



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO
ABSCÍSIKO MEDIADA POR DDA1, UN NUEVO
ADAPTADOR DE SUSTRATO DE E3 UBIQUITINA
LIGASAS**

TESIS DOCTORAL

Elisa Iniesto Sánchez

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO
ABSCÍSIKO MEDIADA POR DDA1, UN NUEVO
ADAPTADOR DE SUSTRATO DE E3 UBIQUITINA
LIGASAS**

Memoria presentada por Elisa Iniesto Sánchez

Licenciada en Biología

para optar al grado de Doctora en Biología

Vicente Rubio Muñoz

DIRECTOR

Luis Eduardo Hernández

TUTOR

Elisa Iniesto Sánchez

DOCTORANDA

MADRID, 2015

A mi familia

Hace más de cuatro años que empecé esta aventura. No ha sido fácil, pero volvería a repetirla. Mirando hacia atrás veo los esfuerzos, el trabajo duro, los enfados, los días malos, pero también el aprendizaje, las risas, los cafés, los momentos divertidos, las confidencias, las anécdotas que contar... y con esto es con lo que me quedo. También con toda la gente que he conocido en estos años, sin los que esta experiencia no hubiese sido tan bonita y a los que me gustaría dar las gracias.

Gracias a Vicente por haberme dado la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio, por las enseñanzas, por la paciencia y por la confianza.

A mis profesores de la UCM, en especial a la Dra. Rosario Linacero, por iniciarme en el mundo de la Biología Molecular.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo científico y humano. En especial a Marisa, a Moni, a Amr, a Jenny, a Marta y a Eva.

A Geert de Jaeger, por dejarme hacer la estancia en PSB, y a la gente de su laboratorio, que me trataron como una más desde el primer día.

A mis compañeros del labo hermano, por haber tenido un sí para mí siempre. Gracias Mabel, Erica e Isa.

A la gente del departamento, que me han hecho sentirme como en casa. En especial a los predocs GMP, por tantos momentos dentro y fuera del CNB. Seremos siempre predocs de espíritu.

Gracias a Stelli, a Isa, a Lauri y a Miguel por ser amigos de verdad.

A mis amigos de Talavera, que son como mi familia. A mis amigas de la Uni, por nuestros momentos festivaleros. En especial a Yolanda y a Gloria.

Gracias Edu, por tantas cosas.

A mis hermanas por todo el apoyo, a mis abuelos que estarán siempre conmigo.

A mis padres, por dármelo todo. Gracias.

En la realización de este trabajo han participado muchas personas. Sin su ayuda, esta tesis no sería posible.

Me gustaría reconocer y agradecer al Dr. Vicente Rubio, por la dirección de esta tesis, por sus críticas, por sus consejos, por tener en cuenta mi opinión y por enseñarme a ser una científica.

A mis compañeros de laboratorio y a los del laboratorio 311, en especial a Marisa Irigoyen y a Mónica Rojas, que me enseñaron a manejarme en el laboratorio, a Laura Cuyás, por su ayuda incondicional, y a Mabel Puga, por sus siempre buenos consejos sobre la ciencia y la vida. A Jennifer Esteban y a Yolanda Fernández, por su labor técnica. A Marta García, Eva Sánchez y Carlos Perea, por haberse leído este manuscrito.

A los servicios del CNB, en especial a cultivo in vitro, invernadero y fotografía, que con su labor han contribuido al desarrollo de este trabajo. Al Dr. César Santiago por los experimentos de FPLC.

Al Dr. Pedro Rodríguez, por la caracterización fenotípica de las líneas oeDDA1-GFP, y por los innumerables vectores y material vegetal que nos ha proporcionado.

Al Dr. Geert de Jaeger y a la gente de su laboratorio, por enseñarme la técnica del TAP para poder llevarla a cabo en mi laboratorio.

Al Dr. Oscar Lorenzo, por el material vegetal, al Dr. Xing Wang Deng, por los anticuerpos y las líneas transgénicas, al Dr. Javier Paz-Ares por la librería de Y2H.

A la gente del departamento, que me han tendido la mano cuando he necesitado ayuda.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC y ha sido financiado mediante la ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador, del Ministerio de Economía y Competitividad, de referencia BES-2011-043318 asociada al proyecto de investigación BIO2010-18820.

RESUMEN

La ubiquitina se une covalentemente a determinadas proteínas diana mediante una cascada enzimática que, en numerosos casos, deriva en la degradación mediada por el proteosoma 26S de la proteína marcada. Dicha cascada enzimática (i.e. ubiquitinación) comienza con la transferencia de una molécula de ubiquitina desde una enzima activadora de ubiquitina (E1) a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Las enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligasas) reconocen específicamente a la proteína diana y la aproximan a la E2, facilitando de esta manera la unión de la ubiquitina al sustrato. Las enzimas E3 ligasas son, por tanto, las responsables de que el proceso de ubiquitinación ocurra de manera específica. En algunos casos las E3 ligasas están formadas por complejos proteicos. Uno de estos complejos E3 ligasa es el denominado complejo CRL4-CDD, el cual se encuentra conservado en eucariotas y está formado por: un núcleo proteico central formado por CUL4 y RBX1 (que actúa como estructura de andamiaje y permite la unión con la E2), la proteína adaptadora DDB1 (que permite la interacción con una gran diversidad de receptores de sustrato), y el módulo adaptador de sustrato DET1-COP10-DDA1 (que permite el reconocimiento específico de las dianas). La proteína DDA1 (DET1-DDB1-Associated 1) es una proteína pequeña, altamente conservada en eucariotas y sin dominios conocidos, cuya función al inicio de este estudio era también desconocida.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los mecanismos de regulación de las E3 ubiquitina-ligasas de tipo CRL4-CDD mediante la caracterización de la relación funcional entre DDA1 y los complejos CRL4 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Con este fin, se han realizado estudios sobre la funcionalidad de la proteína DDA1 de *Arabidopsis* que demuestran que DDA1, formando parte del complejo proteico que contiene a COP10, DET1 y DDB1 (complejo CDD), permite el reconocimiento específico de sustratos que serán ubiquitinados. En concreto, se ha demostrado la interacción *in vivo* entre DDA1 y los receptores de la hormona ácido abscísico (ABA) de tipo PYR/PYL/RCAR y cómo esta interacción facilita la degradación vía proteosoma del receptor PYL8. Además, de acuerdo con estos resultados, se ha demostrado que DDA1 regula negativamente las respuestas de desarrollo mediadas por ABA, entre las que se encuentran la inhibición de la germinación de las semillas, del desarrollo de la plántula y del crecimiento de la raíz.

Durante la realización de esta tesis doctoral, se ha demostrado que el mecanismo regulador de DDA1 sobre los receptores de abscísico está controlado por el balance hormonal. Así, ABA y DDA1 desempeñan un papel opuesto en la regulación de la estabilidad del receptor PYL8, previniendo y promoviendo su degradación, respectivamente.

El mecanismo por el cual el ABA protege a PYL8 de la degradación ha sido también elucidado en este estudio. Este mecanismo no implica la disrupción de la interacción entre PYL8 y DDA1, pero conlleva una reducción en los niveles de poliubiquitinación del receptor. Esto se puede explicar por la desestabilización del complejo CRL4-CDD tras el tratamiento con ABA. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, se ha observado que la capacidad de asociación entre los componentes del complejo CDD (incluyendo DDA1) y CUL4 se ve reducida en presencia de la hormona. Este fenómeno contribuye a la desensibilización de la respuesta cuando las condiciones de estrés remiten y los niveles endógenos de ABA disminuyen en la célula. Se sabe que tras la imbibición de las semillas los niveles de ABA disminuyen para permitir la germinación, en este punto DDA1 facilitaría la degradación rápida de los receptores de abscísico.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo revelan que DDA1 puede actuar como receptor de sustratos de los complejos CRL4-CDD y desvelan un nuevo mecanismo de desensibilización de la señalización por ABA basado en el control de la estabilidad de los receptores de esta hormona, controlado por el balance hormonal.

