tanto, GEM podría tener funciones similares.

8. Resultados del análisis transcriptómico de plantas *gem-1* y *GEMoe*

Partiendo de las listas de genes desregulados generados en los *microarrays* de plantas *gem-1* y *GEMoe* de 10 días crecidas en condiciones normales (Tablas suplementarias 2 y 3) clasificamos aquellos genes que responden a ABA en genes activados o reprimidos por ABA (Fig. 54 A). Para ello, usamos los datos publicados del transcriptoma de ABA de plantas silvestres tratadas con ABA (100 μ M)(Matsui *et al.* 2008) en los que se observa que un 10% de genes de *Arabidopsis* se activan por ABA y otro 10% se inhibe (Fig. 54 A). Comprobamos que el fuerte enriquecimiento de genes que se inducen por ABA en las plantas *gem-1* corresponde principalmente a genes que se activan por la acción de la hormona (60%) (Fig. 54 A). Así, de los 36 genes de respuesta a ABA desregulados en estas plantas una mayoría (22 genes) son genes activados por ABA y activados en *gem-1*, lo que llevaría a pensar que GEM se comporte como una regulador negativo de los genes activados por ABA (Fig. 54 B). En cambio, en el transcriptoma de las plantas *GEMoe* de los 55 genes que se encuentran desregulados, una parte son genes activados por ABA (34%) y otra, genes inhibidos por ABA (27%) (Fig. 54 A).

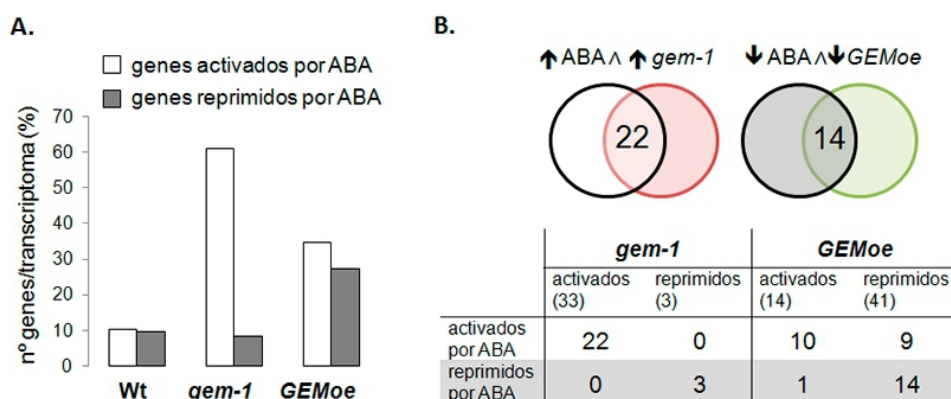


Fig. 54 (A) Enriquecimiento en genes activados y reprimidos por ABA (Matsui *et al.*, 2008) en plantas *gem-1* y *GEMoe* (B) Diagrama de coincidencias y tabla de nº de genes desregulados en uno y otro sentido, y de su regulación por ABA

En este caso, 9 genes activados por ABA son reprimidos en *GEMoe*, lo que coincidiría con lo concluido en las plantas *gem-1* acerca de una posible regulación negativa de GEM en la respuesta a ABA. Sin embargo, aparecen 14 genes que se reprimen por ABA y, también en plantas *GEMoe* y, a su vez, 10 genes activados por ABA son activados en estas plantas (Fig. 54 B), lo que puede estar señalando un efecto secundario de la sobreexpresión de GEM sobre algunos de estos genes. Según estos datos, GEM podría actuar como un represor de la señalización de ABA para un determinado grupo de genes.

Entre los genes conocidos afectados en la planta mutante *gem-1* encontramos un receptor (*PYL5*) que pertenece a la principal familia de receptores de ABA recientemente descrita y que participa en resistencia a sequía (Santiago et al. 2009) y algunas kinasas asociadas a la cascada de fosforilación que se produce en la señalización celular de ABA o estrés (*MAPKKK19* y *CML38*), proteínas que participan en la hidrólisis (*PLA2 α*) y oxidación (*LOX 3* y *LOX4*) de ácidos grasos de la membrana en la biosíntesis de fosfolípidos y oxilipinas (Creelman y Mulpuri, 2002), compuestos que juegan un papel importante como segundos mensajeros y en la biosíntesis de jasmonatos, respectivamente, en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Tabla 6). Encontramos también dos factores de transcripción: un miembro de la superfamilia WRKY (*WRKY38*) que se ha descrito como un regulador negativo de la inmunidad de plantas a través de su interacción con deacetilasas (Kim et al. 2008), y otro (*AT4G32800*), que pertenece al tipo de los factores de transcripción *DREB* de la familia *ERF/AP2* (*ERE BINDING FACTOR/ APETALA 2*), conocida por su participación en respuesta a estrés abiótico (Saibo et al. 2009).

Tabla 6: Selección de genes conocidos y desregulados en plantas *gem-1* y *GEMoe*(*genes validados por RT-qPCR)

<i>gem-1</i>			<i>GEMoe</i>		
AGI	Descripción	FC \geq 1,8	AGI	Descripción	FC \leq 1,8
<i>AT2G26560</i>	<i>PLA2α</i>	2,34	<i>AT5G45130</i>	<i>RAB5A</i>	2,01
<i>AT4G32800</i>	<i>DREB TF</i>	2,13	<i>AT5G59310</i>	<i>LTP4</i>	-4,23
<i>AT1G17420</i>	<i>LOX3</i>	2,07	<i>AT2G33380</i>	<i>RD20*</i>	-3,38
<i>AT1G72520</i>	<i>LOX4</i>	2,02	<i>AT1G52890</i>	<i>ANAC019</i>	-2,37
<i>AT5G67080</i>	<i>MAPKKK19</i>	1,99	<i>AT2G18050</i>	<i>H1-3</i>	-2,17
<i>AT1G76650</i>	<i>CML38</i>	1,94	<i>AT5G59320</i>	<i>LTP3*</i>	-2,09
<i>AT5G22570</i>	<i>WRKY38</i>	1,87	<i>AT5G17300</i>	<i>RVE1</i>	-1,97
<i>AT5G05440</i>	<i>PYL5</i>	1,85	<i>AT5G17860</i>	<i>CAX7</i>	-1,93
			<i>AT1G69490</i>	<i>ANAC029</i>	-1,92
			<i>AT2G17040</i>	<i>ANAC036</i>	-1,84

Por otro lado, la sobreexpresión de GEM provoca una desregulación en la expresión de algunas proteínas transmembrana como una proteína homóloga a la proteína GTPasa RAB (*RAB5A*) o una proteína transportadora dependiente de Ca^{+2} (*CAX7*), de varias proteínas

relacionadas con patogénesis como las de tipo LIPID TRANSFER PROTEINS (*LTP3* y *LTP4*) de las que se sabe transportan fosfolípidos y otros ácidos grasos entre diferentes membranas celulares (Kader 1990), de una proteína lipo-oxigenasa (*RD20*) cuya expresión se induce fuertemente por ABA y estrés que afecta a la germinación y a la resistencia a sequía (Aubert *et al.* 2011, Aubert *et al.* 2010) (Tabla 6). También aparecen desregulados tres factores de transcripción de tipo NAC (NAM, ATAF and CUC) (*ANAC019*, *ANAC029* y *ANAC036*) los cuales funcionan como llaves de la regulación por ABA en diferentes procesos de estrés (Hu *et al.* 2006, Jensen *et al.* 2010, Kato *et al.* 2010), un factor de transcripción de tipo MYB-LIKE (*RVE1*) que controla la biosíntesis de auxina de manera dependiente del ciclo circadiano (Rawat *et al.* 2009) y una histona poco conocida cuya expresión es fuertemente inducida por ABA y deshidratación (*H1-3*) (Ascenzi and Gantt 1997).

9. Expresión de genes de respuesta a ABA en plantas *gem-1* y *GEMoe*

A la vista de los datos de los *microarrays* de plantas *gem-1* y *GEM* decidimos validar algunos de estos genes mediante RT-qPCR. Para ello, se preparó RNA de plántulas de 10 días de los genotipos de estudio y su respectivo control silvestre (*gem-1*, *GEMoe*, Wt) y de genotipos mutantes en señalización por ABA como control del experimento (*abi1-1* y *abi5-1*). La mutación *abi1-1* afecta a una de las principales fosfatasa PP2C en su dominio de unión al receptor de ABA por lo que el mutante adquiere un fenotipo insensible al ABA y la cadena de señalización permanece permanentemente activada porque el dominio catalítico fosfatasa que inhibe a las kinasas SnRK2s no está afectado. Por otro lado, la mutación *abi5-1* afecta a uno de los principales factores de transcripción en la señalización de ABA a través de los ABA RESPONSIVE ELEMENTS (ABRE) y provoca, también, un fenotipo mutante insensible al ABA y con una baja respuesta génica al ABA. Las muestras se recogieron entre 4- 6 horas después del inicio de la luz para evitar los cambios de expresión diurnos y circadianos. Por último, aplicamos dos tipos de tratamientos a las plantas, uno en condiciones normales de crecimiento (16L/8D, 22°) y otro, en estas mismas condiciones, con un tratamiento previo de dos horas con ABA 100 μ M para detectar las diferencias de respuesta a ABA en el fondo mutante y sobreexpresor de GEM.

Medimos las diferencias de expresión en dos genes que aparecían desregulados en los *microarrays*, *LTP3* y *RD20*, los cuales corresponden con una proteína transportadora de fosfolípidos y ácidos grasos relacionada con funciones de señalización celular (Kader 1990) y una lipo-oxigenasa que participa en procesos de movilización de proteínas de reserva durante la germinación (Aubert, *et al.* 2011), lo que relacionaría los cambios de expresión con lo descrito acerca del dominio GRAM en su participación en procesos de membrana (Doerks *et al.* 2000 (Begley, *et al.* 2003).

Así, comprobamos que *LTP3* y *RD20* se encuentran reprimidos en las plantas *GEMoe* en condiciones normales y que *LTP3*, al contrario, se encuentran activado en las plantas *gem-1*, lo que confirma los datos generados por los *microarrays* (Fig. 55). Sin embargo, comparando los niveles basales del transcrito con los niveles tras el tratamiento con ABA observamos que, tras la aplicación de ABA, en la planta *gem-1* estos genes no se activan como en el control y sí, en *GEMoe*, lo que significaría que GEM, de alguna manera, activa la señalización mediada por ABA a estos genes. En estas inducciones las plantas mutantes *gem-1* se comportan como las plantas mutantes *abi5-1* que parecen tener reducida, aunque no bloqueada, como en los mutantes *abi1-1*, la inducción de estos genes.

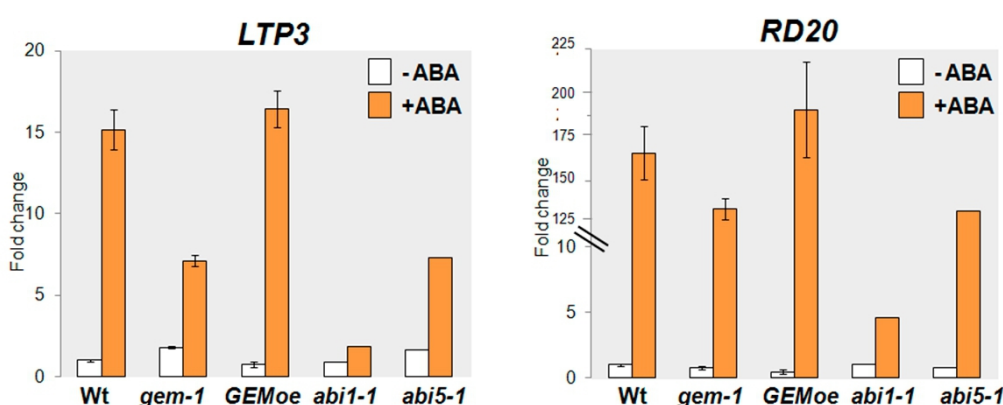


Fig. 55 Cambios de expresión medidos por RT-PCRq de los niveles de *LTP3* y *RD20* en plantas Wt, *gem-1*, *GEMoe*, *abi1-1* y *abi5-1* bajo condiciones de no inducción (- ABA) y de inducción por ABA (+ABA) (n=2 réplicas independientes).

Uno de los marcadores más conocidos en la respuesta a ABA es *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 29*) cuya función se desconoce pero cuya expresión está bien caracterizada y se sabe que se activa fuertemente tras tratamientos de ABA, estrés por sequía y frío (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994). Para comprobar el efecto de GEM sobre este marcador, hemos cuantificado los niveles de expresión de *RD29A* en nuestras plantas (Fig. 56).

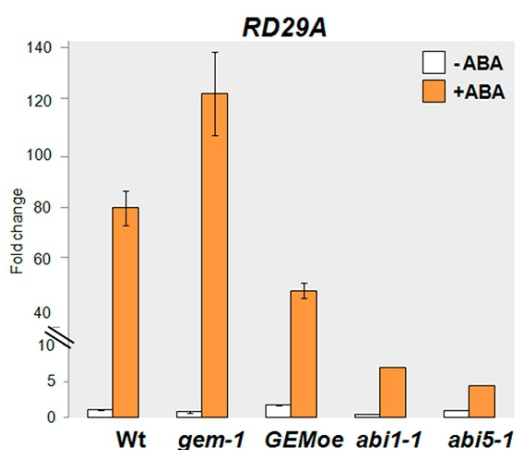


Fig. 56 Cambios de expresión medidos por RT-qPCR de los niveles de *RD29A* en plantas Wt, *gem-1*, *GEMoe*, *abi1-1* y *abi5-1* bajo condiciones de no inducción (- ABA) y de inducción por ABA (+ABA) (n=2 réplicas independientes)

Observamos que, en condiciones normales, *GEMoe* tienen mayores niveles de este transcrito que la planta silvestre pero, en condiciones de inducción por ABA, las plantas *GEMoe* presentan una inducción disminuida respecto a la esperada que se acerca al comportamiento de insensibilidad de las plantas mutantes *abi1-1* y *abi5-1* (Fig. 56). Al contrario ocurre en las plantas *gem-1* cuya inducción de este marcador de estrés es mayor, lo que significa que, a diferencia de lo que hemos visto para *LTP3* y *RD20*, GEM actúa como un regulador negativo sobre la señalización mediada por ABA a *RD29A*.

Para conocer cómo afecta GEM a la regulación de elementos de la cadena de señalización analizamos los cambios de expresión en plantas *gem-1* y *GEMoe* de dos componentes: *ABI1* y *ABAR/CHLH/GUN5*. *ABI1* es una de las principales protein fosfatasas PP2C que inhibe, en condiciones normales, la transducción de la señal a las kinasas SnRKs de la cadena de señalización y es, a su vez, un gen de respuesta a ABA (Koornneef *et al.* 1984, Leung *et al.* 1994). *ABAR* es una chelatasa que participa en señalización entre cloroplasto y núcleo en respuesta a ABA y estrés (Shen *et al.*, 2006), y cuyo papel como receptor de ABA ha sido discutido en varias publicaciones (Zhang *et al.*, 2002, Muller and Hansson, 2009). Además, ha sido descrito un bucle regulatorio entre *ABAR* y *TOC1*, del oscilador del reloj circadiano con implicación en la respuesta a sequía (Legnaioli *et al.* 2009), lo que podría ayudarnos a entender la desregulación asociada a las plantas *gem-1* y *GEMoe* en ambos grupos funcionales, el reloj circadiano y la respuesta a ABA.

En primer lugar, observamos en los experimentos que, como ocurría para el gen *RD29*, la falta de la proteína en *gem-1* es favorable a la expresión de *ABI1* aunque no observamos una disminución en las plantas *GEMoe* (Fig. 57).

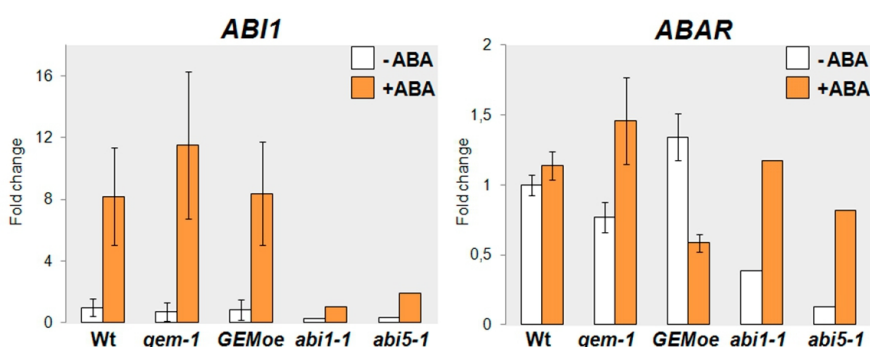


Fig. 57 Cambios de expresión medidos por RT-qPCR de los niveles de *ABI1* y *ABAR* en plantas Wt, *gem-1*, *GEMoe*, *abi1-1* y *abi5-1* bajo condiciones de no inducción (- ABA) y de inducción por ABA (+ABA) (n= 2 réplicas independientes)

En segundo lugar, vemos que los niveles de inducción del transcrito de *ABAR* son bastante débiles en este tratamiento de ABA (Fig. 57) pero que, en condiciones no inductivas, este gen está más activo en las plantas *GEMoe* y al contrario en *gem-1*. Al estudiar su expresión tras el tratamiento de ABA observamos que los niveles de transcrito cambian, encontrando un bloqueo de la inducción en las plantas *GEMoe* y, al contrario, en las plantas *gem-1* en las que los niveles de *ABAR* aumentan de manera similar a lo que ocurre en los mutantes insensibles *abi1-1* y *abi5-1*. Esto indica que GEM es un regulador negativo de la señalización de ABA a este gen y que, por lo tanto, *ABAR* puede ser la conexión entre reloj circadiano y respuesta a ABA de GEM.