SUMMARY

Ubiquitin is covalently linked to Lysine (Lys) residues in certain proteins by specific enzymatic cascades, which may result in polyubiquitination and subsequent recognition by the 26S proteasome for degradation. These cascades begin by transference of an ubiquitin moiety from an E1 ubiquitin-activating enzyme (E1) to an E2 ubiquitin-conjugating enzyme (E2). E3 ubiquitin-ligases (E3) constitute the last step in the cascade, bringing together the E2 and the protein target that is then ubiquitinated. E3s play a key role in ubiquitination by providing substrate specificity. Some of these E3 ligases have a multiple subunits composition. The CRL4-CDD E3 complex is conserved in higher eukaryotes, and contains: CUL4 and RBX1 (which act as a scaffold structure and allows E2 binding), DDB1 (as an adaptor protein), and the substrate adaptor module DET1-COP10-DDA1 (for target recognition). DDA1 is a small protein conserved in animals and plants, it does not contain any recognizable domain, and its function was still unknown at the beginning of this work.

The aim of this thesis is to contribute to unravel the molecular mechanisms that regulate the CRL4-CDD E3 ligases activity, through the characterization of DDA1 function in the regulation of CRL4 complexes in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Thus, we shed light on this issue by characterizing *Arabidopsis* DDA1, which we show that associates with COP10, DET1 and DDB1 (CDD complex) and is able to interact with specific target proteins, promoting its ubiquitination. In this regard, we found that DDA1 physically binds to members of the PYR/PYL/RCAR family of ABA receptors. Moreover, we found that DDA1 promotes proteasomal degradation of PYL8. Therefore, DDA1, together with the CDD components, acts as a negative regulator of ABA signaling. Accordingly, DDA1 has a negative regulatory role in the ABA-mediated inhibition of seed germination, seedling development and root growth.

It is noteworthy that ABA and DDA1 play opposite roles in the regulation of PYL8 stability, where ABA and DDA1 prevent and promote PYL8 degradation, respectively.

The molecular aspects underlying ABA-mediated protection of PYL8 have been unveiled in this thesis. This mechanism does not imply disruption of the PYL8-DDA1 interaction but a decrease in PYL8 polyubiquitination rates. This can be explained by the disruption of the CRL4-CDD complex in the presence of ABA. We have determined by CoIP experiments that the CDD and CUL4 complex association capability decreases after ABA treatment.

Since ABA signaling is strongly dependent on the activity of PYR/PYL/RCAR receptors, an ABA-dependent protection mechanism for receptor stability would serve to reinforce and sustain ABA signaling, particularly during the early stages of signaling. Thus, DDA1-mediated degradation of ABA receptors may contribute to desensitizing the pathway when the stress conditions disappear and ABA levels diminish. This regulatory mechanism might also be instrumental to impair ABA signaling during germination, since it has been shown that ABA concentration in seeds is reduced upon imbibition.

Our results unveil a new regulatory role for CRL4 complexes, mediated by DDA1, at the initial stage of ABA signaling, where they affect ABA receptor function, and this mechanism is also controlled by ABA itself.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	11
<u>INTRODUCCIÓN</u>	23
1. EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA	23
1. 1 Tipos de ligasas CRL en plantas y breve descripción	25
1. 1. 1 E3 ligasas de tipo CUL1	25
1. 1. 2 E3 ligasas de tipo CUL3	26
1. 1. 3 Complejo promotor de la anafase (APC/C)	27
1. 1. 4 E3 ligasas de tipo CUL4	28
1. 2 Papel de los complejos CRL en las rutas de señalización hormonal	31
1. 2. 1 CRL1 y señalización hormonal	31
1. 2. 2 CRL3 y señalización hormonal	33
1. 2. 3 CRL4 y señalización hormonal	35
1. 3 Otras funciones de los complejos CRL4	36
1. 3. 1 Papel de CRL4 en fotomorfogénesis y control de la floración	36
1. 3. 2 Papel de CRL4 en la reparación del DNA	38
1. 4 Regulación de la actividad de los complejos CRL	40
2. PERCEPCIÓN Y RESPUESTAS AL ABA	44
2. 1 ABA y la respuesta a estrés	45
2. 2 Papel del ABA durante la germinación de las semillas	46
2. 3 Bases moleculares de la percepción y señalización del ABA	47
<u>OBJETIVOS</u>	53
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	57
1. MATERIAL BIOLÓGICO	57
1. 1 Cepas bacterianas	57
1. 2 Cepas de levaduras	57

1. 3 Material vegetal.....	57
2. MÉTODOS DE CLONAJE.....	58
2. 1 Generación de vectores en pDONR207 y pDONR221	58
2. 2 Generación de vectores en pENTR	59
2. 3 Generación de vectores de expresión en planta, en levaduras y en bacteria	60
2. 3. 1 Construcciones binarias para la transformación estable de <i>Arabidopsis</i>	60
2. 3. 2 Construcciones para ensayos BiFC en <i>N. benthamiana</i>	61
2. 3. 3 Construcciones para doble híbrido en levaduras (Y2H).....	62
2. 3. 4 Construcciones para purificación de proteínas en <i>E.coli</i>	64
2. 4 Generación de vectores de expresión en suspensiones celulares de <i>Arabidopsis</i> PSB-D.....	64
2. 5 Generación de vectores para la expresión de un miRNA artificial de DDA1 (amiRNA DDA1) en plantas de <i>Arabidopsis</i>	65
3. CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFORMACIÓN	67
3. 1 Cultivo y transformación de microorganismos	67
3. 2 Cultivo, transformación y cruces de plantas de <i>Arabidopsis</i>	68
3. 3 Cultivo y transformación de suspensiones celulares de <i>Arabidopsis</i>	69
4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN <i>ARABIDOPSIS</i>	70
4. 1 Extracción de DNA de plantas de <i>Arabidopsis</i>	70
4. 2 Análisis del DNA extraído mediante PCR.....	70
4. 3 Extracción y análisis de RNA de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	71
4. 4 Extracción y análisis de RNA de semillas de <i>Arabidopsis</i>	72
5. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS	72
5. 1 Doble híbrido por conjugación	72
5. 2 Doble híbrido por cotransformación	73
6. ENSAYOS TIPO TAP O "TANDEM AFFINITY PURIFICATION".....	73

7. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BIFC) .	74
8. MICROSCOPIA	74
9. TINCIÓN TIPO B-GLUCURONIDASA (GUS).....	75
10. TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS.....	75
10. 1 Inducción y purificación de proteínas en <i>E.coli</i>	75
10. 2 Purificación de proteínas en plántulas de <i>Arabidopsis</i>	75
10. 3 Purificación de proteínas en semillas de <i>Arabidopsis</i>	76
10. 4 Expresión y purificación de proteínas en <i>N. benthamiana</i>	76
10. 5 Purificación de proteínas en suspensiones celulares de <i>Arabidopsis</i> PSB-D.....	77
10. 6 Electroforesis de proteínas y western blot	77
10. 7 Coimmunoprecipitación de proteínas	78
10. 8 Purificación por afinidad de proteínas ubiquitinadas	80
10. 9 Ensayos de degradación in vivo	81
10. 10 Ensayos de cromatografía por exclusión molecular	81
11. ENSAYOS DE GERMINACIÓN, ESTABLECIMIENTO DE LA SEMILLA Y CRECIMIENTO DE LA RAÍZ	81
12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE DDA1 EN DIFERENTES ESPECIES VEGETALES	82
RESULTADOS	85
1. DDA1 ES UNA PROTEÍNA ALTAMENTE CONSERVADA EN PLANTAS VASCULARES	85
2. DDA1 DE <i>ARABIDOPSIS</i> FORMA PARTE DEL COMPLEJO CDD	88
3. DDA1 PRESENTA LOCALIZACIÓN NUCLEAR.....	91
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DDA1 EN DIFERENTES TEJIDOS Y ÓRGANOS	91
5. DDA1 INTERACCIONA CON LOS RECEPTORES DE ABA PYR/PYL/RCAR	94
6. EL RECEPTOR DE ABA PYL8 SE UBIQUITINA Y DEGRADA POR EL PROTEOSOMA.	98
7. LA SOBREPRESIÓN DE DDA1 FACILITA LA DEGRADACIÓN DE PYL8	99

8. LA SOBREEXPRESIÓN DE DDA1 REDUCE LA SENSIBILIDAD DE LA PLANTA AL ABA102	
9. LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE DDA1 PROVOCA HIPERSENSIBILIDAD A ABA103	
10. LA PÉRDIDA PARCIAL DE FUNCIÓN DE MIEMBROS DEL COMPLEJO CDD CAUSA HIPERSENSIBILIDAD A ABA.....	106
11. EL ABA LIMITA LA POLIUBIQUITINACIÓN DE PYL8	108
12. EL ABA MODULA EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS CRL4-CDD.....	110
13. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN EL ESTADO DE NEDILACIÓN/DENEDILACIÓN DE LA CUL4 MEDIADOS POR ABA	112
14. DDA1 INTERACCIONA CON COMPONENTES DEL SIGNALOSOMA, Y ESTA INTERACCIÓN INCREMENTA EN PRESENCIA DE ABA.....	113
15. EL ABA PROVOCA CAMBIOS GENERALES EN EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS QUE CONTIENEN A DDA1, CUL4 Y CAND1.....	115
16. LAS GIBERELINAS FAVORECEN EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS CDD Y CUL4, Y LA POLIUBIQUITINACIÓN DE PYL8	116
<u>DISCUSIÓN</u>	121
1. MODO DE ACTUACIÓN DE DDA1	121
2. CONTROL POR ABA DE LA ACTIVIDAD DE DDA1	123
2. 1 El ABA modula el ensamblaje de los complejos CRL4-CDD	125
3. CONTROL POR GIBERELINAS DE LA ACTIVIDAD DE COMPLEJOS CRL4-CDD.....	128
<u>CONCLUSIONES</u>	129
BIBLIOGRAFÍA	133

ABREVIATURAS

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol.

ABA: Ácido abscísico.

AD: dominio de activación GAL4.

amiRNA: microRNA artificial.

APC2: Complejo promotor de la anafase.

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*.

A. tumefaciens : *Agrobacterium tumefaciens*.

BD: dominio de unión GAL4.

BiFC: Complementación Bimolecular Fluorescente.

BPA, BPB y BPC: dominios tipo hélice enrollada "*β-propeller*" A, B y C.

Ca²⁺: Calcio.

CDD: Complejo COP10, DDB1, DET1, DDA1.

CLX: Cicloheximida.

CoIP: Coinmunoprecipitación.

Col : *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.

CRL4: E3 ligasas de tipo CUL4.

CRLs: E3 ligasas de tipo Culina-RING.

CSN: signalosoma COP9.

CUL4: Culina 4.

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

DDA1: DDB1, DET1-Associated 1.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DTT: Dithiothreitol.

E1: enzima activadora de ubiquitina.

E2: enzima conjugadora de ubiquitina.

E3: enzima ligadora de ubiquitina.

E. coli: *Escherichia coli*.

Abreviaturas

GAs: Giberelinas.

GFP: proteína fluorescente verde.

GUS: β -glucuronidasa.

IB: western blot.

IP: inmunoprecipitados.

JA-Ile: ácido jasmónico-isoleucina.

MS: medio Murashige y Skoog.

MSMO: medio MS-minimal organics.

NaCl: Cloruro sódico.

N. benthamiana: *Nicotiana benthamiana*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PPT: Fosfotricina.

PP2C: Protein phosphatase 2C.

PYL: PYR-like.

PYR: Pyrabactin Resistant.

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

RCAR: Regulatory component of ABA receptor.

RNA: Ácido ribonucleico.

RPT5: Subunidad AAA-ATPasa del proteosoma 26S.

SA: ácido salicílico.

SBP: Sitio de unión a la estreptavidina.

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*.

SCF: complejo proteico SKP1-CDC53/CUL1-F-BOX.

TAP: Tandem affinity purification.

Ub: ubiquitina.

UPS: sistema o ruta de la ubiquitina-proteosoma.

WD40: proteínas con motivos DWD.

Y2H: Ensayo de doble híbrido en levaduras.

YFP o E-YFP: proteína fluorescente amarilla.

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA

La ubiquitina es un pequeño péptido de 76 aminoácidos que se une de forma covalente a proteínas diana mediante cascadas enzimáticas específicas (i.e. ubiquitinación). En algunos casos, esta modificación postraduccional deriva en la degradación, mediada por el proteosoma 26S, de la proteína marcada. Este proceso (conocido como sistema o ruta de la ubiquitina-proteosoma) fue descubierto a finales de los años 70 y principios de los 80, por los Dres. Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose ^{1,2} que recibieron el Premio Nobel de Química en 2004 dada la relevancia de dicha ruta en el control de diversos procesos biológicos en eucariotas. Así, la modificación de proteínas por esta ruta tiene un papel importante en la regulación de numerosos procesos celulares. En plantas se conoce su papel regulador en señalización hormonal, floración, reloj circadiano, defensa frente a patógenos, respuesta a estreses por altas y bajas temperatura, reparación de daños en el DNA etc. ³. Además de un papel regulador de los niveles y, por tanto, de la funcionalidad de las proteínas, la ubiquitinación permite la degradación de proteínas con errores en su biosíntesis o proteínas normales que adquieren una conformación errónea ⁴.

La ubiquitina se une covalentemente a las proteínas diana mediante la formación de un enlace isopeptídico entre su glicina C-terminal y un residuo lisina de la proteína sustrato (figura 1). Este enlace covalente es el resultado final de una cascada enzimática que comienza con la transferencia de una molécula de ubiquitina desde una enzima activadora de ubiquitina (E1) a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Las enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligasas) reconocen específicamente la proteína diana y la aproximan a la E2, facilitando de esta manera la unión de la ubiquitina a la proteína sustrato ⁵. Ciclos consecutivos de ubiquitinación formarán cadenas de ubiquitina que marcará la proteína diana para su degradación proteolítica en el complejo proteosoma 26S (si se forman cadenas de ubiquitina unidas por el residuo lisina 48 o lisina 11) o para producir cambios en su localización, en su estructura, en su ensamblaje o en su actividad catalítica (si en la cadena formada las ubiquitinas están unidas vía lisina 63, 29 o 6). La monoubiquitinación de proteínas también es posible y está relacionada con procesos de endocitosis de receptores de membrana y con la modificación de histonas ⁶.

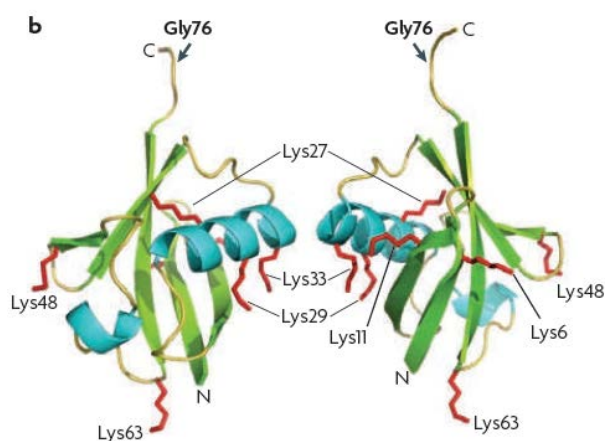


Figura 1. Estructura tridimensional de la molécula de ubiquitina desde dos ángulos distintos. Las láminas-β aparecen señaladas en verde, las hélices-α en azul. Además, se indica el residuo Gly76 necesario para la unión a proteínas diana, así como los residuos lisina, implicados en la formación de distintas cadenas de poliubiquitina ³.

Las enzimas E3 ligasas son las responsables de que el proceso de ubiquitinación se produzca de manera específica, permitiendo la modificación postraducciona de una proteína diana en concreto, dependiendo de las necesidades celulares. Tienen, por tanto, un papel clave en el proceso de ubiquitinación. Estas enzimas fueron descritas por primera vez en mamíferos ¹ y pueden ser monoméricas o formar complejos multiméricos ⁷. En plantas hay cuatro tipos principales de E3s. Estas se distinguen por la presencia de dominios HECT, RING y U-box (estructuralmente relacionado con el dominio RING) o por la formación de complejos oligoméricos, como es el caso de las denominadas Culina-RING ligasas (CRLs). Estas últimas son las más abundantes en *Arabidopsis* ³.