10. Fenotipo de las plantas *gem-1* y *GEMoe* en la señalización por ABA

Dado que las plantas *gem-1* y *GEMoe* sufren una desregulación en la señalización de ABA, esta disfunción debe causar algún defecto relacionado con las funciones que el ABA desempeña en la planta: maduración de la semilla, dormición, germinación, crecimiento, resistencia a estrés, floración, entre otras. Para analizarlo, realizamos una observación del fenotipo relacionado con estas funciones en nuestras plantas en las que, en general, ya habíamos observado con anterioridad mayores portes finales de las plantas *GEMoe*, tallos más gruesos y pigmentación más verde, al contrario de lo que veíamos en las plantas *gem-1* que presentaban, además, problemas de germinación en las semillas almacenadas. Para un estudio más profundo de este fenotipo asociado a las funciones del ABA realizamos ensayos de germinación, elongación de raíz y resistencia a sequía o supervivencia.

10.1 Ensayos de dormición de la semilla

En primer lugar, hemos analizado los cambios en la germinación provocados por un defecto en la dormición de la semilla. La dormición de la semilla está directamente regulada por ABA cuya concentración aumenta en este estadio provocando un estado quiescente que permite al embrión sobrevivir a ambientes no propicios para la germinación (Finkelstein *et al.* 2002). La dormición en *Arabidopsis thaliana* (Col-0) tiene una duración de entre 3 y 4 días desde que la semilla sale de la silicua dehiscente y va desapareciendo gradualmente si no hay un factor externo que la elimine como el frío. Hemos analizado la dormición de las semillas *gem-1* y *GEMoe* cuantificando su nivel de germinación en placa a lo largo de 9 días con respecto a la de las plantas silvestres (Fig. 58).

Observamos que, mientras que las semillas Wt alcanzan un máximo de germinación de alrededor del 80% en el día 9, sólo un 65% de las semillas mutantes *gem-1* germinan en este tiempo. Al contrario, las semillas *GEMoe* superan el ratio de germinación de las semillas silvestres alcanzando cerca de un 95% de germinación en el día 9, lo que indica que GEM promueve la salida de la dormición de la semilla, una función controlada por el balance de ABA/GA (Fig. 58 B).

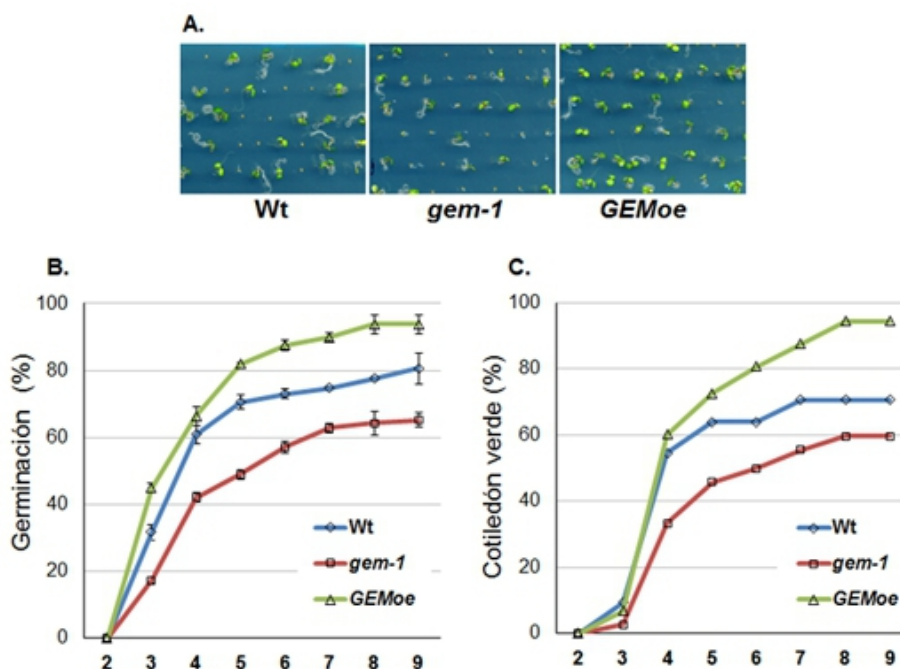


Fig. 58 (A) Germinación en placa de semillas Wt, *gem-1* y *GEMoe* a día 5; (B) Niveles de germinación de semillas recién recolectadas Wt, *gem-1* y *GEMoe* a lo largo de 9 días desde la siembra en placa; (C) Niveles de *cotiledón verde* de plántulas Wt, *gem-1* y *GEMoe* a lo largo de 9 días desde la siembra (sin estratificación) (n=2 réplicas independientes)

El *cotiledón verde* es el estado de desarrollo del embrión en el que los cotiledones empiezan a ser fotosintéticamente activos y supone una superación del estadio de semilla al vegetativo. Bajo este parámetro las plantas Wt, *gem-1* y *GEMoe* siguen el mismo patrón que la germinación de las semillas, lo que indica que las semillas que salen de la dormición tienen un desarrollo normal (Fig. 58 C).

El proceso de estratificación, que consiste en un tratamiento de frío (4°C) y oscuridad, elimina la dormición en las semillas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Tras este tratamiento, durante 24 y 48 horas, pudimos observar que a 3 días desde la siembra (d.a.s) en placa las diferencias en los niveles de germinación observados sin tratamiento desaparecen con el tratamiento de estratificación. Aún así, los niveles de germinación alcanzados en las semillas

GEMoe siguen siendo algo mayores, lo que indica que la sobreexpresión aumenta la eficiencia de la germinación natural de las semillas (Fig. 59)

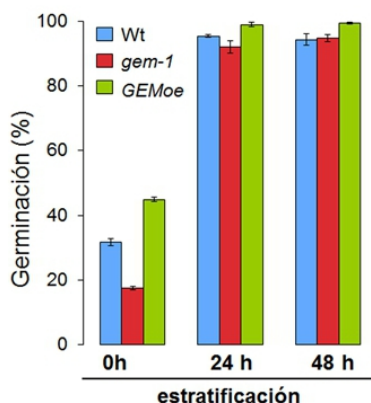


Fig. 59 Niveles de germinación a 3 d.a.s de las semillas Wt, *gem-1* y *GEMoe* en 0, 24 y 48 horas de tratamiento de estratificación (4°C, oscuridad).

10.2 Ensayos de geminación en ABA, NaCl y PAC

Hemos visto en los ensayos anteriores que GEM reduce la dormición de la semilla. Esto puede deberse a que GEM intervenga en la sensibilidad al ABA en el estadio de la semilla. Para comprobar esta hipótesis realizamos dos ensayos con distintos tratamientos: ABA, que permite apreciar cambios en la sensibilidad a la hormona y NaCl, que puede mostrar los cambios en sensibilidad a estrés salino. Como control usamos semillas del mutante de la PP2C ABI1 (*abi1-2*) y del mutante del factor de transcripción ABI5 (*abi5-1*), ambos insensibles al ABA. Para el tratamiento con ABA usamos diferentes concentraciones para poder distinguir fenotipos desde hipersensibilidad, en concentración de 0,1 μM de ABA, hasta resistencia, en concentración de 10 μM de ABA (Fig. 60).

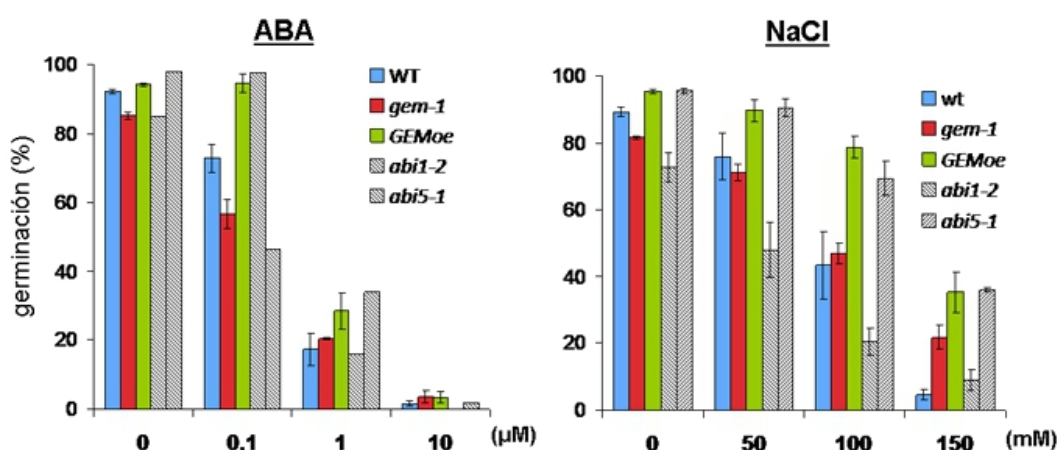


Fig. 60 Niveles de germinación de las semillas Wt, *gem-1*, *GEMoe*, *abi1-2* y *abi5-1* en tratamientos con ABA y NaCl a diferentes concentraciones. Los niveles de germinación corresponden con el día 3 d.a.s (n=2 réplicas independientes)

Observamos que las semillas *gem-1* y *GEMoe* sembradas en placa con una mínima concentración de ABA (0,1 μM) muestran una diferencia en los porcentajes de germinación; las semillas mutantes germinan en menor número y, contrariamente, las semillas *GEMoe* parecen insensibles a esta concentración, como el mutante *abi1-2*. A una concentración mayor, de 10 μM de ABA, las semillas *GEMoe* presentan un fenotipo de resistencia a ABA, como las semillas control *abi5-1* y, curiosamente, la semilla mutante *gem-1* también empieza a germinar por encima de la silvestre (Fig. 60). Así mismo, el tratamiento de estrés por NaCl reproduce el fenotipo de ABA en la germinación de las semillas *gem-1* y *GEMoe* observándose una fuerte resistencia de las semillas *GEMoe* a 100- 150 μM de NaCl similar a las semillas *abi5-1* (Fig.60).

Para descartar que, en el balance ABA/GA, sean los niveles de GA en las semillas *gem-1* y *GEMoe* los que provoquen este fenotipo de germinación realizamos un tratamiento con paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la síntesis de las giberelinas. Usamos como control semillas del mutante *jar1-1*, resistente a PAC (Fig. 61).

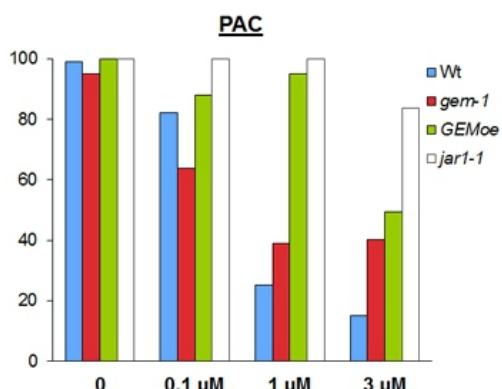


Fig. 61 Niveles de germinación de las semillas *Wt*, *gem-1*, *GEMoe* y *jar1-1* en tratamiento con PAC a diferentes concentraciones. Los niveles de germinación corresponden con el día 5 d.a.s.

Así, observamos que el fenotipo persiste a pesar de haber inhibido los niveles de GA siendo la germinación menor en las semillas *gem-1* y mayor en las *GEMoe* a bajas concentraciones de PAC (0,1 μM). Este tratamiento con PAC, también revela una fuerte resistencia de las semillas *GEMoe* que a concentración 1 μM en los que tiene un porcentaje de germinación parecido al mutante *jar1-1*.

10.3 Crecimiento radicular

El ABA es un inhibidor del crecimiento radicular (Finkelstein *et al.* 2002), además, sabemos que la expresión de GEM en la plántula se localiza principalmente en esta zona por lo que analizamos la posible regulación de GEM en la respuesta a ABA en este tejido. Para ello, realizamos mediciones de la longitud de las raíces principales de plantas *Wt*, *gem-1* y *GEMoe*

durante su crecimiento en placa vertical suplementada con distintas concentraciones de ABA y cuantificamos estas diferencias respecto al crecimiento de cada genotipo sin ABA.

Comprobamos que las raíces de las plantas *gem-1* son más cortas (40%) que las raíces de las plántulas silvestres y *GEMoe* que se mantienen en valores parecidos (cerca del 60%) a concentraciones de 10 μM de ABA (Fig. 62). Por otra parte, a 50 μM de ABA, concentración a que las raíces Wt frenan su crecimiento en un 30% de la longitud control, las raíces de las plántulas *GEMoe* siguen creciendo hasta un 37% de su longitud sin ABA, lo cual nos vuelve a indicar que GEM está reprimiendo la sensibilidad de las plantas a ABA.

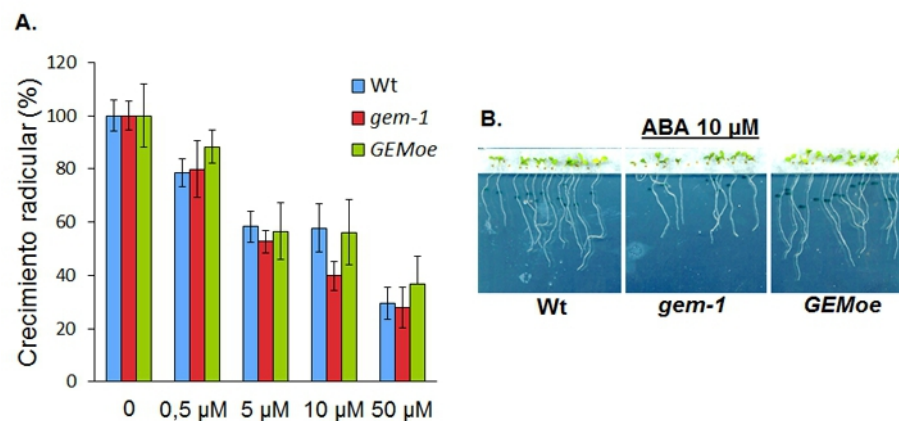


Fig. 62 (A) Niveles de elongación radicular de plántulas Wt, *gem-1*, *GEMoe* en tratamiento con ABA a diferentes concentraciones; (B) Raíces de plántulas Wt, *gem-1*, *GEMoe* creciendo en placa vertical MSS + ABA 10 μM

10.4 Supervivencia a sequía

La supervivencia a la sequía es otra función regulada por que controla el cierre estomático y la respuesta génica necesaria ABA (Leung and Giraudat 1998, Rock 2000, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). Así, las plantas insensibles a ABA o deficientes suelen tener una menor probabilidad de sobrevivir a un estrés por sequía debido a una falta de control en estas dos respuestas. Para conocer cómo afecta la falta o sobreexpresión de la proteína GEM a la superación de este tipo de estrés sometimos a plantas de 25 días de crecimiento en maceta a un período de sequía de 10 días hasta la aparición de síntomas de clorosis, momento que las plantas fueron rehidratadas durante 24 horas.

Observamos que las plantas mutantes *gem-1* tienen un nivel menor de supervivencia mientras que las plantas sobreexpresoras *GEMoe* se recuperan mejor después de la rehidratación (Fig.63).

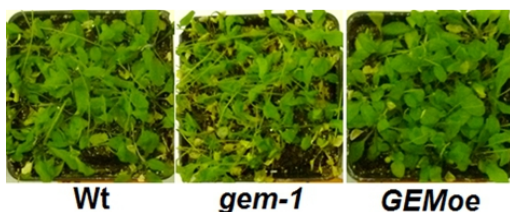


Fig. 63 Supervivencia a sequía de plantas Wt, *gem-1*, *GEMoe* después de 24 h de rehidratación.

Además, este fenotipo suele acompañarse de un adelantamiento en el tiempo de la floración de las plantas *gem-1* en estas condiciones de deshidratación, lo que relacionamos con las variaciones en los reguladores de floración vistas anteriormente.

11. Estudio de la regulación de *GEM* por ABA

Dada la participación de *GEM* en la señalización por ABA y que existen numerosos ejemplos de componentes del sistema de señalización que, a su vez, están regulados por ABA estudiamos esta posibilidad.

11. 1 Estudio *in silico* de la regulación de *GEM* y otros *GER* genes por ABA

A través de una búsqueda en datos publicados de genes de respuesta a ABA y diferentes tipos de estrés encontramos varios estudios transcripcionales a nivel genómico en los que se describe que *GEM* o alguno de los miembros de la familia *GER* se activan por este tipo de tratamientos. En uno de ellos, donde se analizan los cambios de expresión provocados por tratamientos de ABA, estrés por frío, sequía y NaCl (Matsui, *et al.* 2008) observamos que la expresión de *GEM* se encuentra inducida al menos dos veces en varios de estos tratamientos. Sorprendentemente, además de *GEM* encontramos a otros seis miembros de la subfamilia *GER*: *GER1*, *GER4*, *GER5*, *GER6*, *GER7* Y *GER8* (Tabla 7).

	ABA		Frío		Sequía		Sal	
	2h	10h	2h	10h	2h	10h	2h	10h
<i>GEM</i>	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>GER1</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>GER2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>GER3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>GER4</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>GER5</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>GER6</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>GER7</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>GER8</i>	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Genes *GER* inducidos por ABA, frío, sequía o sal (Extraído de Matsui et al., 2008)

Según esta información los genes *GER* podrían pertenecer a ese 10% de genes cuya transcripción se activa por ABA. Otro trabajo independiente a éste, también a nivel genómico, señala que *GEM* se induce 2,85 veces tras un tratamiento de estrés hídrico donde además se muestra que la inducción se ve interrumpida en las plantas mutantes *siz1-3* (Catala *et al.* 2007). *SIZ1* es una enzima que incorpora un grupo SUMO, parecido a la ubiquitina, reprimiendo la actividad de otras proteínas, entre ellas, varias de la señalización por ABA. En un tercer trabajo, encontramos fuertemente inducido a *GER5* (>4X) en un tratamiento con ABA y esta inducción se interrumpe en la planta mutante de la PP2C, *abi1-1* (Hoth *et al.* 2002). En todos los casos se trataba de inducciones muy tempranas, de entre 1 y 2 horas de tratamiento, lo que sugiere que *GEM* y *GER5* pudieran ser dianas directas de la regulación por ABA.

Los genes que responden a ABA contienen en sus promotores secuencias descritas como ABRE (ABA RESPONSIVE ELEMENT) o parecidas, ABRE-like (Choi *et al.* 2000, Hattori *et al.* 2002), elementos regulatorios que pertenecen a la familia de los G-box con un núcleo basado en la secuencia ACGT. Además se pueden encontrar elementos asociados CE (COUPLING ELEMENTS) como el denominado DRE/CRT (DEHIDRATATION RESPONSIVE ELEMENT) que se encuentra frecuentemente en promotores de genes que responden a estrés por sequía y estrés por frío (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994, Zhang *et al.* 2005). Mediante un análisis *in silico* identificamos estos elementos regulatorios en *cis* en el grupo de promotores de los genes *GER*. Observamos que varios de los promotores contienen secuencias relacionadas con la respuesta a ABA o estrés aunque no es común a todos los miembros puesto que *GER2*, *GER3* y *GER8* no las poseen (Tabla 8).

	<i>GER1</i> <i>GEM</i>	<i>GER1</i> <i>/FIP1</i>	<i>GER2</i>	<i>PRSL1</i> <i>/GER3</i>	<i>GER4</i>	<i>GER5</i>	<i>GER6</i>	<i>GER7</i>	<i>GER8</i>
<i>ABRE</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>ABRE-like</i>	5	1	0	0	2	2	1	0	0
<i>DRE/CRT</i>	1	1	0	0	2	1	2	2	2

Tabla 8: Elementos en *cis* relacionados con la regulación por ABA encontrados en los promotores de los genes *GER*

Mediante construcciones de promotores se han descrito los requisitos mínimos de un promotor inducible por ABA, el cual debe contener al menos dos copias de la secuencia ABRE, o como mínimo una copia y un elemento complementario (CE) como un motivo DRE/CRT (Skriver *et al.* 1991, Zhang, *et al.* 2005). El promotor de *GEM* reúne estas características de secuencia para la regulación transcripcional mediada por ABA aunque la localización de estos motivos es inusual ya que se sitúa a una distancia de unos 2400 pares de bases del ATG (Fig.64).

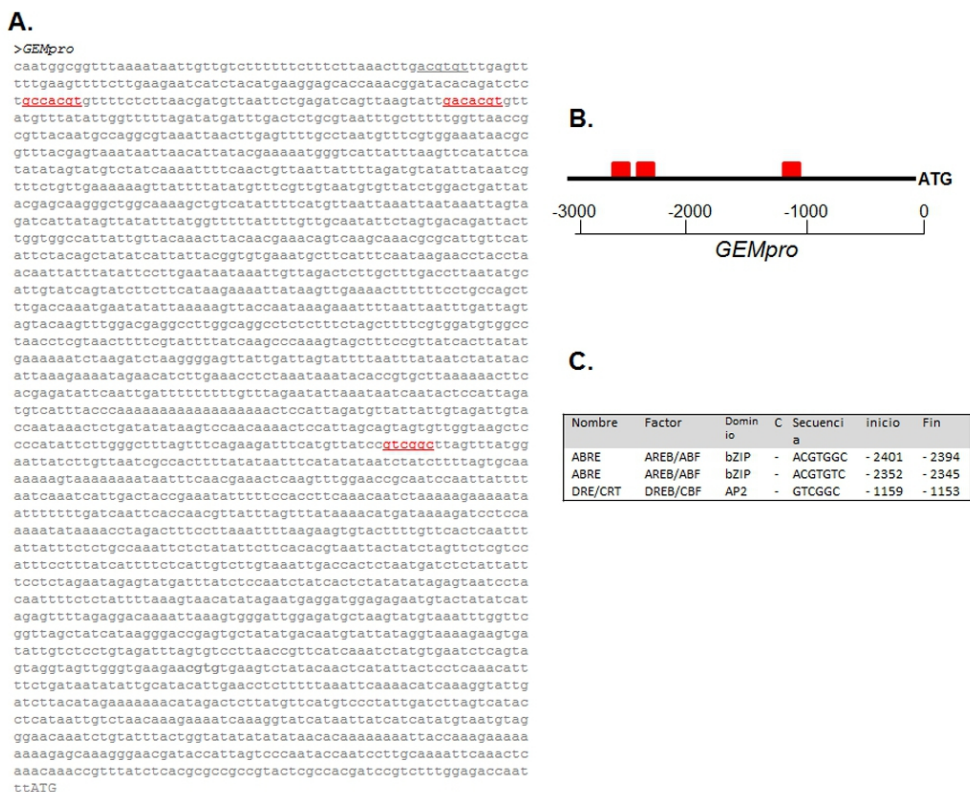


Fig. 64 (A) secuencia del promotor de GEM, (B) posiciones que ocupan en el promotor los motivos ABRE y DREB/CRT, (C) descripción de los motivos de unión

11.2 Estudio de la inducción de GEM en plantas GEM²⁷⁷⁴:GUS

Para comprobar las predicciones que hemos hecho *in silico* usamos las plantas GEM²⁷⁷⁴:GUS cuyo promotor tiene una longitud de 2774 pares de bases que incluye las posiciones de las dos cajas ABRE y de la caja DRE/CRT. Para ello, crecemos estas plantas en placa durante unos 6 días, momento en que las transplantamos cuidadosamente a una placa de medio suplementado con ABA (100 µM), NaCl (100 mM), GA (25 mM) o nada (control). Tras 8 horas de este tratamiento sumergimos a las plantas en el buffer de GUS y teñimos durante 4 horas. Comprobamos el efecto de diferentes tratamientos en la raíz de plántulas ya que es aquí donde fácilmente observamos la expresión de GEM como se describió en antes (Resultados, Bloque I). Observamos que la expresión del promotor se induce fuerte y específicamente en el tratamiento con ABA y no, en cambio, con la hormona antagonista del ABA, la GA (Fig. 65). Por otro lado, el tratamiento con NaCl no parece haber aumentado los niveles de expresión del gen reportero.

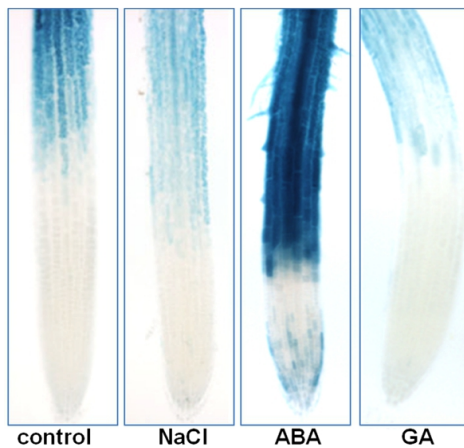


Fig. 65 Raíces de plantas *GEM²⁷⁷⁴:GUS* en tratamientos de 8 horas con NaCl (100 mM), ABA (100 μ M) y GA (25 mM)

Con el objetivo de conocer los tiempos de activación del promotor de GEM, realizamos un ensayo de *time-course* bajo diferentes tiempos de tratamiento con ABA (100 μ M) a 0, 4, 8, 24 y 48 horas. Observamos que, a partir de las 4 horas, el producto de la β -glucoronidasa aumenta en la raíz acumulándose hasta el final del tratamiento. Las células de la cofia empiezan a teñirse a partir de las 8 horas de tratamiento y para el final, entre las 24 y 48 horas, la expresión parece haberse extendido por la estela y ocupar, incluso, células cercanas al meristemo a nivel de epidermis (Fig. 66, A). Inesperadamente, cuando el tratamiento alcanza las 24 horas, observamos tinción en los tricomas de las primeras hojas verdaderas, un lugar donde no se detecta en ausencia de ABA (Fig. 66, B).

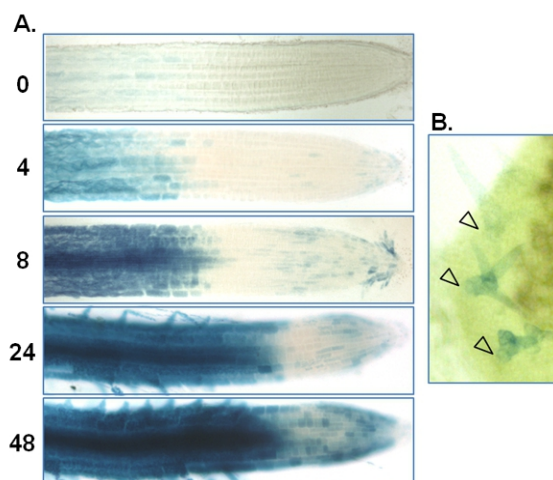


Fig. 66 (A) *Time-course* de tratamiento con ABA (100mM) en raíces de plantas *GEM²⁷⁷⁴:GUS* a tiempos 0, 4, 8, 24 y 48 horas; (B) Tricomas de planta *GEMpro:GUS* en el primer par de hojas después de un tratamiento de 24 horas con ABA (100 μ M)

Para contrastar estos resultados con los de expresión del gen, analizamos los cambios de expresión en plantas Wt tratadas con ABA respecto a las control, sin tratamiento. Tomamos muestras a 2, 24 y 48 horas de aplicación de ABA y observamos la dinámica de inducción del mRNA de *GEM* y de otro miembro de la familia *GER*, *GER5* (Fig. 67). Concluimos que, a diferencia de lo que vemos con el gen reportero, la inducción de *GEM* ocurre en las primeras 2 horas y, a partir de entonces, la acumulación de transcrito empieza a reducirse. De manera similar, *GER5* presenta su máximo nivel de transcrito a las 2 horas, no obstante, su acumulación se mantiene alta durante 48 horas (Fig. 67).

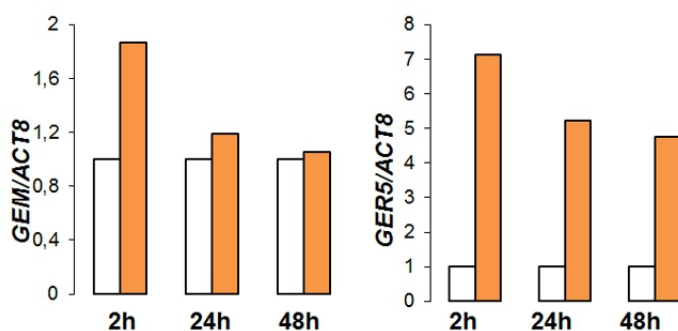


Fig.67 Time-course del transcrito *GEM* y *GER5* en plantas en un tratamiento con ABA (100 μ M) a tiempos 2, 4 y 24 horas

11.3 Funcionalidad de los sitios *ABRE* y *DREB/CRT*

Hemos visto que la expresión de *GEM* responde a la inducción por ABA y hemos localizado *in silico* dos regiones *ABRE-ABRE* en su promotor. No obstante, la distancia de estas cajas al codón de inicio no coincide con los resultados de análisis estadísticos de promotores de genes de respuesta a ABA. Para demostrar la funcionalidad de las cajas *ABRE* en la inducción de *GEM* construimos una línea reportera *GUS* bajo un promotor más corto que no incluye las cajas *ABRE-ABRE* (*GEM*²⁰⁴⁹:*GUS*) (Fig. 68 derecha). Al analizar la respuesta a ABA de la nueva construcción en

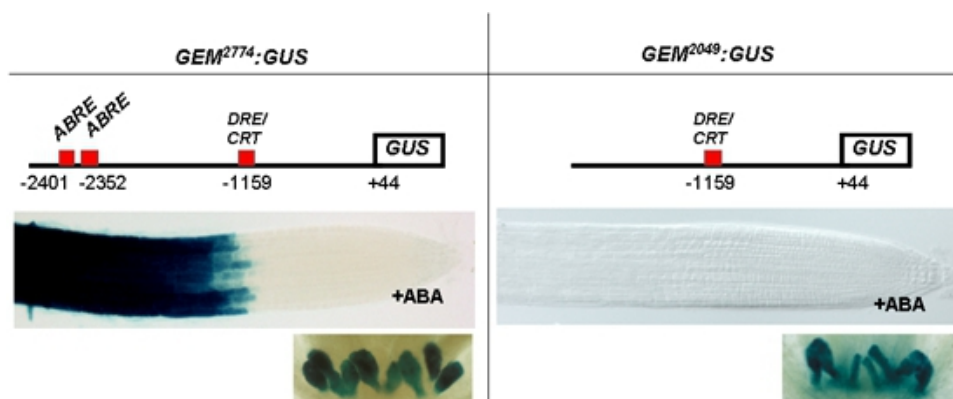


Fig. 68 A la izquierda, raíz de plantas *GEM*²⁷⁷⁴ *pro*:*GUS* en inducción con ABA 100 μ M, estípulas y detalle del promotor; a la derecha raíz de plantas *GEM*²⁰⁴⁹ *pro*:*GUS* en inducción con ABA 100 μ M, estípulas y detalle del promotor

planta, observamos que, efectivamente, la inducción de la β -glucoronidasa no ocurre en ausencia de las cajas *ABRE-ABRE*. Para las mismas condiciones de tiempo de aplicación de ABA y tiempo de exposición al sustrato de la β -glucoronidasa, la expresión del reportero GUS es indetectable en las plantas *GEM*²⁰⁴⁹:*GUS* a nivel de raíz mientras que la tinción en las estípulas permanece igual que en plantas que expresan GUS bajo el promotor que contiene las cajas (Fig. 68 abajo).

Comprobamos también la respuesta del nuevo promotor a condiciones de estrés por salinidad y sequía observando que la expresión es nula en el caso del estrés con NaCl pero, sorprendentemente, en el estrés por sequía existe una cierta expresión localizada más arriba en la zona de elongación de la raíz, lo que indica que la caja *DRE/CRT* puede ser suficiente para la expresión del promotor en respuesta a deshidratación (Fig. 69). Además, esta expresión es específica de las filas de células epidérmicas de pelo radicular, lo que puede estar relacionado con lo publicado anteriormente (Caro et al., 2007).

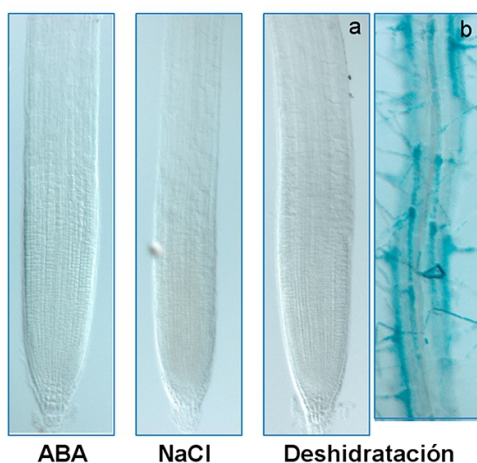


Fig.69 Raíces de plantas *GEM*²⁰⁴⁹:*GUS* en tratamientos de ABA, NaCl y deshidratación; (a) zona cercana al meristemo radicular; (b) zona cercana al meristemo apical

12. Estudio de la regulación de *GEM* en mutantes de ABA

La vía de señalización del ABA por la que la señal alcanza el núcleo y regula la transcripción de los genes de respuesta, como en nuestro caso *GEM*, implica una serie de componentes actualmente bien caracterizados como los receptores *PYR/PYL/RCAR*, las fosfatasa *PP2C* (*ABI1*, *ABI2* o *HAB1*), las kinasas *SNRKs* y los factores de transcripción (*ABI3*, *ABI4* o *ABI5*).

Para describir la vía de señalización de la que depende la expresión de *GEM* utilizamos una batería de mutantes de la cadena de señalización en los que analizamos los niveles del transcrito *GEM* en paralelo con *GER5*. Para ello, extrajimos el RNA de estas plantas de 10 días de mutantes y sus correspondientes ecotipos silvestres, tratadas (+ ABA) o no (- ABA) durante dos horas con ABA 100 μ M y analizamos los niveles de transcrito por RT-PCR cuantitativa.

Comparando la expresión basal (-ABA) respecto a la alcanzada en inducción (+ABA) en cada genotipo, observamos que la respuesta ABA de estos dos miembros de la familia *GER* se anula en varios de estos mutantes. Por un lado, la inducción de *GEM* se anula en los mutantes de las fosfatasa *hab1-1 abi1-2* y *abi1-1*, en el mutante triple de las kinasas *snrk 2.2-2.3-2.6*, y en los mutantes de los factores de transcripción *abi3-1* y *abi5-1*. Por otro lado, la inducción de *GER5* se anula en el mutante de la fosfatasa *abi1-1* y en el mutante séxtuple de los receptores de ABA *pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8* (Fig. 70)

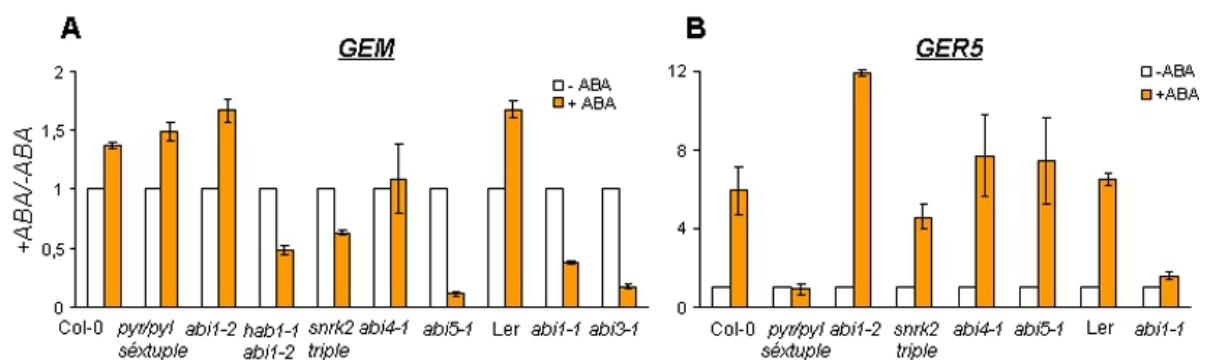


Fig. 70 (A) Expresión de *GEM* en plantas de 10 días sin (-ABA) y con (+ABA) inducción por ABA: Col-0, *pyr/pyl séxtuple*, *abi1-2*, *hab1-1 abi1-2*, *snrk2 triple*, *abi4-1*, *abi5-1*, Ler, *abi1-1* y *abi3-1*, (B) Expresión de *GER5* en plantas de 10 días sin (-ABA) y con (+ABA) inducción por ABA: Col-0, *pyr/pyl séxtuple*, *abi1-2*, *snrk2 triple*, *abi4-1*, *abi5-1*, Ler, y *abi1-1* (n=2 réplicas independientes)

Aún teniendo un punto común en la fosfatasa ABI1, ambos genes siguen rutas de inducción diferentes según estos resultados. Mientras que para la inducción de *GEM*, el factor de transcripción *ABI5* parece totalmente necesario no lo es para la inducción de *GER5* que no se ve afectada en el mutante *abi5-1*.