Las proteínas de la familia culina actúan como puente, permitiendo la unión de los adaptadores de sustrato a través de su extremo N-terminal y con una proteína con dominio RING-finger por el extremo C-terminal (RING-BOX1 o RBX1) ⁸. El dominio RING de RBX1 tiene dos residuos altamente conservados (un residuo cisteína y otro histidina), capaces de unir dos átomos de zinc. Además presenta otros residuos importantes para la formación de un núcleo hidrofóbico, implicado en la interacción con proteínas E2s ⁶. En *Arabidopsis* hay dos proteínas RBX1: RBX1a/AtRBX1;1 y RBX1b/AtRBX1;2 ⁷.

El genoma de *Arabidopsis* codifica para seis proteínas tipo culina: CULINA1 (CUL1), CULINA2 (CUL2, también denominada CULINA1b), CULINA 3a (CUL3a), CULINA3b (CUL3b), CULINA 4 (CUL4), y "ANAPHASE PROMOTING COMPLEX2" (APC2). Estas proteínas tienen un tamaño que varía entre 85 y 98 kDa, y se caracterizan por la presencia de un dominio conservado tipo culina (de 200 aminoácidos) y una región C-terminal con un sitio de unión de NEDD8/RUB1 ("NEURONAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTARY DOWNREGULATED8/ RELATED TO UBIQUITIN"). Este sitio está presente en todas las culinas con la excepción de APC2 ⁸.

Las culinas son proteínas bastante conservadas, su estructura y secuencia varía principalmente en la región N-terminal. Se pueden clasificar en cuatro tipos principales dependiendo del tipo de adaptador de sustrato que emplean (figura 2)

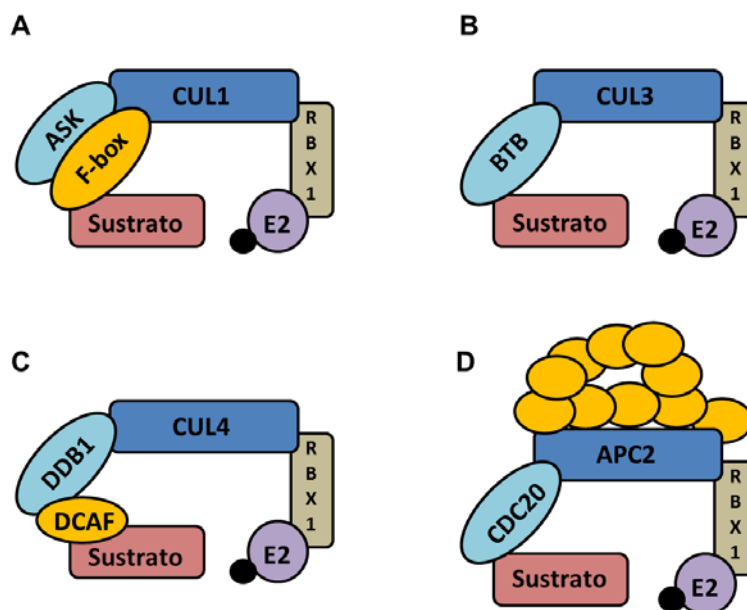


Figura 2. "Cullin-RING" ligasas (CRLs) de plantas: (A) SCF E3 ligasas (SKP1-CDC53/CUL1-F-BOX), (B) CRL3 ("CUL3-BASED E3 LIGASES"), (C) CRL4 ("CUL4-BASED E3 LIGASES") y (D) complejo APC/C ("ANAPHASE PROMOTING COMPLEX" o "CICLOSOME") Adaptada de ⁷.

1.1. TIPOS DE LIGASAS CRL EN PLANTAS Y BREVE DESCRIPCIÓN

1.1.1. E3 LIGASAS DE TIPO CUL1

En *Arabidopsis*, las E3 ligasas de tipo CUL1 (CRL1) son las más numerosas y las mejor descritas. Están representadas por los complejos SCF (SKP1-CDC53/CUL1-F-BOX). Las proteínas de tipo SKP1 (SPHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1) o ASK (ARABIDOPSIS SKIP) y las proteínas con dominio F-box relacionadas con Skp2 de humanos actúan como adaptadores de sustrato, permitiendo la aproximación de la diana al núcleo del complejo SCF (formado por Cul1 y Rbx1) ⁸. En *Arabidopsis* existen dos proteínas CUL1 y dos RBX1 (como ya se ha indicado anteriormente). Sin embargo hay 21 proteínas tipo ASK ⁹ y 649 miembros de la superfamilia SKP2-F-box predichos en *A. thaliana* y hasta 1350 en *A. lyrata* ^{10,11}. La presencia de un elevado número de adaptadores de sustrato en los complejos CRL sugiere que dichos complejos reconocen un gran número de sustratos. De hecho, los complejos SCF tienen un papel fundamental en todas las vías de señalización hormonal, donde se sabe que participan como reguladores centrales, actuando en algunos casos como receptores hormonales ⁷, aunque también es conocida su participación en gran variedad de procesos celulares, como puede observarse en la figura 3.



Figura 3. Papel biológico de los complejos SCF en plantas. Adaptada de ⁷.

1.1.2. E3 LIGASAS DE TIPO CUL3

Las E3 ligasas de tipo CUL3 (CRL3) representan la segunda clase más abundante de CRLs en *Arabidopsis*. El genoma de *Arabidopsis* codifica para dos CUL3: CUL3a y CUL3b, que se unen a RBX1 por el extremo C-terminal, y por el N-terminal a los adaptadores de sustrato, que son proteínas de tipo BTB/POZ (*"bric a brac, tramtrack and broad complex/Pox virus and zinc finger"*) ¹². Estas proteínas no son tan numerosas como las de la familia F-box, existiendo 80 miembros anotados, organizados en 10 subfamilias. Muchas de estas proteínas tienen todavía función desconocida, con lo cual queda mucho por estudiar aún sobre el papel biológico de este tipo de E3 ligasas ¹³. Algunos procesos regulados por complejos CRL3 en plantas descritos hasta la fecha se resumen en la figura 4.