De la misma manera, analizamos la cantidad de proteína *GEM* mediante WB con el anti-*GEM*pep. Observamos algunas coincidencias con las expresiones medidas del transcrito, no obstante, a este tiempo, no se aprecia una disminución de proteína en algunos mutantes como *snrk 2.2-2.3-2.6* o *abi3-1*. En cambio, el efecto de la mutación de *ABI5* es claro también a nivel de la proteína *GEM* (Fig. 71)

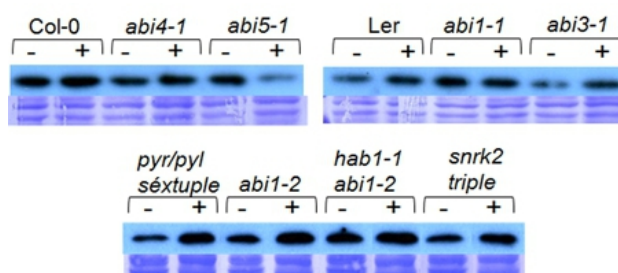


Fig. 71 Expresión de proteína *GEM* en plantas de 10 días sin (-ABA) y con (+ABA) inducción por ABA: Col-0, *pyr/pyl séxtuple*, *abi1-2*, *hab1-1 abi1-2*, *snrk2 triple*, *abi4-1*, *abi5-1*, Ler, *abi1-1* y *abi3-1*.

Discusión y Conclusiones



Hasta la fecha se han identificado un total de 260 genes con dominio GRAM dentro del clado de las plantas verdes (*Viridiplantae*) que agrupa a 35 especies de plantas. Esta cantidad es comparable con los 626 genes que poseen un dominio GRAM en animales (*Metazoa*) agrupados en 59 especies. No obstante, el conocimiento de estas proteínas en plantas está muy lejos de compararse al de animales donde muchas de ellas han sido ya descritas en funciones relacionadas con la señalización celular. De entre ellas, las más estudiadas por su relación con la enfermedad muscular del Síndrome de Charcot-Marie-Tooth en humanos son las miotubularinas (Bolino *et al.* 2000).

El objetivo de esta tesis ha sido ahondar en el conocimiento de las proteínas con dominio GRAM en *Arabidopsis thaliana* para lo cual hemos definido un nuevo grupo de nueve proteínas basado en homología de secuencia y que hemos denominado proteínas GER (GEM RELATED): GEM, GER1, GER2, GER3, GER4, GER5, GER6, GER7 y GER8. Hemos estudiado este grupo enfocándonos en una de ellas: GEM (GL2 EXPRESSION MODULATOR) identificada en trabajos anteriores con funciones de regulación del ciclo celular y modulación de la expresión de algunos genes de diferenciación celular (Caro *et al.* 2007).

a) GEM es un gen de respuesta a ABA a través de la vía de señalización ABI1-SnRK2s-ABI3/ABI5-ABRE

El ABA controla la expresión de casi un 20% de los genes de *Arabidopsis*, de los cuales más de la mitad son activados y el resto reprimidos (Matsui *et al.* 2008). Esta cifra está por encima del número de genes regulados por cualquier otra hormona y su magnitud da una idea de la importancia funcional de su regulación.

Los estudios de la inducción del transcrito de *GEM* por ABA medida por RT-qPCR a distintas horas de aplicación han indicado que este gen, así como su homólogo *GER5*, se inducen tempranamente por ABA. A las 2 horas de la aplicación, los niveles de transcrito alcanzan su máximo (+1,8 y +7 veces, respectivamente). En el caso de *GEM*, pasadas 8 horas desde el inicio del tratamiento, la inducción decae hasta alcanzar los niveles normales a las 24 horas. No ocurre así con *GER5* donde los niveles se siguen manteniendo altos todavía a 24 horas de tratamiento. En cambio, la actividad del promotor seguida mediante el gen reportero GUS (*GEM*²⁷⁷⁴:GUS) muestra una acumulación continua con el paso de las horas. Esto nos indica que existe una regulación post-transcripcional del mRNA de *GEM* que el gen reportero no sufre y que controla la acumulación del transcrito y/o la proteína una vez pasada la respuesta rápida.

Sabemos por un trabajo reciente que *GEM* se acumula (+1,95 veces) en el mutante doble *xrn2 xrn3* afectado en dos proteínas exoribonucleasas 5'-3' que regulan la acumulación de transcrito resultante de la inducción de genes en condiciones de estrés (Estavillo *et al.* 2011). *XRN2* y *XRN3* se inhiben por la acumulación de los segundos mensajeros lipídicos PAP o IP_3 en estudios de estrés celular (Estavillo, *et al.* 2011, Xiong *et al.* 2001). A su vez, la acumulación de estos mensajeros secundarios está regulada por la fosfatasa de fosfolípidos *FRY/ALX8/SAL1* de manera que en el mutante *alx8* se acumula el transcrito de *GEM* (+1,61 veces) lo que sugiere que el transcrito de *GEM* sea una diana de este sistema de regulación post-transcripcional por silenciamiento génico (Fig. 72). Sin embargo, este no parece ser el caso del transcrito de *GER5* que en el mutante *alx8* se reduce (-1,97 veces), sugiriendo mecanismos de regulación diferentes para ambos genes homólogos.

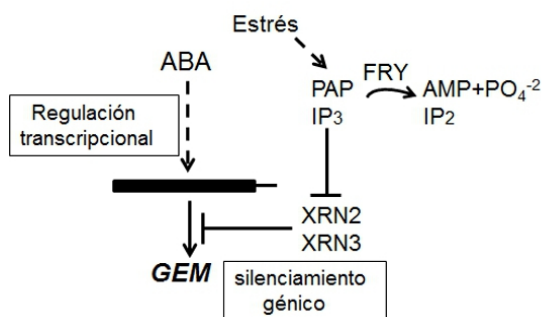


Fig. 72 Regulación de la transcripción de *GEM* mediada por ABA y de la acumulación de su transcrito mediada por las RNAsas *XRN2* y *XRN3*.

Los análisis transcripcionales de *GEM* en plantas de fondos mutantes de las proteínas que participan en la señalización del ABA nos ha permitido saber que la activación de *GEM* depende de algunos reguladores bien conocidos. Entre éstos, el primer elemento de la vía de señalización son los receptores de ABA *PYR/PYL/RCAR* cuyo reciente descubrimiento ha establecido una ruta común para la respuesta a ABA (Ma *et al.* 2009, Nishimura *et al.* 2009, Park *et al.* 2009, Santiago *et al.* 2009). Hemos utilizado un mutante séxtuple *pyr1-pyl1-pyl2-pyl4-pyl5-pyl8* en el que la señalización de ABA está muy afectada y posee una la elevadísima insensibilidad que presentan sus semillas al ABA (100 μ M) (Gonzalez-Guzman *et al.* 2012). En estas plantas la inducción de *GER5* se ve totalmente anulada. No, en cambio, la inducción de *GEM* cuya expresión podría estar regulada por otros miembros de la familia de los receptores *PYR/PYL/RCAR* compuesta por 14 proteínas.

En un segundo nivel de la cadena de señalización se encuentran las fosfatasas de tipo PP2C que actúan como reguladores negativos, inhibiendo la actividad de las kinasas SnRK2s en condiciones normales de no inducción por ABA o estrés. Un aumento de ABA provoca el secuestro de las fosfatasas PP2C por los receptores de ABA *PYR/PYL/RCAR* lo que permite la actividad de las

SnRK2s en la amplificación de la señal hasta el núcleo. Una de las principales fosfatasas PP2C es ABI1 cuya implicación en la regulación de *GEM* y *GER5* hemos analizado en plantas mutantes de ABI1 portadoras de dos alelos distintos, *abi1-1* y *abi1-2*, comprobando que la inducción por ABA de ambos genes sólo se anula en el mutante portador del alelo *abi1-1*, mientras que en las plantas *abi1-2* los niveles de inducción, incluso, se han incrementado. El alelo *abi1-1* corresponde a una mutación puntual que afecta al dominio de unión al receptor PYR/PYL/RCAR pero que no afecta a las funciones de unión a las kinasas SnRK2s por lo que el mutante es insensible a ABA pero mantiene su actividad represora sobre las SnRK2s (Koornneef *et al.* 1984, Leung and Giraudat 1998, Meyer *et al.* 1994). En cambio, el alelo *abi1-2* es un mutante de T-DNA nulo donde la falta de la proteína provoca que una actividad permanente de la respuesta a ABA que depende de esta vía. Por lo tanto, los resultados obtenidos para la inducción de *GEM* y *GER5* en ambos mutantes son, por lo tanto, son coherentes. Estos resultados confirmarían los resultados publicados en los microarrays de plantas *abi1-1* que apuntaban, entre otros, a *GER5* como diana de la regulación por ABI1 (Hoth *et al.* 2002). Por otro lado, el aumento que vemos de los niveles de inducción de *GEM* y *GER5* en el mutante *abi1-2* puede indicar que otras PP2C colaboren con ABI1 en la señalización del ABA hacia estos genes. Una segunda fosfatasa es también analizada en el doble mutante *hab1-1 abi1-2* (Saez *et al.* 2006) donde la mutación del gen *HAB1* previene la inducción de *GEM* vista en *abi1-2*. Desconocemos la causa por la que este doble mutante de respuesta a ABA activada no reproduce los resultados de *abi1-2* aunque podría tener que ver con que alguna diana de la vía de señalización de HAB1 fueran regulara negativamente la expresión de *GEM*.

En un tercer nivel se encuentran las kinasas SnRK2s, reguladores positivos de la señalización por ABA y diferentes tipos de estrés. En condiciones de no-inducción estas kinasas están inactivadas por las fosfatasas PP2C pero cuando los niveles ABA aumentan se liberan y actúan de manera específica a sustrato lo que especializa la respuesta a diferentes condiciones de estrés (Fujii *et al.* 2007, Mustilli *et al.* 2002). El triple mutante *snrk2.2-snrk2.3-snrk2.6* es insensible en su germinación a elevadas concentraciones de ABA (50µM) lo que deja clara la responsabilidad de estas tres kinasas en la respuesta a ABA (Nakashima *et al.* 2009). Hemos analizado la respuesta de *GEM* a ABA en este triple mutante de estas proteínas *snrk 2.2-2.3-2.6* donde su inducción se encuentra anulada. No podemos decir lo mismo del transcrito de *GER5* al que no hemos encontrado afectado en estas plantas, por lo que pensamos que pueda estar regulado por otras kinasas de la familia de las SnRK2s compuesta por 10 proteínas.

Finalmente, las kinasas SnRK2s, en condiciones de inducción, activan a varios factores de transcripción implicados en la señalización de ABA. Estos factores de transcripción son los activadores finales de la cadena de señalización. El grupo más representado es el de las proteínas ABFs/AREBs, siendo ABI5 el mejor caracterizado, pero además, ABI3 con dominio de tipo B3 y

ABI4 con dominio AP2/APETALA. ABI3, ABI4 y ABI5 regulan con solapamiento la transcripción de una serie de genes de respuesta a ABA y/o genes específicos de semilla. Se sabe que ABI3 y ABI5 actúan sinérgicamente sobre la respuesta de los genes a ABA y su unión ha sido demostrada *in vitro*, por lo que se piensa que formen un complejo transcripcional ABI3-ABI5 (Nakamura *et al.* 2001). No obstante, la sobreexpresión de ABI3 no rescata la mutación de ABI5 y sí al contrario, lo que significa que ABI3 actúa sobre ABI5 (Lopez-Molina *et al.* 2002). Nuestros estudios sobre la inducción de *GEM* en el mutante de *abi5-1* (Finkelstein and Lynch 2000) han constatado que ABI5 es necesario para que la inducción de *GEM* ocurra tras el tratamiento de ABA mientras que no afecta a la inducción de *GER5*. Por otra parte, las plantas mutantes *abi3-1* también presentan una falta de inducción para el transcrito de *GEM* lo que nos lleva a pensar que el complejo ABI3-ABI5 podría estar actuando conjuntamente sobre el promotor de *GEM*. Finalmente, en el mutante *abi4-1* los resultados de expresión de *GEM* no son concluyentes aunque sí vemos claramente que ABI4 no anula la expresión del otro miembro de los genes *GER*, *GER5*. Así, podemos concluir que las inducciones de *GEM* y *GER5* se enmarcan dentro del modelo actual de señalización del ABA donde ambas siguen rutas independientes conectadas por la fosfatasa ABI1 (Fig. 73)

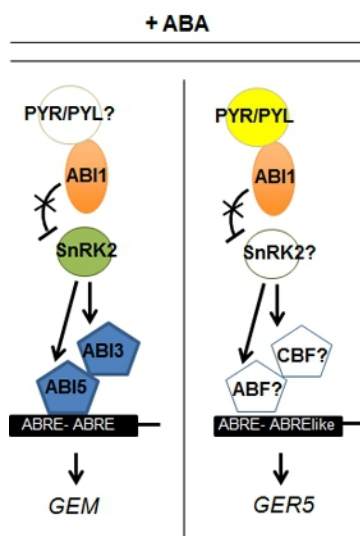


Fig. 73 Ruta de señalización por ABA que siguen las inducciones de *GEM* y *GER5* según el modelo actual

Muchos de los genes de respuesta a ABA contienen en sus regiones reguladoras secuencias en *cis* de las que depende su inducción. La más representada es la caja ABRE (ACGTGG/TC) que ha sido verificada en un 20% de genes de respuesta a ABA (Gomez-Porrás *et al.* 2007). La inducción transcripcional mediada por ABA requiere la presencia de un par de copias de la caja ABRE o, al menos, un elemento asociado (CE). El motivo *DRE/CRT* (*DEHIDRATATION RESPONSIVE ELEMENT*) (A/GCCGAC) se ha identificado como uno de estos elementos asociados a la caja ABRE. Mediante búsqueda *in silico* de este tipo de elementos en *cis* en el promotor de *GEM*

hemos encontrado de dos cajas *ABRE* (*ABA RESPONSIVE ELEMENT*) a una distancia de ~2400 pares de bases del inicio de la traducción de *GEM* y una caja *DRE/CRT* (*DEHIDRATATION RESPONSIVE ELEMENT*) a ~1100 pares de bases. La construcción de un nuevo promotor que no contiene el par de cajas *ABRE-ABRE* con el reportero *GUS* (*GEM²⁰⁴⁹:GUS*) nos ha permitido demostrar la funcionalidad de las cajas *ABRE* en la respuesta de *GEM* donde La falta de esta secuencia del promotor anula la respuesta del gen reportero en las raíces de las plantas tratadas con ABA.

Otro dato que refuerza esta conclusión es que *ABI5* es diana de la regulación negativa de *SIZ1*, la cual inhibe su actividad al incorporar un grupo *SUMO* a la proteína como parte de los procesos de regulación de la respuesta a sequía (Miura and Hasegawa 2009) y que la mutación de este inhibidor de *ABI5* en el mutante *siz1-1* la inducción de *GEM* por ABA se ve aumentada (Catala *et al.* 2007)(Fig. 74).

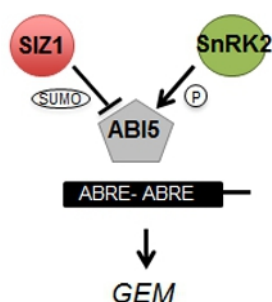


Fig. 74 Regulación de *ABI5* mediada por sumoilación (inhibición) y fosforilación (activación) y su implicación sobre la inducción de *GEM*

Además de *GEM* (+2,31) y *GER5* (+6,57) varios genes de la familia *GER* han sido identificados en estudios transcripcionales globales como genes que responden a ABA: *GER1* (+1,88), *GER4* (+8,95), *GER6* (+9,76), *GER7* (+4,95), *GER8* (+4,55) (Matsui, *et al.* 2008). La búsqueda *in silico* en los promotores de estos genes nos muestra que todos ellos, salvo *GER6* y *GER7*, poseen al menos una caja *ABRE-like* y una caja *DRE/CRT*. Al igual que *GEM*, *GER4* posee dos cajas *ABRE* muy probablemente implicadas en su inducción por ABA. *GER6* y *GER7* comparten promotor y sólo hemos encontrado dos cajas *DRE/CRT* muy cercanas entre ellas. El conjunto de estos datos nos lleva a pensar que el grupo de proteínas *GER* tenga una función común, y quizás redundante, en la respuesta a ABA.

Por otra parte, las secuencias *DRE/CRT* son reconocidas por proteínas *DREBs/CBFs*, un grupo de factores de transcripción con dominio *AP2/APETALA* que intervienen en la respuesta a estrés y control del crecimiento en una vía de señalización también llamada independiente de ABA. Hemos visto que las raíces de plantas con el promotor corto (*GEM²⁰⁴⁹:GUS*) sí responden a tratamientos de deshidratación o sequía lo que puede estar indicándonos que la caja *DRE/CRT* es funcional. Esto explicaría que *GEM* haya sido identificado en un estudio de respuesta rápida a

sequía como un gen cuya expresión se induce tras dos horas de tratamiento de sequía (+2,85 veces)(Catala, *et al.* 2007). La vía o regulón dependiente de ABA y la vía independiente de ABA convergen en muchos casos de genes de respuesta y no sería raro que *GEM* fuera uno de esos casos (Fig. 75)

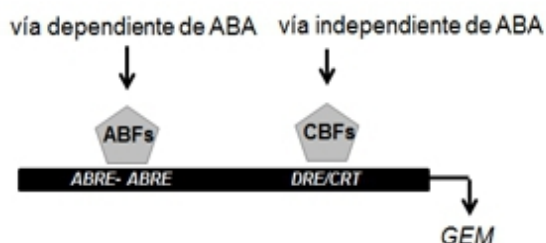


Fig. 75 Regulación de *GEM* en vía dependiente e independiente de ABA

El patrón de expresión con el que responde el promotor de *GEM* en ausencia de las cajas *ABRE-ABRE* al tratamiento de sequía es interesante. Se localiza en la zona de elongación y específicamente en la fila de células epidérmicas de tipo pelo lo cual pueda estar relacionado con la unión de *GEM* a *TTG-1* (Caro, *et al.* 2007), una proteína con dominio *WD40*, descrita en un trabajo anterior que forma parte de un complejo regulador de la diferenciación celular a pelo radicular.

b) *GEM* es un regulador negativo de la señalización mediada por ABA

Nuestros ensayos han revelado uniones de *GEM* a lípidos y proteínas relacionadas con la señalización celular que se asocia al dominio en animales pero, hasta ahora, desconocemos a qué procesos afecta la regulación de la proteína.