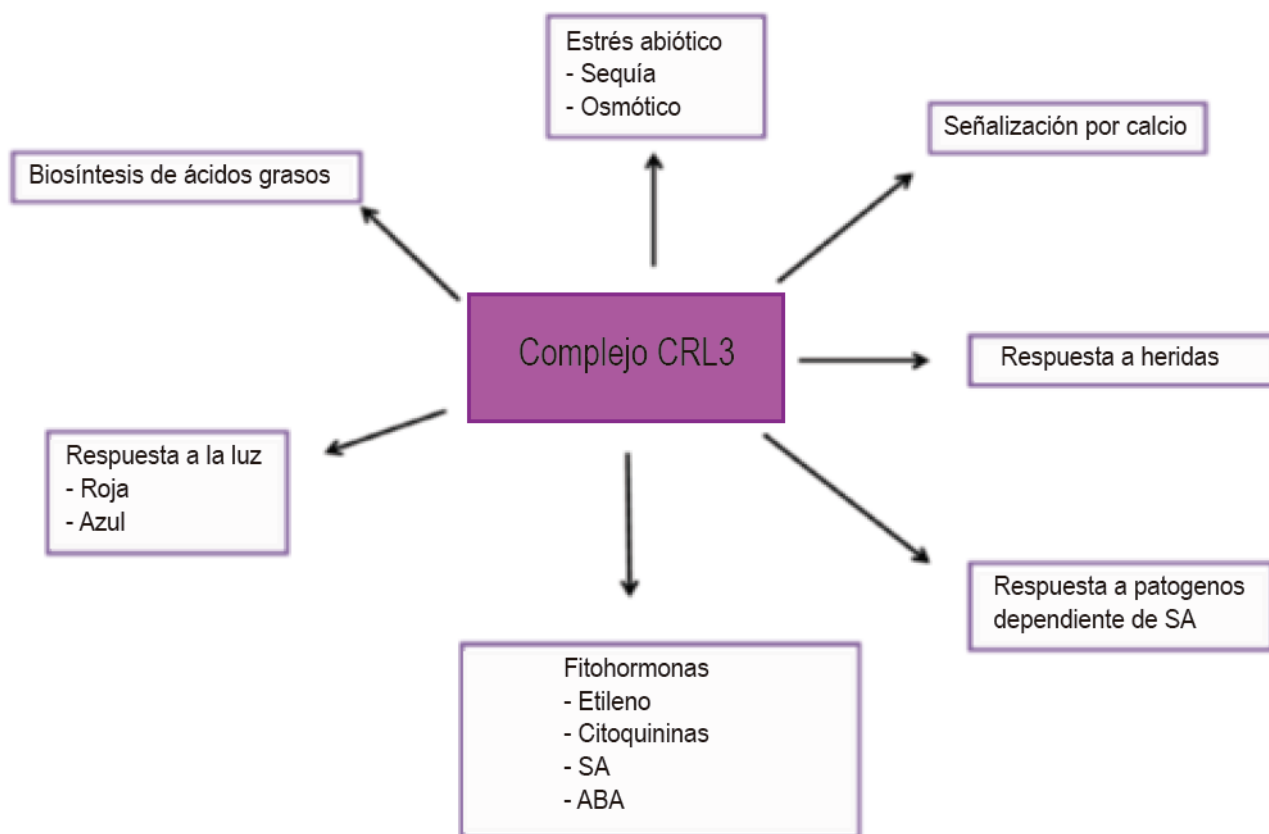


Figura 4. Papel biológico de los complejos CRL3 en plantas. Adaptada de ⁷.

1.1.3. COMPLEJO PROMOTOR DE LA ANAFASE (APC/C)

El complejo APC/C está muy conservado en eucariotas. Este complejo está formado por, al menos, 11 subunidades, de las que forman parte las proteínas APC2 (homóloga de las culinas) y APC11 (similar a RBX1). Las subunidades 1, 4, 5, 6 y 8 sirven como estructura de andamiaje para el resto del complejo. Por su parte, APC3 y APC7 participan en la unión con APC10, que junto con APC2 median el reconocimiento directo y la unión con el sustrato. Se requiere en algunos casos la presencia, además, de subunidades coactivadoras para la correcta actividad del complejo, como “CELL DIVISION CYCLE20/FIZZY” (CDC20/FZ) y “CDC20 HOMOLOG1/FIZZY-RELATED” (CDH1/FZR), que facilitan la unión del complejo APC/C con sustratos específicos ¹⁴. El complejo APC/C está implicado principalmente, y hasta donde se conoce, en el control del ciclo celular (figura 5). Se sabe que en animales este complejo está implicado en la separación entre cromátidas hermanas, proceso en el que participa el coactivador Cdc20/FZ, facilitando la ubiquitinación y degradación de las securinas y ciclinas mitóticas durante la transición entre metafase y anafase ¹⁵. Sin embargo, el mecanismo molecular que permite la progresión de metafase a anafase no está muy estudiado en plantas, y no se han identificado homólogos de la securina en el genoma de *Arabidopsis*.

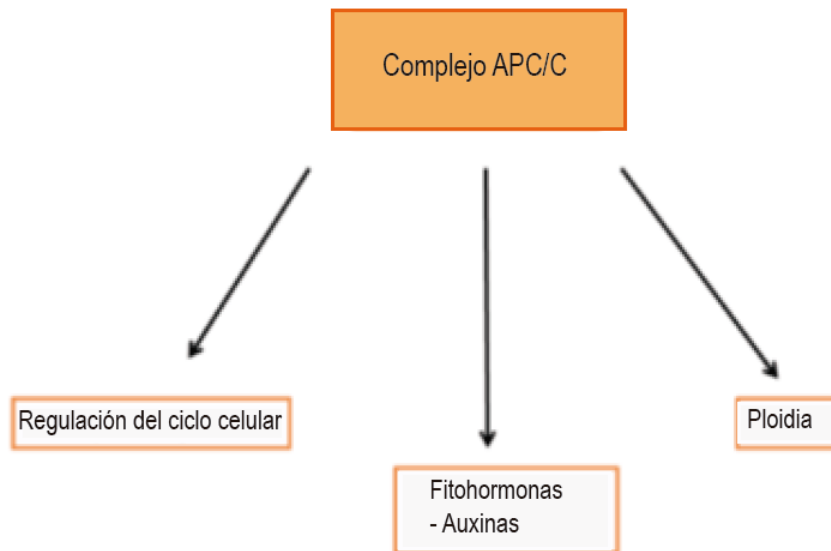


Figura 5. Papel biológico de los complejos APC/C en plantas. Adaptada de 7.

1.1.4. E3 LIGASAS DE TIPO CUL4

Las E3 ligasas de tipo CUL4 (CRL4) han sido descritas recientemente en plantas. Al igual que en otros organismos eucariotas en los que están conservadas, juegan un papel esencial para el desarrollo ¹⁶.

En este complejo, la proteína CUL4 forma el esqueleto central. CUL4 de *Arabidopsis* tiene un 63.5% de homología con Cul4 humana, y se une a RBX1 por el extremo C-terminal. Por su parte, CUL4 tiene una expresión ubicua en las células de *Arabidopsis*, siendo necesaria para el correcto desarrollo de la planta. De hecho, las plantas que no expresan CUL4 son inviables, mientras que los mutantes con niveles reducidos de CUL4 presentan desarrollo irregular de los cotiledones y hojas, defectos en la orientación de los haces vasculares y desarrollo de los estomas, así como reducción en el crecimiento de raíces laterales y enanismo ^{17,18}.

El extremo N-terminal de CUL4 permite la unión con "DNA DAMAGED BINDING PROTEIN 1" (DDB1), que es capaz de interactuar con una gran diversidad de receptores de sustrato. En *Arabidopsis* existen dos parálogos del gen *DDB1*: *DDB1a* y *DDB1b*. Las proteínas para las que codifican estos genes tienen una homología en su secuencia del 91%. Ambas proteínas son capaces de unirse a CUL4, y a pesar de su gran similitud en cuanto a estructura y patrones de expresión, presentan cierta especificidad de función. Así, se conoce la implicación de ambas proteínas en una gran variedad de procesos biológicos, tales como el desarrollo de raíces laterales, el control del número de hojas y del tiempo de floración, regulación del tamaño de la silicua y de la elongación de los hipocotilos, en la fotomorfogénesis y en la tolerancia a la luz ultravioleta. A pesar de dicha redundancia funcional, *DDB1a* parece tener un papel más relevante que *DDB1b* en el control de la floración y en el desarrollo del número de hojas bajo condiciones de crecimiento de día corto, mientras que la

pérdida de función de DDB1b resulta en un fenotipo de embrioletalidad. Sin embargo, DDB1a también tiene un papel en embriogénesis, ya que el doble mutante *ddb1a/ddb1b* tiene un fenotipo de arresto embrionario más severo y temprano que el de mutantes sencillos *ddb1b*, produciéndose entre las fases de desarrollo globular y corazón del embrión¹⁹⁻²¹.

DDB1 es una proteína altamente conservada en todos los eucariotas, y tiene un peso molecular de 125 KDa aproximadamente. Está compuesta por 3 dominios, cada uno formado por repeticiones del motivo WD40. Los motivos WD40 son secuencias de 40 aminoácidos, que normalmente comienzan con un péptido glicina-histidina, y terminan con triptófano-aspartato (WD). Los motivos WD40 se repiten entre 4 y 20 veces, y se organizan en láminas- β antiparalelas dispuestas radialmente, formando una estructura conocida como hélice enrollada (“ β -propeller”), que permite uniones proteína-proteína (figura 6).

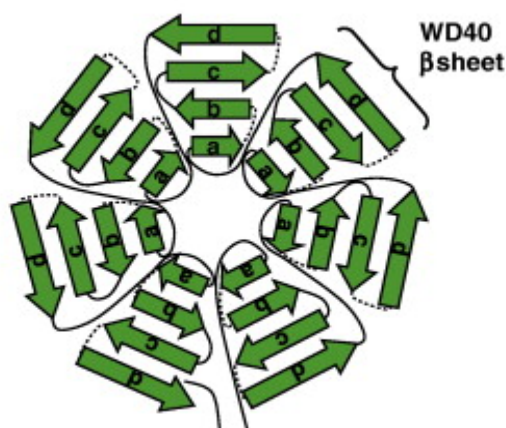


Figura 6. Representación esquemática de la estructura secundaria hélice enrollada o “ β -propeller”¹⁶.

Según estudios de cristalización de DDB1 de humanos, su estructura terciaria consiste en 3 dominios “ β -propeller” (BPA, BPB y BPC) y una hélice C-terminal. El dominio BPB permite la interacción con CUL4, mientras que BPA y BPC forman un “bolsillo” que permite la unión con los receptores de sustrato²²⁻²⁴.

Hasta la fecha, casi todas las proteínas adaptadoras de sustrato descritas que interactúan con DDB1 para facilitar la ubiquitinación de dianas a través del complejo CRL4, tienen dominios WD40 (proteínas DWD). Se han descrito 119 proteínas con estos dominios en *Arabidopsis* y 151 en arroz, de las cuales 85 en *Arabidopsis* y 78 en arroz interactúan con DDB1 a través de uno de los motivos WD40²⁵.

Se conoce como “DDB1, CUL4-ASSOCIATED FACTORS” o proteínas DCAF a los receptores de sustrato de tipo DWD capaces de interactuar con DDB1, aunque recientemente el uso del término DCAF se ha extendido para denominar a cualquier interactante de DDB1, con excepción de CUL4²⁶.

Así, algunas proteínas capaces de interactuar con DDB1 carecen de dominios WD40. Tal es el caso de “DE-ETIOLATED1” (DET1), clásicamente conocido como represor de la fotomorfogénesis. Los mutantes de *Arabidopsis det1* presentan defectos en el desarrollo del fenotipo etiolado característico de las plántulas que

germinan en oscuridad^{17,18}. DET1 también está implicado en la reparación de DNA y en el control de ritmos circadianos, mediante la degradación de un importante regulador del reloj: LHY (Late Elongated Hypocotyl)^{27,28}. Recientemente se ha descrito su papel como represor de la floración²⁹, de acuerdo con esto, los mutantes *det1* florecen prematuramente en condiciones de día corto. Otro ejemplo de una DCAF de plantas sin dominio WD40 es "CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10" (COP10). COP10 es una E2 modificada, que carece del residuo cisteína que es necesario para la unión con la molécula de ubiquitina (no tiene, por tanto, actividad catalítica como E2 conjugasa). Su función está relacionada con el favorecimiento de la actividad de otras E2 canónicas³⁰.

Los genes *DET1* y *COP10* pertenecen al loci denominado "*Constitutive Photomorphogenic/De-etioliated/Fusca*" (COP/DET/FUS), descrito inicialmente en plantas, y que también incluye a genes como *COP1* y a los correspondientes a las subunidades del signalosoma COP9 (CSN, cuya función se explicará más adelante)³¹.

DET1 y COP10 forman un complejo con DDB1 en plantas, conocido como complejo CDD ("COP10-DET1-DDB1 complex"), que fue aislado por primera vez a partir de meristemos florales de coliflor (*Brassica oleracea*) mediante purificación bioquímica²⁸. Se sabe que este complejo tiene un papel fundamental en la represión de la fotomorfogénesis, participando en la degradación del factor de transcripción LONG HYPOCOTYL5 (HY5) en oscuridad³². También se conoce su papel en la reparación del daño en el DNA, ya que facilita la degradación de la proteína DCAF DAMAGED-SPECIFIC DNA BINDING PROTEIN2 (DDB2), implicada en el reconocimiento y reparación de lesiones en el DNA²⁷.

De este modo el complejo CDD puede actuar como adaptador de sustrato, facilitando el reconocimiento de proteínas diana. Además de esta función, a través de su subunidad COP10 favorece la actividad de enzimas E2, lo que le convierte en un tipo único de adaptador de sustrato¹⁸.

Con posterioridad se han identificado nuevos componentes del complejo CDD. Así, con el fin de caracterizar el complejo CDD en humanos, denominado DDD-E2 (Det1-Ddb1-Dda1-E2), Pick y colaboradores (2007)³³ buscaron nuevos interactores de Det1 en células HEK293. De este modo, fueron capaces de purificar, junto con Flag-Det1, a Ddb1, y a una pequeña proteína altamente conservada en invertebrados, vertebrados y plantas, sin dominios reconocibles, a la que llamaron "Det1, Ddb1-associated 1" o Dda1. La proteína Dda1 de humanos (hDda1) se une a Ddb1 a través del dominio BPA, y es capaz de coimmunoprecipitar también con todos los miembros del signalosoma Cop9 (Csn1-8). A pesar de dichos estudios, la función de la proteína DDA1 nos era desconocida hasta la fecha, y su caracterización en *Arabidopsis* es el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

1.2. PAPEL DE LOS COMPLEJOS CRL EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN HORMONAL

1.2.1. CRL1 Y SEÑALIZACIÓN HORMONAL

Como ya se ha indicado anteriormente, una de las funciones más estudiadas y conocidas de los complejos CRL1 o SCF es su participación como reguladores centrales en rutas de señalización fitohormonal, actuando como receptores de hormonas en algunos casos. A continuación se describe brevemente su implicación en diversos procesos de señalización hormonal.

TIR1 forma parte de una familia de proteínas de tipo F-box denominada "TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 / AUXIN-SIGNALING F-BOX" (TIR1/AFB) que participa en la ruta de señalización por **auxinas** como parte del complejo SCF^{TIR1/AFB}. Las proteínas TIR1/AFB necesitan la unión directa con una molécula de auxina para poder interactuar con sus sustratos. Así, el complejo formado por TIR1/ASK1 sufre un cambio conformacional al unirse la molécula de auxina, lo que estimula la interacción con proteínas Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA), para su posterior ubiquitinación y degradación. TIR1, por tanto, actúa como receptor hormonal³⁴⁻³⁶. Las proteínas Aux/IAA funcionan como reguladores negativos de la ruta de señalización por auxinas, reprimiendo la actividad de factores de transcripción de tipo "AUXIN RESPONSE FACTOR" (ARF), por lo que tras su degradación, las proteínas ARF activan la expresión de determinados genes de respuesta a la hormona³⁷. Entre los genes inducidos por auxina, se encuentran los propios genes *Aux/IAA*, lo que genera un bucle de retroalimentación negativa que controla la transmisión de la señal hormonal³⁸.

Otra proteína F-Box relacionada con la familia TIR1/AFB es "CORONATINE-INSENSITIVE PROTEIN 1" (COI1), que fue inicialmente identificada en un rastreo de mutantes resistentes a la coronatina, análogo de la hormona **ácido jasmónico-iso-leucina** (JA-Ile)³⁹. COI1 es un regulador central de la señalización de la hormona JA-Ile, actuando como receptor hormonal. COI1 une específicamente la isoforma activa de la hormona (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-iso-leucina, y esta unión incrementa la degradación de los represores transcripcionales JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)^{40,41}. Las proteínas JAZ bloquean la actividad de factores de transcripción específicos MYC, de manera directa o en presencia de co-represores. La degradación de las proteínas JAZ por medio de COI1 unido a (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-iso-leucina libera a los factores de transcripción MYC/MYB, y activa la expresión de genes de respuesta a la hormona^{42,43}.

Los complejos SCF también tienen un papel en la ruta de señalización por **citoquininas**. Así, las proteínas F-box "KISS ME DEADLY" (KMD) reconocen a proteínas tipo B "ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS" (ARR de tipo B). Dichas proteínas ARR de tipo B se activan mediante fosforilación, y actúan como reguladores positivos de la señalización de citoquininas a nivel transcripcional. Por tanto, las proteínas KMD son reguladores negativos de la ruta, controlando la estabilidad de las proteínas ARR de tipo B⁴⁴.