Partiendo de estudios de análisis transcripcional a nivel global de plantas de 10 días de edad mutantes para la proteína *GEM* (*gem-1*) y transgénicas sobreexpresoras (*GEMoe*) hemos determinado que *GEM* tiene un papel preferentemente represor, directo o indirecto, sobre la transcripción de algunos genes ya que las plantas mutantes tienen unos porcentajes mayores de genes activados (44 de 57) frente a la plantas sobreexpresoras, que tiene mayores niveles de genes reprimidos (51 de 76). Agrupando estos genes por categorías funcionales hemos comprobado que una mayor parte de los genes regulados por *GEM* son de respuesta a estímulos: lumínico, hormonal y otros (el 50% en plantas *gem-1* y el 40% en plantas *GEMoe* por lo que concluimos que *GEM* pueda cumplir una función de regulador negativo en señalización. Mediante estudios comparativos de los análisis transcriptómicos de plantas *gem-1* y *GEMoe* con transcriptomas de respuesta a ABA observamos que ambos genotipos presentan un enriquecimiento en genes de respuesta a ABA (60%), muy por encima del porcentaje encontrado en *Wt* (20 %), por de lo que concluimos que *GEM* debe estar implicada en la regulación de la

señalización mediada por ABA. En estos estudios comparativos comprobamos que las plantas *gem-1* presentan activación transcripcional en genes que se inducen por ABA. Entre los genes desregulados encontramos varias proteínas implicadas en la señalización por ABA a varios niveles. A nivel de la transducción, el receptor *PYL5*, las kinasas *MAPKKK19* y calmodulina *CML38*; a nivel de la biosíntesis de segundos mensajeros, la fosfolipasa *PLA2 α* y las lipooxigenasas *LOX3* y *LOX4*; y a nivel regulador de la transcripción; el inhibidor de respuesta a ABA *WRKY38*. Las plantas sobreexpresoras, en cambio, presentan inhibición en genes del transporte de lípidos: *LTP3* y *LTP4*, de la activación transcripcional relacionada con ABA y estrés, *ANAC019*, *ANAC029* y *ANAC036*, y de genes cuya expresión se induce fuertemente por ABA y sequía, *RD20* y *H1-3*. Por último, hemos comprobado mediante RT-qPCR que la respuesta de *RD29A*, un gen bien caracterizado en su respuesta a ABA, se encuentra más inducido por ABA en plantas *gem-1* y menos en plantas *GEMoe*. Por lo tanto, concluimos que GEM es un regulador negativo de la señalización por ABA.

c) GEM se expresa durante estadios de desarrollo relacionados con un aumento de ABA

De la misma manera que se induce la expresión de *GEM* en las raíces, el patrón temporal de expresión durante el desarrollo de la planta utilizando el reportero GUS (*GEM*²⁷⁷⁴:GUS) se asocia a localizaciones con picos de producción o acumulación del ABA. Así, encontramos que la expresión de *GEM* en la raíz está asociada a la capa epidérmica, por encima del meristemo radicular donde empieza la llamada zona de elongación. Sin embargo, deben existir otros reguladores que sitúen su expresión en otros tejidos específicos como la raíz, las estípulas o los hidatodos. En relación a la localización de la expresión de *GEM*, hemos podido observar que bajo condiciones de inducción continua durante 24 horas la expresión de *GEM* se hace visible en los tricomas. Esta localización no ocurre, o al menos de manera visible, en condiciones normales de crecimiento lo que puede indicarnos que *GEM* se expresa en los tricomas en niveles no detectables mediante el reportero GUS.

Al llegar al estadio reproductivo la expresión aparece de manera intermitente, activándose y reprimiéndose en diferentes tejidos que se están desarrollando: los primordios de estambres en el día 5, la capa del tapetum de los esporocitos en el día 7, las papilas del estigma en el día 10, los óvulos del gineceo en el día 12 y finalmente los granos de polen en el día 14.

Centrando la atención sobre los procesos de embriogénesis y maduración de la semilla que ocurren dentro de la silicua tras la fertilización de la flor, hemos advertido que la expresión de *GEM* se localiza dentro de las semillas en formación y maduración. Concretamente en el endospermo de la semilla (aleurona), formado por una monocapa de células triploides de origen cigótico subyacente a las células del óvulo o testa (Fig. 76).

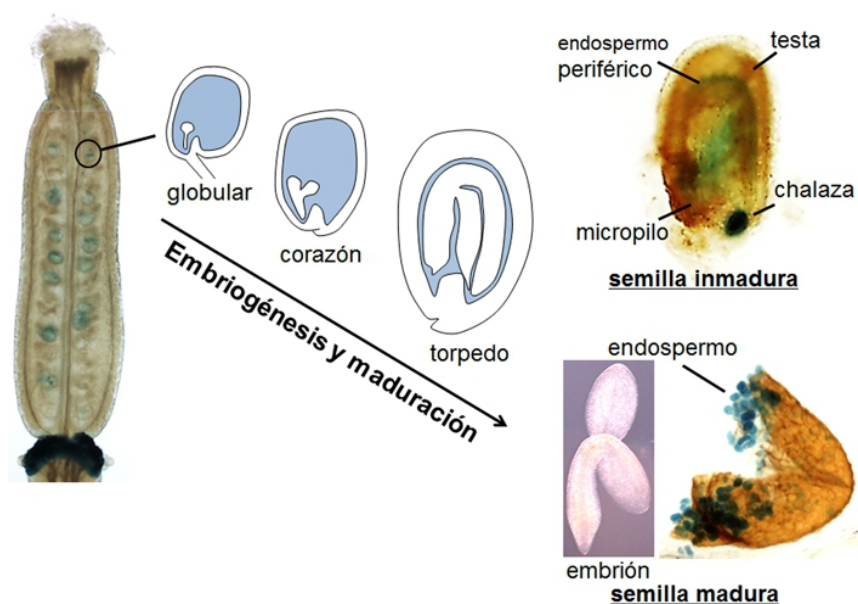


Fig 76. Expresión de *GEM* en el endospermo durante la embriogénesis y la maduración de la semilla

Esta expresión empieza a detectarse al inicio de la embriogénesis que ocurre pasadas unas 30 horas desde la fertilización de la flor y que corresponde con la formación del embrión globular y continúa hasta el final de la embriogénesis, cuando el embrión alcanza su tamaño final en el embrión torpedo. Durante esta etapa, el embrión crece paralelamente al desarrollo del endospermo gracias a la alimentación del tejido materno que les rodea (García *et al.* 2005, Olsen 2004). Así lo observamos en las tinciones de GUS donde el endospermo aparece al inicio de la embriogénesis como un tejido viscoso encerrado en las paredes del óvulo. Esta localización ha sido contrastada mediante WB, habiendo observado que las silicuas en esta fase de desarrollo acumulan una gran cantidad de proteínas GEM, lo que puede señalar que GEM sea necesaria para alguna función en este estadio.

Cuando el embrión ha alcanzado su tamaño final se inicia un proceso marcado por la acción del ABA, el cual se cree que proviene del embrión, en el que el endospermo sufre una transformación. Sus vacuolas empiezan a acumular proteínas y lípidos de reserva hasta que la semilla queda deshidratada y el embrión detenido en un estado quiescente. El resultado es una semilla madura y durmiente capaz de sobrevivir a condiciones desfavorables. Dado que la testa de la semilla madura ha adquirido una coloración opaca, sólo podemos ver la expresión de *GEM* abriéndola. Esto nos permite ver que el gen reportero GUS todavía se expresa en la fina capa que queda de endospermo pegada a la testa. Esta tinción es también contrastada mediante WB,

viéndose que la acumulación de la proteína es mínima en la semilla madura, tanto seca como embebida, lo que tiene sentido pues el volumen de esta capa se ha reducido mucho.

Las características de la expresión de *GEM* descritas en este trabajo establecen una analogía funcional con otra proteína GRAM identificada en cebada, *ABA45* (Liu *et al.* 1999) que, además, fue la primera proteína del dominio GRAM descrita en plantas y los estudios de su expresión han demostrado que, como *GEM*, se localiza en el endospermo de la semilla y se induce por ABA. Mediante estudios de homología de secuencia hemos demostrado que el grupo de genes *GER* que describimos aquí, más específicamente *GEM*, *GER1* y *GER5*, es homólogo de *ABI45* por lo que los resultados extraídos de su estudio podrían extenderse a otras familias de angiospermas.

d) *GEM* actúa sobre la germinación como un regulador negativo de la vía de señalización del ABA

El endospermo ha sido clásicamente definido como un tejido de almacenamiento de proteínas y lípidos durante la maduración de la semilla (Penfield *et al.* 2004), pero, recientemente, se ha demostrado que este tejido es el principal responsable de conferir dormición a la semilla (Bethke *et al.* 2007). Sus células son capaces de responder a ABA y a GA convirtiéndose en un tejido que acumula proteínas y lípidos de reserva o segregando enzimas hidrolíticas que promueven la movilización de estos, respectivamente. El balance ABA/GA controla, por lo tanto, a través del endospermo, la transición de semilla durmiente a semilla no-durmiente o, por decirlo de otra manera, la transición entre dormición y germinación. Este balance se inclina hacia la acción inhibitoria del ABA en el momento de la maduración de la semilla, cuando se imprime dormición a la semilla, pero dos semanas después desde la recogida las semillas de *Arabidopsis thaliana* empieza a perder la dormición debido a la decantación del balance ABA/GA hacia la acción activadora del GA (Fig. 77). Además, otros estímulos como el frío o la luz pueden romper el estado de dormición avanzando la síntesis de GA en la semilla y, por lo tanto, su germinación. Por otro lado, condiciones desfavorables como la sequía o la alta salinidad pueden retrasar la germinación de la semilla en un proceso denominado segunda dormición.

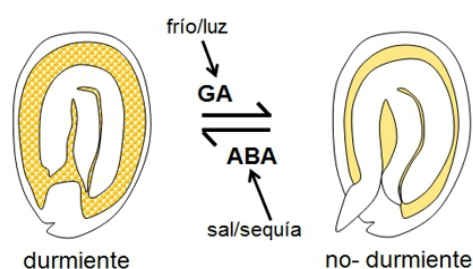


Fig. 77 Balance entre dormición y germinación determinado por la vacuolización del endospermo y regulado por ABA y GA

Nuestros ensayos de respuesta a hormona sobre las raíces de plantas con el gen reportero GUS han demostrado que *GEM* es un gen de respuesta a ABA y no a GA, lo que nos lleva a pensar que ocurra lo mismo en el endospermo de la semilla donde los niveles de ABA endógenos registran un pico (Kanno et al. 2010) que coincide con la expresión de *GEM*. En conjunto, la localización de la expresión de *GEM* en el endospermo y su inducción por ABA demostrada en las raíces podría estar indicando, por un lado, que *GEM* se induce por ABA también en el endospermo y, por otro, que *GEM* forme parte de la vía de señalización mediada por ABA durante la embriogénesis y la maduración de la semilla.

Al examinar los niveles de dormición en las semillas de las plantas mutantes y sobreexpresoras comprobamos que *GEM* tiene un efecto sobre la dormición de las semillas. Así, las semillas mutantes que generan las plantas *gem-1* son semillas con una dormición mayor que las silvestres; a 9 d.a.s registramos un 65% de germinación frente al 80% de las semillas silvestres, mientras que las semillas recolectadas de plantas *GEMoe* presentan una baja dormición, con un 94% de germinación en las mismas condiciones. Según esto la expresión de *GEM* en el endospermo es necesaria para una salida de la dormición correcta y, por lo tanto, *GEM* participa como regulador negativo de la señalización por ABA en los procesos que confieren dormición a la semilla.

El tratamiento de estratificación que consiste en un período de frío y oscuridad provoca la ruptura de la dormición a través de una activación de la síntesis de GA en la semilla. La liberación de reservas de las vacuolas conduce a una activación del crecimiento del embrión, hasta ahora quiescente, cuya radícula perfora la testa empezando su período autótrofo. Este tratamiento consigue recuperar los niveles de germinación de las semillas *gem-1*, que alcanzan los niveles normales (cerca del 95% a 3 d.a.s), lo cual señala a la dormición como causa del retraso de su germinación. No obstante, las semillas *GEMoe* continúan alcanzando mejores niveles de germinación que las semillas silvestres (casi 100%), lo que apunta a que *GEM* está implicada no sólo en los procesos de dormición sino también en procesos de germinación como un regulador positivo.

La acción del balance ABA/GA sobre la germinación de las semillas está determinado, en un primer nivel, por la abundancia de ambas hormonas y, en un segundo nivel, por la sensibilidad del sistema de señalización a ambas hormonas en lo que están implicadas las proteínas receptoras y de la cadena de transducción, y los genes de respuesta necesarios para mantener o degradar las vacuolas del endospermo. Para discriminar entre un nivel y otro de regulación usamos un ensayo de germinación en medio suplementado con ABA, una vez eliminada la dormición mediante estratificación. De esta manera, el posible desnivel en la producción de ABA de las diferentes semillas es compensado exógenamente, lo que nos permite observar diferencias

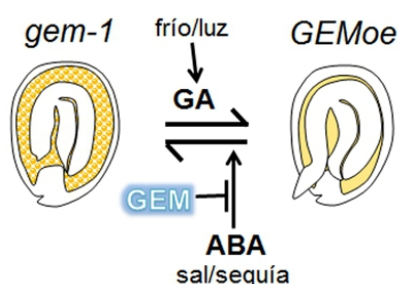
de sensibilidad al ABA. En este ensayo observamos que las semillas mutantes *gem-1* presentan una mayor sensibilidad a bajas concentraciones de ABA (0,1 μ M), mostrando niveles de germinación menores que las semillas silvestres, 57% frente al 73%. A esta misma concentración de ABA, las semillas *GEMoe* siguen manteniendo unos porcentajes altos de germinación, cerca del 95%, similares a los que presentan los mutantes insensibles *abi1-2* usados como control. En conclusión, podemos decir que GEM actúa positivamente sobre la germinación inhibiendo la sensibilidad al ABA, lo que también explica el fenotipo en dormición.

Pero ABA y GA tienen funciones antagónicas en la germinación de las semillas, por lo que, por ejemplo, el fenotipo de baja sensibilidad a ABA de las semillas *GEMoe* podría interpretarse también como un fenotipo de alta sensibilidad a GA, o bien estar escondiendo unos altos niveles de GA en estas semillas. Mediante un ensayo de germinación en paclobutrazol (PAC), inhibidor de la biosíntesis de GA, descartamos esta posibilidad. Observamos que a una concentración baja de PAC (0,1 μ M) se reproducen los niveles de germinación vistos a una baja concentración de ABA, que continúan siendo menores en las semillas *gem-1*, 64% frente a un 82% en semillas silvestres, y mayores en las semillas *GEMoe*, con un 95%.

Así como el ABA inhibe la germinación de las semillas, las condiciones adversas o de estrés generan también un retraso en la germinación. Ambas vías, dependiente e independiente de ABA, tienen en común un estado de deshidratación celular, cuyas vías de señalización convergen en un buen número de casos. Mediante un ensayo de germinación en condiciones de estrés por salinidad observamos que la germinación de las semillas mutantes y sobreexpresoras de GEM responden de manera homóloga al tratamiento de ABA. A concentraciones de 50 mM de NaCl, relativamente bajas para la germinación, las semillas mutantes *gem-1* presentan unos niveles de germinación del 71% frente al 76% de las semillas silvestres. Contrariamente, las semillas *GEMoe* se siguen caracterizando por tener niveles elevados de germinación, en este caso del 90%. Por ello podemos concluir que GEM actúa sobre la germinación de la semilla regulando negativamente su sensibilidad a ABA y estrés (salinidad).

De este bloque de experimentos se concluye que la proteína GEM, expresada en el endospermo de la semilla, tiene una función importante en la germinación sobre la que actúa positivamente inhibiendo la sensibilidad de la semilla al ABA (Fig. 78)

Fig. 78 Papel de GEM en la el balance entre dormición y germinación regulando negativamente la sensibilidad al ABA



ABI3 y ABI5 juegan un papel esencial en la activación de los programas de embriogénesis y de maduración de la semilla, período en el cual se acumulan estas proteínas. Recientemente, se ha demostrado que ambos factores de transcripción activan la expresión de un grupo de genes que codifican para proteínas de reserva, oleosinas y LEAs, proteínas de señalización y factores de transcripción implicados en el desarrollo de la semilla (Monke *et al.* 2012, Reeves *et al.* 2011). La expresión de *GEM* está directamente relacionada con la regulación de ABI3 y ABI5 como hemos demostrado en los mutantes *abi3-1* y *abi5-1*, y con el estadio de embriogénesis y maduración en el que participan, de lo que concluimos que la expresión de *GEM* en la semilla pueda estar determinada por los niveles de estas dos proteínas. Además, la acumulación de ABI3 y ABI5 desciende después de un período de estratificación pero, durante una ventana de 60 horas posteriores al tratamiento de estratificación, sigue respondiendo al ABA reactivándose *de novo* los programas de quiescencia de la semilla (Lopez-Molina *et al.* 2001). Este período coincide con el período de 3 días en el que observamos las diferencias en el fenotipo de germinación de las semillas *gem-1* y *GEMoe*, por lo que *GEM* debe estar regulando negativamente alguno de los procesos activados por ABI3 y ABI5 durante la germinación y dormición de las semillas.

e) *GEM* tiene una expresión diurna y circadiana

En *Arabidopsis*, la expresión de un 25% de los genes está controlada a nivel circadiano lo que nos da una idea de la importancia de las transiciones de luz y temperatura debidas a la rotación de la Tierra sobre el comportamiento de los genes, especialmente, en organismos sésiles como las plantas.