El **etileno** es una hormona que, en plantas, afecta a una gran variedad de procesos fisiológicos y de desarrollo. En ausencia de etileno, los receptores de etileno "ETHYLENE RESPONSE" 1 y 2 (ETR1 y ETR2) reclutan a la proteína quinasa "CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE" (CTR1) que fosforila a la proteína

transmembrana localizada en el retículo endoplásmico "ETHYLENE INSENSITIVE 2" (EIN2) en su dominio citosólico C-terminal, reprimiendo la respuesta hormonal. La unión de una molécula de etileno a los receptores ETR1 y ETR2 provoca su inactivación, inactivando también CTR1, que no fosforila a EIN2, promoviendo la escisión de su porción citosólica que se transloca al núcleo, donde provoca la activación del factor de transcripción "ETHYLENE INSENSITIVE 3" (EIN3). EIN3 es un regulador central de esta ruta, ya que se une a los motivos ERE ("*Ethylene Response Elements*") en los promotores de los genes de respuesta a etileno ("*Ethylene Early Response Genes*"; i.e. *ERF1*) activando su expresión^{10,45-48}. En la ruta de señalización por etileno se han descrito algunas proteínas F-box que actúan como reguladores negativos. Se sabe que ETR2 se degrada de una manera dependiente del proteosoma, aunque la E3 ligasa responsable no ha sido aún identificada⁴⁹.

En ausencia de etileno, "EIN3-BINDING F-BOX" 1 y 2 (EBF1 y EBF2) controlan la ubiquitinación y degradación del factor de transcripción EIN3, inhibiendo la respuesta a etileno. La unión de una molécula de etileno a su receptor inactiva los complejos SCF^{EBF1/EBF2}, lo que provoca la consecuente estabilización de EIN3 que deriva en la inducción de la respuesta a etileno a nivel transcripcional^{45,46,50}. Estudios más recientes han determinado que la estabilidad de EIN3 también puede estar regulada por fosforilación. Así, la fosforilación de EIN3 por las proteínas tipo MAPK: MPK3 y MPK6 estabilizan la proteína. Por el contrario, la fosforilación de EIN3 mediada por CTR1 provoca su degradación⁵¹. A pesar de que no está claro como estas fosforilaciones alteran la estabilidad de EIN3, se cree que las F-box EBF1/2 tienen distinta afinidad por las diferentes isoformas de EIN3.

Por otra parte, el cambio de localización de EIN2 en respuesta a etileno provoca una degradación de EBF1 y EBF2 que depende del proteosoma pero cuyas bases moleculares son aún desconocidas⁵². Además, EIN2 en sí mismo es diana de la actividad de complejos SCF cuando las proteínas "EIN2 TARGETING PROTEIN"1 y 2 (ETP1 y ETP2) actúan como adaptadores de sustrato en ausencia de etileno⁴⁷.

En el caso de la hormona **ácido giberélico** o giberelina (GA), la señalización ocurre por la unión directa a uno de los tres receptores "GA-INSENSITIVE DWARF1" (GID1a, GID1b o GID1c)⁵³. Esta unión con la molécula de giberelina induce la formación de un complejo con las proteínas DELLA. Las DELLA forman parte de una pequeña familia de proteínas de cinco miembros en *Arabidopsis* que funcionan como represores transcripcionales de las respuestas a GA. Las proteínas DELLA tienen, además del motivo DELLA en el extremo N-terminal, un motivo VHYPN, que se requiere para la interacción con los receptores GID1⁵³. La formación de los complejos GID1/DELLA promueve la asociación con las proteínas F-box "SLEEPY1" (SLY1) y "SLEEPY2/SNEEZY" (SLY2/SNE), que resulta en la ubiquitinación y degradación de las proteínas DELLA mediada por el complejo SCF^{SLY}⁵⁴.

Se han descrito varias proteínas F-box que participan en las repuestas a la hormona **ácido abscísico** (ABA), como es el caso de la proteína "DROUGHT TOLERANCE REPRESSOR/S-LOCUS F-BOX-LIKE 35" (DOR/AtSFL35), que se expresa principalmente en los estomas, y cuya sobreexpresión resulta en un fenotipo de hipersensibilidad a la sequía, lo que correlaciona con un cierre estomático defectuoso⁵⁵. Los sustratos

específicos de DOR se desconocen por el momento, sin embargo sí que se sabe que es capaz de interactuar con un número muy limitado de proteínas ASK.

Por otra parte, "EMPFINDLICHER IM DUNKELROTEN LICHT1-LIKE PROTEIN3" (EDL3) es otra F-box implicada en la respuesta a ABA, participando en una gran variedad de procesos de desarrollo dependientes de esta hormona, tales como la germinación, control de la floración o crecimiento de la raíz. Aunque no se conocen dianas directas de EDL3, sin embargo se sabe que regula negativamente la expresión del gen *ABI1*, que codifica para una proteína fosfatasa PP2C⁵⁶. Las PP2Cs son, como se explicará más adelante, importantes reguladores negativos de la ruta de señalización mediada por ABA.

Otro ejemplo de proteína F-box implicada en la señalización por ABA y estrigolactonas es "MORE AXILLARY GROWTH2" (MAX2), que funciona como regulador positivo en las rutas de señalización de dichas hormonas. En el caso del ABA, la pérdida de función de esta proteína genera un fenotipo de reducción de la respuesta al cierre estomático dependiente de ABA y una expresión defectuosa de los genes de respuesta a la hormona, además de ser hipersensibles a la sequía y a otros estreses osmóticos⁵⁷.

1.2.2. CRL3 Y SEÑALIZACIÓN HORMONAL

En cuanto a función de los complejos CRL3 en señalización hormonal, se sabe que los dobles mutantes *cul3^{hypomorph}* en *Arabidopsis* (que carecen de actividad CUL3b, pero que mantienen parcialmente funcional a CUL3a) muestran defectos relacionados con la ruta de señalización por **etileno**, lo que correlaciona con niveles incrementados de la enzima "1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE" (ACS5), que tiene un papel clave en la biosíntesis de esta hormona⁵⁸.

Los mutantes "*ethylene overproducer*" 1 (*eto1*) también contienen niveles elevados de etileno. En este caso el mutante *eto1* está afectado en una proteína "BTB/POZ-TETRATRICOPEPTIDE REPEAT" (BTB/POZ-TPR), que reconoce y marca a las proteínas implicadas en la biosíntesis de etileno ACS de tipo II para su degradación mediante el proteosoma⁵⁹.

Uno de los descubrimientos más importantes sobre el papel de las E3 ligasas CRL3 en los últimos años ha sido la identificación de las proteínas BTB/POZ de la familia "NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED" (NPR) como receptores de la hormona **ácido salicílico** (SA) en la ruta de defensa dependiente de esta hormona^{60,61}. En esta ruta, NPR1 actúa como regulador central. SA controla la localización subcelular de NPR1 mediante cambios en el potencial redox de la célula. Así, NPR1 en ausencia de SA se encuentra en el citoplasma formando oligómeros mediante puentes disulfuro intermoleculares sensibles al potencial redox. Tras la inducción, estos puentes disulfuro se reducen, liberando los monómeros NPR1 que atraviesan la membrana nuclear, donde NPR1 actúa como cofactor de factores de transcripción de tipo TGA (proteína de unión al motivo TGACGTCA), para inducir la expresión de genes de defensa⁶². La presencia de dominios BTB en NPR1 hace

pensar que forma parte de los complejos CRL3, sin embargo NPR1 en sí mismo es sustrato de la degradación por el proteosoma. Así, NPR1 se fosforila en el núcleo tras su unión al factor de transcripción TGA, y esta fosforilación resulta en su degradación dependiente de CUL3⁶³. La degradación de NPR1 fosforilado dependiente de SA serviría para mantener niveles elevados de actividad transcripcional, permitiendo la formación de nuevos complejos DNA-TGA-NPR1 con NPR1 "fresco". Recientemente se ha descrito que la degradación de NPR1 requiere la actividad de otros miembros NPR: NPR3 y NPR4. El SA promueve la interacción NPR1-NPR3, pero disrumpe la interacción NPR1-NPR4. Se cree que CUL3-NPR4 promueve la degradación de NPR1 en ausencia de SA con el fin de impedir la activación de la respuesta defensiva en situaciones innecesarias. Por el contrario, el ataque directo por un patógeno produce un gran incremento en los niveles de SA, lo que provoca la degradación de NPR1 dependiente de CRL3^{NPR3}, e induce muerte celular programada en lugar de desencadenar una respuesta defensiva⁶⁰.