Hemos analizado la expresión de *GEM* en un contexto circadiano basándonos en la existencia de dos copias de la secuencia *CBS*, en su promotor. Esta secuencia ha sido relacionada con la unión y regulación por CCA1, un factor de transcripción de tipo MYB perteneciente al reloj circadiano, siendo la frecuencia de aparición de esta secuencia del 10% en genes que se expresan de manera circadiana (Michael and McClung 2002).

Mediante extracción de RNA y qRT-PCR hemos analizado las variaciones diurnas del transcrito de *GEM* en intervalos de 4 horas. En condiciones de luz y oscuridad (día largo; 16L/8D), hemos comprobado que *GEM* presenta un pico mínimo de expresión al inicio del día (0 CT) seguido de un pico máximo 4 horas después del inicio de la luz (4 CT). Esta diferencia de expresión no es muy elevada (0,4 ciclos de PCR \pm 0,2) pero es significativa y se repite con cada ciclo de luz por lo que podemos decir que *GEM* tiene un patrón diurno. De la misma manera, hemos analizado las variaciones de mRNA de *GEM* en condición de luz continua (LL), encontrando también una ritmicidad en su abundancia, esta vez independiente de luz lo que significa que *GEM* tiene un patrón circadiano dependiente de reloj. No obstante, no hemos encontrado el elemento

de reloj del que depende la expresión de *GEM* en el estudio de los principales reguladores del reloj circadiano por lo que pensamos que las variaciones observadas puedan deberse a las variaciones diarias de los niveles de ABA (Cornforth *et al.* 1966). Pero, la falta de los factores de transcripción de tipo MYC, CCA1 y LHY en el doble mutante *cca1lhy* causa un aumento en la expresión de *GEM* estos mutantes, lo que puede ser debido al bucle regulatorio del reloj y el ABA.

Tal vez, reloj circadiano con un 25% (Hazen *et al.* 2009) y ABA con un 20% (Matsui, *et al.* 2008), sean las mayores redes de regulación transcripcional a las que estén sujetos los genes cuya expresión depende de estímulo ambiental en plantas. Curiosamente, ambas redes regulatorias comparten una buena parte de sus dianas. Así, un 68% de los genes regulados por el reloj circadiano son genes que responden a ABA o estrés (Kreps *et al.* 2002) y un 80% de los genes que se regulan por ABA están regulados circadianamente (Covington *et al.* 2008). Además, existe una compartimentación temporal (“gating”) por la cual la mayoría de los genes que se inducen por ABA (40%) se expresan en las primeras horas de la mañana subjetiva (0-3 CT) y la mayoría de los genes que se inhiben por ABA lo hacen en las primeras horas de la noche subjetiva (15 CT). Esto puede ser un indicio de qué elementos regulatorios están conviviendo en los promotores de estos genes pensando en que la unión de ambas redes podría tener una explicación en complejos regulatorios que unieran factores de una y otra red.

Acerca de la expresión de *GEM* hemos concluido en nuestros resultados que se trata de un gen sujeto a una regulación circadiana y, al mismo tiempo, regulado por ABA. Por otra parte, la búsqueda *in silico* de secuencias en *cis* en los promotores de los genes *GER* ha resultado en la co-localización de secuencias relacionadas con la unión de factores de transcripción de ABA y de reloj en una misma región promotora. Esto nos lleva a especular que exista una relación entre ambos tipos de regulación sobre estos genes donde la unión de TOC1 a ABI3 *in vitro* (Kurup *et al.* 2000) podría ser un principio para intentar explicar la interacción de ambas redes regulatorias (Fig. 79).

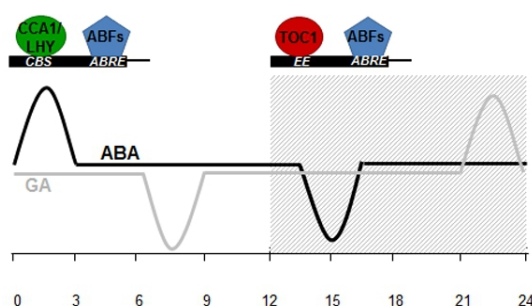


Fig. 79 Hipótesis de regulación ABA-RELOJ sobre las dianas comunes

f) GEM integra la señalización de ABA y el reloj circadiano en ABAR/ GEM es un regulador negativo de la señalización mediada por ABA a ABAR

En cuanto a la influencia del estímulo lumínico sobre la expresión génica, basándonos en estudios comparativos con datos de expresión circadiana hemos visto que, de manera notable, un alto porcentaje de los genes desregulados en estas plantas *gem-1* y *GEMoe* se expresan de manera circadiana entre los que se encuentran, *PRR9*, *COL2* y *RVE1* por lo que, inicialmente, orientamos los experimentos hacia una hipótesis que implicaba a GEM en la regulación del reloj circadiano. Mediante estudios comparativos con otros análisis transcripcionales hemos relacionado la desregulación de estas plantas con la desregulación de *TOC1*, uno de los componentes del reloj circadiano, ya que las plantas *gem-1* presentan un 9% de enriquecimiento en genes desregulados por la sobreexpresión de *TOC1* (*TOC1ox*) y las plantas *GEMoe* un 6% de enriquecimiento en genes desregulados por la mutación de *TOC1* (*toc1-2*) mientras que el porcentaje esperado por azar es del 2% (Legnaioli *et al.* 2009).

Los análisis transcripcionales de expresión de los principales genes de reloj (*CCA1*, *LHY* y *TOC1*) han permitido descartar la idea de que GEM regule directamente a los componentes del reloj. No obstante, los análisis de inducción con ABA han revelado la regulación que ejerce GEM sobre una diana común de la señalización de ABA y reloj, el gen *ABAR/CHLH/GUN5*. Este gen codifica para una subunidad del complejo multimérico Mg-chelatasa que se encuentra en los cloroplastos y que participa en la señalización por ABA y respuesta a sequía (Shen *et al.* 2006). Su expresión tiene un comportamiento circadiano regulado directamente por el reloj a través del su inhibidor *TOC1* (Legnaioli, *et al.* 2009). A su vez, la expresión de *TOC1* es dependiente de ABA lo que establece un bucle regulatorio entre reloj circadiano y la señalización por ABA. Al estudiar la inducción de *ABAR* por ABA comprobamos que es un gen que responde sutilmente a la hormona. No obstante, en las plantas *gem-1* su niveles de inducción aumenta mientras que en las plantas *GEMoe* la expresión se anula tras el tratamiento con ABA. Esto indica que GEM es un regulador negativo directo de la señalización de ABA a *ABAR* (Fig. 80).

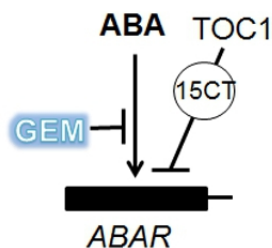


Fig. 80 Regulación de GEM sobre la expresión de ABAR mediada por ABA

Además de *ABAR*, recientemente, han sido publicadas otras dianas de la represión de *TOC1*, entre los que se encuentran otros componentes del sistema de señalización mediada por

ABA como *ABI1*, *PYL5* o *SnRK2-7*, (Huang *et al.* 2012) lo que confirma la existencia de una regulación de la señalización por ABA por parte del reloj.

g) Unión de GEM a segundos mensajeros lipídicos y localización subcelular

El dominio GRAM ha sido implicado en animales con funciones de señalización celular a través de uniones a membrana y a proteína (Doerks *et al.* 2000). En este sentido, las predicciones de localización de las proteínas GER sugieren que estas proteínas podrían asociarse con la membrana a través de una secuencia de 15 aminoácidos que se encuentra dentro de la secuencia del dominio GRAM. Esta secuencia es específica del grupo (CYLSTTAGPVAGVLY), lo que podría indicar una especificidad por algún tipo de membrana. Mediante ensayos de localización subcelular hemos confirmado la localización de GEM en la membrana celular, concretamente, formando parte de la proteína periférica cuya unión a la membrana se basa en interacciones electrostáticas.

En relación a los procesos de membrana, varias proteínas con dominio GRAM o con su homólogo estructural, el dominio PH, han sido descritas en cuanto a su unión a fosfolípidos (Baraldi *et al.* 1999). Esta unión ha sido relacionada funcionalmente con procesos de biosíntesis de estos segundos mensajeros o con procesos de señalización en los que esta unión modifica la actividad o la localización de la proteína marcada (Choudhury *et al.* 2006). Existen numerosos ejemplos en proteínas animales con dominio GRAM (Laporte *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2000) y en plantas, aunque ninguna de ellas ha sido descrita en unión a fosfolípidos, MTM1 y MTM2 han sido relacionadas con su biosíntesis (Ding *et al.* 2012). Mediante la expresión de la proteína recombinante en bacteria y su análisis en ensayos de unión hemos demostrado en este trabajo que existe una unión específica de la proteína GEM a los fosfolípidos monofosfato PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P y, en menor grado, a PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₂ y ácido fosfatídico. No obstante, para que tal unión ocurra es necesaria la presencia de alguna otra proteína o regulador presente en el extracto de proteínas de la planta. Esta observación ya había sido hecha anteriormente en el caso de la unión de las miotubularinas animales para el mismo tipo de ensayos, lo que refuerza nuestros resultados (Choudhury, *et al.* 2006). Mediante ensayos de co-purificación de la proteína transgénica HA-GEM hemos identificado por espectrometría de masas una proteína relacionada con la biosíntesis de fosfoinosítoles en unión a GEM. Esta proteína es PIP5K9, una kinasa de PI(4)P cuyo producto es PIP(4,5)P₂ (Lou *et al.* 2007). Ambos fosfoinosítoles son reconocidos específicamente por la proteína por lo que concluimos que GEM podría cumplir alguna función vinculada al metabolismo lipídico o a la señalización mediada por segundos mensajeros.

En cuanto a la relación de GEM con la membrana, los resultados de ensayos de doble híbrido en levadura, aunque no reproducen los resultados de la co-inmunoprecipitación, indican dos uniones con proteínas relacionadas con la membrana: una putativa Rab-GTPasa relacionada con funciones de tráfico de membrana, y una proteína de dominio FYVE transmembrana también relacionado con la unión específica a fosfoinositol PI(3)P (Gauillier *et al.* 1998). Mediante fraccionamiento subcelular en gradiente continuo de sacarosa hemos visto que GEM también se encuentra en el núcleo de la célula. Esta localización podría estar relacionada con la región NES (Nuclear Export Signals) que los programas de predicción sitúan el extremo N-terminal de la proteína. Este resultado es similar al recientemente publicado sobre una proteína ortóloga de GER5 (ABR1), miembro del grupo que hemos definido por homología en las proteínas GER, y que localizan en el núcleo de la célula en una función relacionada con señalización de procesos de defensa y muerte celular (Choi du and Hwang 2011). Según estos datos GEM podría estar actuando como un elemento de comunicación entre la membrana y el núcleo dentro de una vía de señalización mediada por segundo mensajero (Fig. 81)

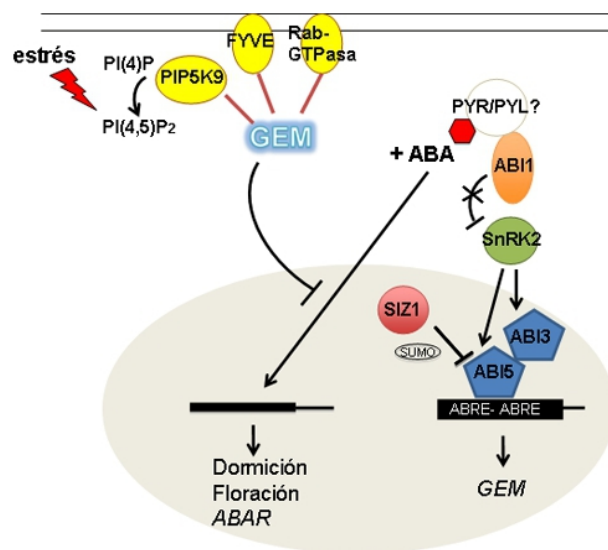


Fig. 81 Esquema de la participación de GEM en la señalización mediada por ABA y su unión con segundos mensajeros.

Conclusiones

1. El árbol filogenético de las proteínas del dominio GRAM en plantas está formado por sólo tres ramas evolutivas principales ya existentes en *Bacteria*. En *Arabidopsis thaliana*, existe un grupo de proteínas con un motivo de secuencia específica: CYLSTTAGPVAGVLY al que denominamos subfamilia GER y que incluye a la proteína GEM.
2. Desde el inicio del estadio vegetativo, *GEM* se expresa principalmente en la raíz de la plántula en la capa de la epidermis y al nivel de la zona de elongación. En el estadio reproductivo, *GEM* se expresa durante la gametogénesis masculina en las microesporas en desarrollo, en el *tapetum* de los sacos polínicos y durante la dehiscencia de los granos de polen. Además, y de manera análoga a *ABA45* en cebada, *GEM* se expresa en el endospermo durante la embriogénesis y la maduración de la semilla.
3. La expresión de *GEM* es inducida por la hormona ABA en una respuesta dependiente de los motivos *ABRE* de su promotor y de los reguladores de la señalización: fosfatasa ABI1, kinasas SnRK2 2.2/ 2.3/ 2.6 y, factores de transcripción ABI3 y ABI5, el cual reconoce específicamente los motivos *ABRE-ABRE*. Igualmente, otros miembros de la subfamilia *GER*, como *GER5*, son también genes de respuesta a ABA aunque sólo *GER4* posee motivos *ABRE* en su promotor.
4. *GEM* actúa en la semilla como un regulador negativo de la señalización por ABA promoviendo la germinación, incluso en condiciones de alta salinidad. En la planta, promueve el crecimiento radicular que el ABA inhibe y mejora la tolerancia a sequía.
5. A nivel del transcriptoma de la planta, *GEM* modifica la expresión de unos 60 genes en condiciones normales, muchos de los cuales son genes de respuesta a ABA. Esta alteración también se observa en tratamiento con ABA donde algunos genes de respuesta están desregulados en las plantas *gem-1* y *GEMoe*. Además, *GEM* regula negativamente la inducción mediada por ABA de *ABAR*, un gen que participa en la señalización de ABA y que además tiene una regulación dependiente de reloj circadiano.
6. *GEM* se expresa en una manera circadiana lo cual puede estar relacionado con las variaciones en la concentración de ABA que se producen diariamente en la planta puesto que *GEM* no depende directamente de los componentes del oscilador.

7. En la floración, de una manera dependiente de fotoperiodo, GEM ejerce un papel negativo en la regulación transcripcional del efector *CONSTANS* que se traduce en un retraso en la transición a floración de las plantas *GEMoe* en condiciones de fotoperiodo 12L/12D.
8. GEM se encuentra en la membrana formando parte de la proteína periférica y se une preferentemente a PI(3)P, PI(4)P y PI(5)P, fosfolípidos que actúan como segundos mensajeros en la señalización mediada por ABA, así como a P(4,5)P₂, el producto de la kinasa de fosfolípidos PIP5K9 que hemos identificado por su interacción con GEM.
9. GEM se encuentra, además, en el núcleo lo que puede significar que esta proteína participe en la señalización del ABA al núcleo regulando la respuesta al ABA de manera dependiente de la acumulación de segundos mensajeros como P(4,5)P₂ acumulados en condiciones de estrés celular.

Bibliografía

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. and Harberd, N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, **311**, 91-94.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P. and Kay, S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, **293**, 880-883.
- Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Mas, P., Harmer, S.L. and Kay, S.A. (2002) Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in Arabidopsis. *Curr Biol*, **12**, 757-761.
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C. and Truong, H.N. (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, **28**, 500-512.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and Leon, P. (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev*, **14**, 2085-2096.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. and Chan, R.L. (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci*, **12**, 419-426.
- Ascenzi, R. and Gantt, J.S. (1997) A drought-stress-inducible histone gene in Arabidopsis thaliana is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol Biol*, **34**, 629-641.
- Aubert, Y., Leba, L.J., Cheval, C., Ranty, B., Vavasseur, A., Aldon, D. and Galaud, J.P. (2011) Involvement of RD20, a member of caleosin family, in ABA-mediated regulation of germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav*, **6**, 538-540.
- Aubert, Y., Vile, D., Pervent, M., Aldon, D., Ranty, B., Simonneau, T., Vavasseur, A. and Galaud, J.P. (2010) RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **51**, 1975-1987.
- Banno, H. and Chua, N.H. (2000) Characterization of the arabidopsis formin-like protein AFH1 and its interacting protein. *Plant Cell Physiol*, **41**, 617-626.
- Baumbusch, L.O., Hughes, D.W., Galau, G.A. and Jakobsen, K.S. (2004) LEC1, FUS3, ABI3 and Em expression reveals no correlation with dormancy in Arabidopsis. *J Exp Bot*, **55**, 77-87.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J. (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*, **12**, 1103-1115.
- Begley, M.J., Taylor, G.S., Brock, M.A., Ghosh, P., Woods, V.L. and Dixon, J.E. (2006) Molecular basis for substrate recognition by MTMR2, a myotubularin family phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 927-932.
- Begley, M.J., Taylor, G.S., Kim, S.A., Veine, D.M., Dixon, J.E. and Stuckey, J.A. (2003) Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, MTMR2: insights into myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Mol Cell*, **12**, 1391-1402.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.Y., Still, D.W. and Jones, R.L. (2007) The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol*, **143**, 1173-1188.
- Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F.L., LeGuern, E., Salih, M.A., Georgiou, D.M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A., Gambardella, A., Bono, F., Quattrone, A., Devoto, M. and Monaco, A.P. (2000) Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet*, **25**, 17-19.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Rodriguez, V.M., Armand, F. and Farmer, E.E. (2007) The fou2 gain-of-function allele and the wild-type allele of Two Pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **48**, 1775-1789.

- Bordier, C.** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*, **256**, 1604-1607.
- Bouyer, D., Roudier, F., Heese, M., Andersen, E.D., Gey, D., Nowack, M.K., Goodrich, J., Renou, J.P., Grini, P.E., Colot, V. and Schnittger, A.** (2011) Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet*, **7**, e1002014.
- Brocard-Gifford, I., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B. and Finkelstein, R.R.** (2004) The Arabidopsis thaliana ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell*, **16**, 406-421.
- Cadman, C.S., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W. and Finch-Savage, W.E.** (2006) Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J*, **46**, 805-822.
- Caro, E., Castellano, M.M. and Gutierrez, C.** (2007) A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in Arabidopsis. *Nature*, **447**, 213-217.
- Castellano Mdel, M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A. and Gutierrez, C.** (2004) DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell*, **16**, 2380-2393.
- Catala, R., Ouyang, J., Abreu, I.A., Hu, Y., Seo, H., Zhang, X. and Chua, N.H.** (2007) The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell*, **19**, 2952-2966.
- Chan, Z.** (2012) Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics*, **100**, 110-115.
- Chen, H. and Xiong, L.** (2010) The bifunctional abiotic stress signalling regulator and endogenous RNA silencing suppressor FIERY1 is required for lateral root formation. *Plant Cell Environ*, **33**, 2180-2190.
- Cherel, I., Michard, E., Platet, N., Mouline, K., Alcon, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.B.** (2002) Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell*, **14**, 1133-1146.
- Chiang, G.C., Barua, D., Kramer, E.M., Amasino, R.M. and Donohue, K.** (2009) Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 11661-11666.
- Chinnusamy, V., Gong, Z. and Zhu, J.K.** (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol*, **50**, 1187-1195.
- Choi du, S. and Hwang, B.K.** (2011) Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling. *Plant Cell*, **23**, 823-842.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S.Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, **275**, 1723-1730.
- Choudhury, P., Srivastava, S., Li, Z., Ko, K., Albaqumi, M., Narayan, K., Coetzee, W.A., Lemmon, M.A. and Skolnik, E.Y.** (2006) Specificity of the myotubularin family of phosphatidylinositol-3-phosphatase is determined by the PH/GRAM domain. *J Biol Chem*, **281**, 31762-31769.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M.** (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 427-451.
- Cornforth, J.W., Milborrow, B.V., Ryback, G., Rothwell, K. and Wain, R.L.** (1966) Identification of the yellow lupin growth inhibitor as (+)-abscisic II ((+)-dormin). *Nature*, **211**, 742-743.
- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A. and Harmer, S.L.** (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol*, **9**, R130.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffitts, J.S. and Somerville, C.R.** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3718-3723.

- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R.** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 651-679.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C.** (2002) Arabidopsis E2F_c functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell*, **14**, 3057-3071.
- Ding, Y., Ndamukong, I., Zhao, Y., Xia, Y., Riethoven, J.J., Jones, D.R., Divecha, N. and Avramova, Z.** (2012) Divergent functions of the myotubularin (MTM) homologs AtMTM1 and AtMTM2 in Arabidopsis thaliana: evolution of the plant MTM family. *Plant J*, **70**, 866-878.
- Dodd, A.N., Gardner, M.J., Hotta, C.T., Hubbard, K.E., Dalchau, N., Love, J., Assie, J.M., Robertson, F.C., Jakobsen, M.K., Goncalves, J., Sanders, D. and Webb, A.A.** (2007) The Arabidopsis circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science*, **318**, 1789-1792.
- Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M. and Bork, P.** (2000) GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci*, **25**, 483-485.
- Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J.L., Jones, A., MacLean, D., Nagel, A., Kersten, B. and Schulze, W.X.** (2010) PhosPhAt: the Arabidopsis thaliana phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res*, **38**, D828-834.
- Durrant, W.E. and Dong, X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 185-209.
- Edgar, R.C.** (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **5**, 113.
- Estavillo, G.M., Crisp, P.A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. and Pogson, B.J.** (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 3992-4012.
- Finkelstein, R.R.** (1994) Maternal Effects Govern Variable Dominance of Two Abscisic Acid Response Mutations in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, **105**, 1203-1208.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. and Rock, C.D.** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S15-45.
- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J.** (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, **12**, 599-609.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S. and Goodman, H.M.** (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, **10**, 1043-1054.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H.M. and Marion-Poll, A.** (2012) Epoxy-carotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant J*, **70**, 501-512.
- Fujii, H., Verslues, P.E. and Zhu, J.K.** (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 485-494.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res*, **124**, 509-525.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1988-1993.
- Garcia, D., Fitz Gerald, J.N. and Berger, F.** (2005) Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 52-60.

- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. and Aasland, R.** (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, **394**, 432-433.
- Gazzarrini, S. and McCourt, P.** (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 387-391.
- Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold, R. and Corbineau, F.** (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J Exp Bot*, **59**, 203-212.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H.M.** (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell*, **4**, 1251-1261.
- Gomez-Porras, J.L., Riano-Pachon, D.M., Dreyer, I., Mayer, J.E. and 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.
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernandez, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H. and Rodriguez, P.L.** (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell*, **24**, 2483-2496.
- Gy, I., Gascioli, V., Laressergues, D., Morel, J.B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. and Mallory, A.C.** (2007) Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell*, **19**, 3451-3461.
- Hartung, W., Sauter, A. and Hose, E.** (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot*, **53**, 27-32.
- Hattori, T., Totsuka, M., Hobo, T., Kagaya, Y. and Yamamoto-Toyoda, A.** (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. *Plant Cell Physiol*, **43**, 136-140.
- Hazen, S.P., Naef, F., Quisel, T., Gendron, J.M., Chen, H., Ecker, J.R., Borevitz, J.O. and Kay, S.A.** (2009) Exploring the transcriptional landscape of plant circadian rhythms using genome tiling arrays. *Genome Biol*, **10**, R17.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B. and Grill, E.** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J*, **21**, 3029-3038.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V. and Chua, N.H.** (2002) Genome-wide gene expression profiling in Arabidopsis thaliana reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci*, **115**, 4891-4900.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. and Xiong, L.** (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12987-12992.
- Huang, W., Perez-Garcia, P., Pokhilko, A., Millar, A.J., Antoshechkin, I., Riechmann, J.L. and Mas, P.** (2012) Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, **336**, 75-79.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Schroeder, J.I.** (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell*, **106**, 477-487.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekens, S.** (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J*, **23**, 577-585.
- Hulskamp, M., Schnittger, A. and Folkers, U.** (1999) Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *Int Rev Cytol*, **186**, 147-178.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J.K.** (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, **9**, 1935-1949.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V. and Aravind, L.** (2001) Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins*, **43**, 134-144.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C. and Skriver, K.** (2010) The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem J*, **426**, 183-196.
- Jiang, S.Y., Ramamoorthy, R. and Ramachandran, S.** (2008) Comparative transcriptional profiling and evolutionary analysis of the GRAM domain family in eukaryotes. *Dev Biol*, **314**, 418-432.
- Jones, D.T.** (2007) Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, **23**, 538-544.
- Kader, J.C.** (1990) Intracellular transfer of phospholipids, galactolipids, and fatty acids in plant cells. *Subcell Biochem*, **16**, 69-111.
- Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S.R., Kamiya, Y. and Seo, M.** (2010) Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol*, **51**, 1988-2001.
- Kato, H., Motomura, T., Komeda, Y., Saito, T. and Kato, A.** (2010) Overexpression of the NAC transcription factor family gene ANAC036 results in a dwarf phenotype in Arabidopsis thaliana. *J Plant Physiol*, **167**, 571-577.
- Kim, J.M., To, T.K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., Toyoda, T., Kimura, H., Shinozaki, K. and Seki, M.** (2008) Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1580-1588.
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A. and Hattori, T.** (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J*, **44**, 939-949.
- Konig, S., Mosblech, A. and Heilmann, I.** (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in Arabidopsis thaliana. *FASEB J*, **21**, 1958-1967.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J. and Soppe, W.** (1998) Genetic Control of Flowering Time in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 345-370.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-Van der Swan, D.L.C. and Karssen, C.M.** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin-sensitive lines of Arabidopsis thaliana. *Theoret. Appl. Genet.*, **61**, 385-393.
- Koornneef, M., Reuling, G. and Karssen, C.M.** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.*, **61**, 377-383.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J.F.** (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol*, **130**, 2129-2141.
- Kurup, S., Jones, H.D. and Holdsworth, M.J.** (2000) Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *Plant J*, **21**, 143-155.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Nambara, E.** (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J*, **23**, 1647-1656.
- la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S.** (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, **17**, 527-536.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. and Gibson, S.I.** (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants sis4 and sis5 are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J*, **23**, 587-596.

- Laporte, J., Blondeau, F., Buj-Bello, A., Tentler, D., Kretz, C., Dahl, N. and Mandel, J.L. (1998) Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatase gene family from yeast to human. *Hum Mol Genet*, **7**, 1703-1712.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Lee, S.C. and Luan, S. (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, **35**, 53-60.
- Lee, Y., Kim, Y.W., Jeon, B.W., Park, K.Y., Suh, S.J., Seo, J., Kwak, J.M., Martinoia, E. and Hwang, I. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J*, **52**, 803-816.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E. and Marion-Poll, A. (2006) Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J*, **45**, 309-319.
- Legnaioli, T., Cuevas, J. and Mas, P. (2009) TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J*, **28**, 3745-3757.
- Leivar, P., Gonzalez, V.M., Castel, S., Trelease, R.N., Lopez-Iglesias, C., Arro, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A. and Fernandez-Busquets, X. (2005) Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol*, **137**, 57-69.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A. and Koornneef, M. (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant J*, **10**, 655-661.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chefdor, F. and Giraudat, J. (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, **264**, 1448-1452.
- Leung, J. and Giraudat, J. (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 199-222.
- Leung, J., Merlot, S. and Giraudat, J. (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, **9**, 759-771.
- Liu, J., Luo, M., Cheng, K., Mohapatra, S. and Hill, R. (1999) Identification and characterization of a novel barley gene that is ABA-inducible and expressed specifically in embryo and aleurone. *J. Exp Bot*, **50**, 727-728.
- Liu, Y., Koornneef, M. and Soppe, W.J. (2007) The absence of histone H2B monoubiquitination in the Arabidopsis hub1 (rdo4) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *Plant Cell*, **19**, 433-444.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martinez-Zapater, J.M. and Salinas, J. (2000) A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, frs1, is a new aba3 allele. *Planta*, **211**, 648-655.
- Lopez-Molina, L. and Chua, N.H. (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **41**, 541-547.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. and Chua, N.H. (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4782-4787.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T. and Chua, N.H. (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J*, **32**, 317-328.
- Lorenzo, O., Urbe, S. and Clague, M.J. (2006) Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosome related functions. *J Cell Sci*, **119**, 2953-2959.
- Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balague, C. and Roby, D. (2004) Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a

- regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, **16**, 2217-2232.
- Lou, Y., Gou, J.Y. and Xue, H.W.** (2007) PIP5K9, an Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell*, **19**, 163-181.
- Luan, S.** (2002) Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11567-11569.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. and Grill, E.** (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, **324**, 1064-1068.
- Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2002) The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol*, **43**, 58-69.
- Manzanero, S., Rutten, T., Kotseruba, V. and Houben, A.** (2002) Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. *Chromosome Res*, **10**, 467-476.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumar, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.P., Kamiya, Y., Nambara, E. and Truong, H.N.** (2009) The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol*, **149**, 949-960.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J.M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K. and Seki, M.** (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1135-1149.
- Meijer, H.J. and Munnik, T.** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 265-306.
- Meyer, K., Leube, M.P. and Grill, E.** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science*, **264**, 1452-1455.
- Michael, T.P. and McClung, C.R.** (2002) Phase-specific circadian clock regulatory elements in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **130**, 627-638.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B. and Gubler, F.** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J*, **45**, 942-954.
- Millar, A.J., Short, S.R., Chua, N.H. and Kay, S.A.** (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell*, **4**, 1075-1087.
- Miura, K. and Hasegawa, P.M.** (2009) Sumoylation and abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav*, **4**, 1176-1178.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Tanokura, M.** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature*, **462**, 609-614.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A. and Coupland, G.** (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. *Dev Cell*, **2**, 629-641.
- Monke, G., Seifert, M., Keilwagen, J., Mohr, M., Grosse, I., Hahnel, U., Junker, A., Weisshaar, B., Conrad, U., Baumlein, H. and Altschmied, L.** (2012) Toward the identification and regulation of the Arabidopsis thaliana ABI3 regulon. *Nucleic Acids Res*, **40**, 8240-8254.
- Mueller-Roeber, B. and Pical, C.** (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol*, **130**, 22-46.

- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. and Giraudat, J.** (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, **14**, 3089-3099.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **46**, 686-698.
- Nakamura, S., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R.** (2001) Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J*, **26**, 627-635.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009) Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1345-1363.
- Nambara, E., Hayama, R., Tsuchiya, Y., Nishimura, M., Kawaide, H., Kamiya, Y. and Naito, S.** (2000) The role of ABI3 and FUS3 loci in Arabidopsis thaliana on phase transition from late embryo development to germination. *Dev Biol*, **220**, 412-423.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I. and Getzoff, E.D.** (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, **326**, 1373-1379.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T.** (2005) Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *Plant J*, **44**, 972-984.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R. and Bjorkman, O.** (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell*, **10**, 1121-1134.
- Novakova, M., Motyka, V., Dobrev, P.I., Malbeck, J., Gaudinova, A. and Vankova, R.** (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *J Exp Bot*, **56**, 2877-2883.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T. and Smith, O.E.** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science*, **142**, 1592-1593.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. and Nambara, E.** (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **141**, 97-107.
- Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seki, M. and Nambara, E.** (2009) High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **149**, 825-834.
- Olsen, O.A.** (2004) Nuclear endosperm development in cereals and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **16 Suppl**, S214-227.
- Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. and Lambright, D.G.** (2006) TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*, **442**, 303-306.
- Parcy, F., Valon, C., Kohara, A., Misera, S. and Giraudat, J.** (1997) The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant Cell*, **9**, 1265-1277.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M. and Giraudat, J.** (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*, **6**, 1567-1582.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F. and**

- Cutler, S.R.** (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, **324**, 1068-1071.
- Pawson, T.** (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.
- Penfield, S., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Larson, T.R. and Graham, I.A.** (2004) Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell*, **16**, 2705-2718.
- Pettko-Szandtner, A., Meszaros, T., Horvath, G.V., Bako, L., Csordas-Toth, E., Blastyak, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P. and Dudits, D.** (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J*, **46**, 111-123.
- Qin, X. and Zeevaart, J.A.** (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15354-15361.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. and Grill, E.** (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci*, **15**, 395-401.
- Rawat, R., Schwartz, J., Jones, M.A., Sairanen, I., Cheng, Y., Andersson, C.R., Zhao, Y., Ljung, K. and Harmer, S.L.** (2009) REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16883-16888.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R. and Hill, R.D.** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, **439**, 290-294.
- Reddy, V.S. and Reddy, A.S.** (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry*, **65**, 1745-1776.
- Reeves, W.M., Lynch, T.J., Mobin, R. and Finkelstein, R.R.** (2011) Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Mol Biol*, **75**, 347-363.
- Risk, J.M., Macknight, R.C. and Day, C.L.** (2008) FCA does not bind abscisic acid. *Nature*, **456**, E5-6.
- Robinson, F.L. and Dixon, J.E.** (2005) The phosphoinositide-3-phosphatase MTMR2 associates with MTMR13, a membrane-associated pseudophosphatase also mutated in type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biol Chem*, **280**, 31699-31707.
- Rock, C.** (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.*, **148**, 357-396.
- Rodriguez, P.L., Leube, M.P. and Grill, E.** (1998) Molecular cloning in Arabidopsis thaliana of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol*, **38**, 879-883.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M.W.** (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J*, **26**, 421-433.
- Rose, A., Lorenzen, S., Goede, A., Gruening, B. and Hildebrand, P.W.** (2009) RHYTHM--a server to predict the orientation of transmembrane helices in channels and membrane-coils. *Nucleic Acids Res*, **37**, W575-580.
- Saez A, Rodrigues A, Santiago J, Rubio S and PL, R.** (2006) HAB1-SWI13B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell.* , **20**, 2972-2988
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R. and Rodriguez, P.L.** (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol*, **141**, 1389-1399.
- Saibo, N.J., Lourenco, T. and Oliveira, M.M.** (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann Bot*, **103**, 609-623.

- Sanchez Mde, L., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J. and Vazquez-Ramos, J.M.** (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J Exp Bot*, **56**, 515-523.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L. and Marquez, J.A.** (2009) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, **462**, 665-668.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A. and Imaizumi, T.** (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science*, **318**, 261-265.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M. and Allen, G.J.** (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, **410**, 327-330.
- Schuppler, U., He, P.H., John, P.C. and Munns, R.** (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol*, **117**, 667-678.
- Scott, R.J., Spielman, M., Bailey, J. and Dickinson, H.G.** (1998) Parent-of-origin effects on seed development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **125**, 3329-3341.
- Scott, R.J., Spielman, M. and Dickinson, H.G.** (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*, **16** Suppl, S46-60.
- Senderek, J., Bergmann, C., Weber, S., Ketelsen, U.P., Schorle, H., Rudnik-Schoneborn, S., Buttner, R., Buchheim, E. and Zerres, K.** (2003) Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet*, **12**, 349-356.
- Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.P., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Nambara, E.** (2006) Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J*, **48**, 354-366.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaert, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T.** (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12908-12913.
- Sheen, J.** (2001) Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiol*, **127**, 1466-1475.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.C., Yu, X.C., Zhu, S.Y., Fan, R.C., Xu, Y.H. and Zhang, D.P.** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, **443**, 823-826.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 217-223.
- Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andriankaja, M., Maleux, K., Eloy, N.B., Coppens, F., Yoo, S.D., Saito, K. and Inze, D.** (2011) Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in Arabidopsis and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell*, **23**, 1876-1888.
- Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C. and Mundy, J.** (1991) cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7266-7270.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**, 755-767.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A. and Prymakowska-Bosak, M.** (2007) Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta*, **227**, 245-254.
- Srivastava, S., Choudhury, P., Li, Z., Liu, G., Nadkarni, V., Ko, K., Coetzee, W.A. and Skolnik, E.Y.** (2006) Phosphatidylinositol 3-phosphate indirectly activates KCa3.1 via 14 amino acids in the carboxy terminus of KCa3.1. *Mol Biol Cell*, **17**, 146-154.

- Stenzel, I., Ischebeck, T., Konig, S., Holubowska, A., Sporysz, M., Hause, B. and Heilmann, I.** (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **20**, 124-141.
- Stevenson, J.M., Perera, I.Y. and Boss, W.F.** (1998) A phosphatidylinositol 4-kinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. *J Biol Chem*, **273**, 22761-22767.
- Suza, W.P. and Staswick, P.E.** (2008) The role of JAR1 in Jasmonoyl-L- isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, **227**, 1221-1232.
- Swiatek, A., Lenjou, M., Van Bockstaele, D., Inze, D. and Van Onckelen, H.** (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol*, **128**, 201-211.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24**, 1596-1599.
- Taylor, G.S., Maehama, T. and Dixon, J.E.** (2000) Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8910-8915.
- To, A., Valon, C., Savino, G., Guillemot, J., Devic, M., Giraudat, J. and Parcy, F.** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell*, **18**, 1642-1651.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Sun, T.P.** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **135**, 1008-1019.
- Umbrasaite, J., Schweighofer, A. and Meskiene, I.** (2011) Substrate analysis of *Arabidopsis* PP2C-type protein phosphatases. *Methods Mol Biol*, **779**, 149-161.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Shinozaki, K.** (2006) CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **46**, 171-182.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K.** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17588-17593.
- Varnai, P., Bondeva, T., Tamas, P., Toth, B., Buday, L., Hunyady, L. and Balla, T.** (2005) Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P₃ suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci*, **118**, 4879-4888.
- Villar, C. and Köhler, C.** (2010) Plant Chromatin Immunoprecipitation. *Meth. Mol. Biol.*, **655**, 401-411.
- Vincent, P., Chua, M., Nogue, F., Fairbrother, A., Mekeel, H., Xu, Y., Allen, N., Bibikova, T.N., Gilroy, S. and Bankaitis, V.A.** (2005) A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *J Cell Biol*, **168**, 801-812.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C. and Merlot, S.** (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 3170-3184.
- Wan, X.R. and Li, L.** (2006) Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 1030-1038.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C.** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J*, **15**, 501-510.

- Wang, Z.Y. and Tobin, E.M.** (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, **93**, 1207-1217.
- Williams, M.E., Torabinejad, J., Cohick, E., Parker, K., Drake, E.J., Thompson, J.E., Hortter, M. and Dewald, D.B.** (2005) Mutations in the Arabidopsis phosphoinositide phosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns(4,5)P₂ and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant Physiol*, **138**, 686-700.
- Wilson, P.B., Estavillo, G.M., Field, K.J., Pornsiriwong, W., Carroll, A.J., Howell, K.A., Woo, N.S., Lake, J.A., Smith, S.M., Harvey Millar, A., von Caemmerer, S. and Pogson, B.J.** (2009) The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J*, **58**, 299-317.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D. and Shen, Q.J.** (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol*, **137**, 176-189.
- Xiong, L., Lee, B., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. and Zhu, J.K.** (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes Dev*, **15**, 1971-1984.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, **6**, 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 781-803.
- Yamashita, S., Oku, M., Wasada, Y., Ano, Y. and Sakai, Y.** (2006) PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy. *J. Cell Biol*, **173** 709-717
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J. and Yan, N.** (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 1230-1236.
- Zhang, H., Rider, S.D., Jr., Henderson, J.T., Fountain, M., Chuang, K., Kandachar, V., Simons, A., Edenberg, H.J., Romero-Severson, J., Muir, W.M. and Ogas, J.** (2008) The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27. *J Biol Chem*, **283**, 22637-22648.
- Zhang, W., Ruan, J., Ho, T.H., You, Y., Yu, T. and Quatrano, R.S.** (2005) Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in Arabidopsis thaliana. *Bioinformatics*, **21**, 3074-3081.
- Zhong, R., Burk, D.H., Morrison, W.H., 3rd and Ye, Z.H.** (2004) FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell*, **16**, 3242-3259.
- 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. and Zhang, D.P.** (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 3019-3036.

Tabla suplementaria 1: Homología de las proteínas GER con ABA45 (*Hordeum vulgare*) (BLASTP program, NCBI)

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
NP_196824.1	GEM-like protein 5 [Arabidopsis thaliana]	248	248	66%	5e-80	55%
NP_565538.1	GLABRA2 expression modulator [Arabidopsis thaliana]	152	152	50%	1e-42	42%
NP_174141.1	GEM-like protein 1 [Arabidopsis thaliana]	149	149	55%	4e-42	41%
NP_973510.1	GLABRA2 expression modulator [Arabidopsis thaliana]	130	130	40%	3e-35	44%
NP_192070.1	GEM-like protein 2 [Arabidopsis thaliana]	120	120	58%	1e-31	34%
NP_001031570.1	GEM-like protein 2 [Arabidopsis thaliana]	117	117	58%	1e-30	33%
NP_197728.1	putative GEM-like protein 8 [Arabidopsis thaliana]	109	109	38%	7e-28	37%
NP_197727.1	GEM-like protein 7 [Arabidopsis thaliana]	108	108	38%	9e-28	38%
NP_197726.1	GEM-like protein 6 [Arabidopsis thaliana]	109	109	38%	2e-27	38%
NP_196452.1	GEM-like protein 4 [Arabidopsis thaliana]	106	106	52%	1e-26	31%
NP_195720.1	putative GEM-like protein 3 [Arabidopsis thaliana]	86.3	86.3	46%	1e-19	31%
NP_192575.3	global transcription factor group A2 [Arabidopsis thaliana]	32.3	32.3	23%	0.47	28%
NP_173860.4	homolog of Brassica campestris pollen protein 1 [Arabidopsis thaliana]	29.6	29.6	19%	1.2	34%
NP_199828.1	C2 and GRAM domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	30.4	30.4	13%	2.1	36%

Tabla suplementaria 2 : Genes desregulados en el *microarray* de plantas *gem-1* que superan un p-value $\leq 0,005$ y presentan un *fold change* [FC] $\geq 1,8$

<i>gem-1</i>				
	AGI	Descripción	FC	p-value
1	AT3G23550	MATE efflux family protein	3,76	5,39 E-05
2	AT4G31800	WRKY family transcription factor (WRKY18)	3,59	1,79 E-06
3	AT3G49620	2-oxoacid-dependent oxidase DARK INDUCIBLE 11 (DIN11)	3,22	5,72 E-05
4	AT4G25810	xyloglucan transferase 6 (XTR6)	3,02	4,50 E-05
5	AT5G39580	peroxidase, putative	2,89	5,73 E-04
6	AT5G61160	transferase family protein	2,83	1,02 E-03
7	AT4G02330	pectinesterase family protein	2,76	7,74 E-04
8	AT1G35140	phosphate-responsive protein, putative	2,67	1,48 E-04
9	AT1G19380	expressed protein	2,47	3,02 E-05
10	AT3G45970	expansin family protein (EXPL1)	2,42	9,87 E-05
11	AT2G19800	myo-inositol oxygenase family gene (MIOX2)	2,36	3,32 E-07
12	AT2G26560	patatin, putative	2,34	8,05 E-04
13	AT2G14740	vacuolar sorting receptor 3 (VSR3)	2,29	2,91 E-07
14	AT3G16530	legume lectin family protein	2,21	1,93 E-03
15	AT2G31010	protein kinase family protein	2,19	2,33 E-04
16	AT4G30280	xyloglucan transferase, putative	2,15	2,97 E-03
17	AT4G11000	ankyrin repeat family protein	2,14	1,52 E-03
18	AT4G32800	member of the DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor	2,13	3,39 E-05
19	AT1G17420	Lipoxygenase 3 (LOX3)	2,07	2,12 E-04
20	AT1G57990	purine permease-related	2,07	8,35 E-05
21	AT3G59350	serine/threonine protein kinase	2,06	8,48 E-05
22	AT4G35180	amino acid transporter family protein	2,05	5,33 E-04
23	AT2G34930	disease resistance family protein	2,02	2,58 E-05
24	AT1G72520	Lipoxygenase (LOX4)	2,02	1,41 E-03
25	AT2G25735	expressed protein	2,00	3,93 E-03
26	AT5G67080	member of MEKK subfamily (MAPKKK19)	1,99	3,51 E-04
27	AT4G21680	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	1,98	5,36 E-05
28	AT1G66160	CYS, MET, PRO, and GLY protein 1 (CMPG1)	1,94	1,22 E-03
29	AT4G28085	expressed protein	1,94	1,33 E-04
30	AT2G35290	expressed protein	1,93	1,36 E-05
31	AT1G50040	expressed protein	1,92	2,62 E-05
32	AT4G08950	EXORDIUM (EXO)	1,91	9,36 E-05
33	AT2G47550	pectinesterase family protein	1,90	1,92 E-03
34	AT1G02660	lipase class 3	1,88	5,80 E-05
35	AT5G22570	WRKY family transcription factor (WRKY38)	1,87	3,71 E-06
36	AT5G05440	ABA receptor (PYL5)	1,85	3,72 E-06
37	AT1G76650	calmodulin-like 38 (CML38)	1,84	3,92 E-03
38	AT4G10270	wound-responsive family protein	1,83	1,39 E-03
39	AT1G72060	serine-type endopeptidase inhibitors	1,83	6,64 E-04
40	AT2G32210	expressed protein	1,83	1,75 E-03
41	AT3G30775	proline oxidase EARLY RESPONSE TO	1,82	3,55 E-05

		DEHIDRATATION 5 (ERD5)		
42	AT4G38400	member of EXPANSIN-LIKE (EXPL2)	1,81	2,57 E-06
43	AT4G31000	calmodulin-binding protein	1,80	1,12 E-03
44	AT3G62150	P-glycoprotein 21 (PGP21)	1,80	2,89 E-04
45	AT4G22200	potassium channel light dependent (AKT2)	-1,81	9,51 E-06
46	AT2G21210	putative auxin-regulated protein	-1,83	1,45 E-06
47	AT1G69530	expansin 1 (EXP1)	-1,91	2,33 E-04
48	AT3G02380	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)	-1,94	7,67 E-05
49	AT2G15020	expressed protein	-1,95	3,45 E-04
50	AT3G44450	expressed protein	-1,96	5,67 E-04
51	AT5G20150	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	-2,00	1,79 E-03
52	AT4G38860	putative auxin-responsive protein	-2,02	1,85 E-04
53	AT2G46790	pseudo-response regulator 9 (PRR9)	-2,16	4,43 E-06
54	AT2G40610	Expansin family (EXP8)	-2,32	6,17 E-05
55	AT1G73010	pyrophosphate-specific phosphatase (PS2)	-2,48	2,90 E-03
56	AT1G60590	Pectin lyase-like superfamily protein	-2,55	1,69 E-08
57	AT1G74930	ERF/AP2 transcription factor family (ORA47)	-2,80	4,47 E-06

Tabla suplementaria 3: Genes desregulados en el *microarray* de plantas *GEMoe* que superan un p-value $\leq 0,005$ y presentan un *fold change* [FC] $\geq 1,8$

<i>GEMoe</i>				
	AGI	Descripción	FC	p-value
1	AT2G22475	GRAM domain-containing protein GEM	53,62	1,67 E-11
2	AT3G45970	expansin family protein (EXPL1)	2,56	1,76 E-06
3	AT2G31010	protein kinase family protein	2,44	8,78 E-08
4	AT1G50040	expressed protein	2,09	3,13 E-05
5	AT2G19800	myo-inositol oxygenase family gene (MIOX2)	2,08	8,88 E-05
6	AT2G14740	vacuolar sorting receptor, putative VSR3	2,07	6,71 E-06
7	AT1G79700	Pathogenesis-related transcriptional factor/ERF	2,06	5,14 E-05
8	AT4G31800	WRKY family transcription factor (WRKY18)	2,03	2,86 E-03
9	AT5G26220	ChaC-like family protein	2,02	1,34 E-05
10	AT5G45130	RAB HOMOLOG F2A (RHA1)	2,01	5,94E-07
11	AT4G02330	pectinesterase family protein	1,98	2,5 E-04
12	AT4G25810	endo-xyloglucan transferase, putative (XTR6)	1,98	3,39 E-05
13	AT5G44260	zinc finger (CCCH-type) family protein	1,97	1,02 E-03
14	AT1G11380	PLAC8 family protein	1,90	1,86 E-06
15	AT2G17230	EXORDIUM like 5 (EXL5)	1,88	9,52 E-05
16	AT1G61100	disease resistance protein (TIR class), putative	1,88	1,69 E-05
17	AT1G02660	lipase class 3 family protein	1,88	3,80 E-04
18	AT4G10270	wound-responsive family protein	1,88	1,38 E-05
19	AT4G19530	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	1,87	3,95 E-05
20	AT5G51550	EXORDIUM like 3 (EXL3)	1,86	6,55 E-06
21	AT2G33570	expressed protein	1,86	6,56 E-06
22	AT3G59350	serine/threonine protein kinase	1,86	7,04 E-05
23	AT1G36370	putative serine hydroxymethyltransferase	1,84	3,51 E-05
24	AT2G42580	member of the TTL TPR Repeat (VIT)	1,83	8,81 E-05
25	AT4G13340	extensin family protein	1,80	1,21 E-03
26	AT4G26850	protein involved in ascorbate biosynthesis (VTC2)	-1,80	6,37 E-06
27	AT1G22990	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	-1,80	2,93 E-05
28	AT2G31380	B-box zinc finger protein that interacts with COP1	-1,80	1,77 E-05
29	AT3G03480	acetyl CoA:(Z)-3-hexen-1-ol acetyltransferase (CHAT)	-1,81	4,06 E-03
30	AT1G68620	alpha/beta-Hydrolases superfamily	-1,81	2,78 E-04
31	AT5G24150	squalene epoxidase 1,1 (SQP1,1)	-1,83	5,81 E-04
32	AT2G17040	Member of the NAC transcription factor family (ANAC036)	-1,84	2,40 E-04
33	AT4G29780	expressed protein	-1,84	4,31 E-04
34	AT3G21760	UDP-glucosyl transferase family protein (HIR1)	-1,84	8,84 E-06
35	AT4G25250	Pectin methylesterase inhibitor family protein	-1,86	5,75 E-05
36	AT2G45130	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein (SPX3)	-1,88	1,71 E-03
37		Leucine carboxyl methyltransferase	-1,89	1,77 E-03

	AT5G42760			
38	AT3G44450	expressed protein	-1,90	1,81 E-03
39	AT4G01630	Expansin family (EXP17)	-1,91	7,79 E-05
40	AT2G19650	DC1 domain-containing protein	-1,91	6,86 E-05
41	AT1G21525	pseudogene of unknown protein	-1,91	9,20 E-04
42	AT1G69490	member of the NAC transcription factor gene family(ANAC029)	-1,92	5,32 E-04
43	AT3G03470	member of CYP89A	-1,92	1,51 E-03
44	AT1G80130	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	-1,92	3,06 E-06
45	AT3G02380	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)	-1,93	2,99 E-06
46	AT4G22200	potassium channel light dependent (AKT2)	-1,93	1,27 E-04
47	AT1G69530	expansin, putative (EXP1)	-1,93	7,53 E-06
48	AT5G17860	calcium exchanger 7 (CAX7)	-1,93	3,01 E-03
49	AT5G17300	Myb-like transcription factor that regulates hypocotyl growth (RVE1)	-1,97	4,21 E-04
50	AT4G11280	ACC synthase 6 (ACS6)	-1,97	6,95 E-06
51	AT4G12280	copper amine oxidase family protein	-1,99	7,06 E-04
52	AT3G17790	acid phosphatase type 5 (ACP5)	-1,99	3,49 E-03
53	AT1G05650	pectinase, putative	-2,04	2,50 E-06
54	AT2G37770	aldo/keto reductase family protein	-2,06	4,11 E-04
55	AT4G25000	alpha-amylase (AMY1)	-2,06	6,58 E-05
56	AT5G54610	ankyrin repeat family protein (ANK)	-2,07	1,15 E-03
57	AT5G59320	lipid transfer protein 3 (LTP3)	-2,09	1,92 E-03
58	AT4G24700	expressed protein	-2,10	2,51 E-05
59	AT2G18050	histone H1-3	-2,17	5,10 E-04
60	AT1G68570	proton-dependent oligopeptide transport (POT)	-2,17	1,12 E-04
61	AT1G17710	phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase(PEPC1)	-2,21	1,57 E-03
62	AT2G46790	pseudo-response regulator (PRR9)	-2,26	7,94 E-05
63	AT5G20150	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	-2,31	8,67 E-04
64	AT1G52890	NAC transcription factor whose expression is induced by drought, high salt, and abscisic acid. (NAC019)	-2,37	4,93 E-04
65	AT3G28270	expressed protein	-2,39	2,42 E-04
66	AT3G47420	glycerol-3-phosphate transporter	-2,53	1,92 E-05
67	AT5G20790	expressed protein	-2,58	1,54 E-03
68	AT2G15020	expressed protein	-2,59	3,62 E-07
69	AT5G47450	tonoplast intrinsic protein, transports	-2,61	1,67 E-04
70	AT5G52390	photoassimilate-responsive protein	-2,73	2,03 E-04
71	AT5G39520	expressed protein	-2,80	4,75 E-03
72	AT1G74930	ERF/AP2 transcription factor family (ORA47)	-2,81	4,54 E-05
73	AT1G60590	Pectin lyase-like superfamily protein	-2,93	1,76 E-06
74	AT1G73010	PPs PPase 1 (PS2)	-2,99	5,45 E-04
75	AT2G33380	calcium binding protein whose mRNA is induced upon treatment with NaCl, ABA and in response to dessication (RD20)	-3,38	1,44 E-04
76	AT5G59310	lipid transfer protein 4 (LTP4)	-4,23	3,17 E-04