La señalización inducida por **calcio** también tiene un papel fundamental en la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos. Un ejemplo es la proteína "SIGNAL-RESPONSIVE GENE1/CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 3" (AtSR1), que regula negativamente la expresión de "ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1" (EDS1), una proteína clave en la respuesta de defensa frente a patógenos en *Arabidopsis*. "AtSR1 INTERACTING PROTEIN1" (AtSR1IP1) codifica para una BTB/POZ con un dominio terminal NPH3, que actúa como un regulador positivo de las respuestas de defensa. Los complejos CRL3^{AtSR1IP1} E3 ligasas reconocen y marcan la proteína AtSR1 para su degradación, y este proceso se ve incrementado en presencia de SA⁶⁴.

Las E3 ligasas CRL3 también tienen su papel en la ruta de señalización por **ABA**, a través de las proteínas BTB/POZ-MATH (BPM) (6 en *Arabidopsis*), que tienen un dominio MATH ("Meprin And Traf Homology") en su extremo N-terminal. Se ha demostrado la unión de este dominio MATH con los factores de transcripción "HOMEBOX PROTEIN 6" (ATHB6) para su degradación. Los factores ATHB6 son reguladores negativos de la ruta desencadenada por ABA⁶⁵.

Las proteínas BPMs también interactúan con varios factores de transcripción de tipo "ETHYLENE RESPONSE FACTOR/APETALA2" (ERF/AP2), que se agrupan dentro de una familia de proteínas asociada con la transducción de la señal hormonal, estrés abiótico y metabolismo. Concretamente, se ha demostrado la interacción entre BPMs y "RELATED TO APETALA 2.4/WOUND INDUCED DEDIFFERENCIATION 1" (RAP2.4/WIND1) y "WRINKLED1" (WRI1). RAP2.4 controla respuestas a estrés por sequía, senescencia, y procesos relacionados con el control por etileno y citoquininas, mientras que WRI1 es un regulador central de la biosíntesis de ácidos grasos en semilla y es importante para el desarrollo temprano de la plántula. Así, los complejos CRL3^{BPM} interactúan directamente a nivel de DNA con estos factores de transcripción ERF/AP2, lo que conlleva su degradación proteolítica, controlando la transcripción de un gran número de genes implicados en la respuesta a sequía, a herida, en la respuesta a etileno y citoquininas, y en el desarrollo temprano de la plántula^{66,67}.

La proteína BTB/POZ “ARM REPEAT PROTEIN INTERACTING WITH ABF2” (ARIA) también funciona como regulador positivo de la ruta de señalización por ABA. ARIA interacciona con reguladores de la respuesta a ABA: los factores de transcripción tipo cremallera de leucina “ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 2” (ABF2) y la proteína ERF/AP2 ADAP (“ARIA-INTERACTING DOUBLE AP2 DOMAIN PROTEIN”). Sin embargo, no parece que ARIA esté mediando la degradación de estos factores de transcripción. Así, su unión podría ser necesaria para la correcta transcripción de genes de respuesta a ABA mediada por ABF2 y ADAP, lo que explicaría el papel de ARIA como regulador positivo de esta respuesta hormonal ⁶⁸.

1.2.3. CRL4 Y SEÑALIZACIÓN HORMONAL

Varios estudios han relacionado a los complejos CRL4 E3 ligasa con las rutas de señalización fitohormonal, especialmente con procesos relacionados con la señalización de **ABA**. En este sentido, una familia de proteínas DWD conocida como “DWD HYPERSENSITIVE TO ABA” (DWA) ha sido caracterizada y dado a conocer su papel como proteínas DCAF. Dos de las proteínas de esta familia, DWA1 y DWA2, son capaces de interactuar entre sí, a la vez que con DDB1b. Los mutantes nulos *dwa* desarrollan raíces primarias cortas en presencia de ABA y NaCl, lo que pone de manifiesto el papel de estas dos proteínas como reguladores negativos de la ruta del ABA. Estas proteínas interactúan con el factor de transcripción “ABA-INSENSITIVE5” (ABI5), marcándolo para su degradación. Un tercer miembro de la familia DWA: DWA3, también actúa como regulador negativo de la respuesta a ABA, aunque no interacciona con las otras proteínas de la familia ni con ABI5, y su papel regulador no se conoce bien todavía a nivel molecular ^{69,70}.

“ABA-HYPERSENSITIVE DCAF1” (ABD1) es otra proteína DCAF que actúa como un regulador negativo de la ruta, ya que la pérdida de su función resulta en un fenotipo de hipersensibilidad a ABA y NaCl. ABD1 es capaz de interactuar con ABI5, pero no con proteínas de la familia DWA, lo que sugiere que actúa de manera independiente a las mismas para controlar también los niveles del factor de transcripción ABI5 ⁷¹.

Los mutantes para la proteína “PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1” (PRL1) muestran hipersensibilidad a ABA, citoquininas y azúcar, desarrollando raíces más cortas cuando crecen en presencia de estas hormonas o de glucosa. PRL1 interacciona con DDB1, además de con las enzimas quinasa “ARABIDOPSIS SUCROSE NON-FERMENTING-1 KINASE HOMOLOG 10” (AKIN10) y AKIN11, que están implicadas en respuestas metabólicas y de desarrollo ²⁵. AKIN10 y AKIN11 también son capaces de interactuar con ASK1, indicando que PRL1 y ASK1 compiten por la unión a estas proteínas ⁷². PRL1 actúa como adaptador de sustrato en complejos CRL4 reconociendo AKIN10 y/o AKIN11, marcándolas para su degradación ²⁵.

La proteína “TGF- β RECEPTOR INTERACTING PROTEIN 1/EUKARIOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3i” (TRIP-1/Eif3i) es una proteína DWD que participa en el inicio de la traducción formando parte de un complejo eIF3. TRIP-1 interacciona y es fosforilado por “BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1” (BR11), un

componente de la ruta de señalización por **brasinoesteroides**, aunque su participación en esta ruta todavía es desconocida. Sin embargo, sí se sabe que TRIP-1 coimmunoprecipita con DDB1b y CUL4, por lo que se asume que cumple una función en la ruta de señalización fitohormonal como parte del complejo CRL4^{TRIP-1}²⁵.

1.3. OTRAS FUNCIONES DE LOS COMPLEJOS CRL4

1.3.1. PAPEL DE CRL4 EN FOTOMORFOGÉNESIS Y CONTROL DE LA FLORACIÓN

La familia "CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC/DE-ETIOLATED FUSCA" (COP/DET/FUS) constituye un grupo de proteínas identificadas mediante rastreo genético en *Arabidopsis*, y que juegan un papel importante en el control de la fotomorfogénesis. Así, las proteínas COP/DET/FUS regulan, por ejemplo, la transición del estado etiolado; propio de plantas crecidas en oscuridad y caracterizado por la presencia de un hipocotilo elongado, gancho apical, cotiledones cerrados y ausencia de clorofila, a desetioloado; el que presentan las plántulas crecidas en presencia de luz, donde los cotiledones se expanden, se acumula clorofila en los cloroplastos, desaparece el gancho apical y se arresta la elongación del hipocotilo. Muchas de las proteínas COP/DET/FUS interactúan con distintos complejos CRL4³¹, incluyendo a DET1 y COP10 (descritas anteriormente).

COP1 forma parte de este grupo de proteínas, y actúa como un regulador central de la fotomorfogénesis. En condiciones de crecimiento en oscuridad, actúa como una E3 ligasa que, junto con proteínas de la familia "SUPPRESSOR of PHYTOCHROME A" (SPA) (SPA1, 2, 3 y 4) es capaz de interactuar con varios factores de transcripción que actúan como reguladores positivos de la fotomorfogénesis, como "ELONGATED HYPOCOTYL5" (HY5), "LONG AFTER FAR RED LIGHT 1" (LAF1) o "LONG HYPOCOTIL FAR-RED1" (HFR1), y marcarlos para su degradación por el proteosoma⁷³. Por tanto, COP1 actúa como un regulador negativo de la fotomorfogénesis. Como se ha indicado anteriormente, para el reconocimiento de alguno de sus sustratos, COP1 interactúa con otras proteínas, como las de la familia SPA. Las proteínas SPA constituyen una pequeña familia de cuatro miembros en *Arabidopsis*, que forman homo y heterodímeros entre ellas, y son capaces de dimerizar con COP1. Tanto COP1 como SPA son proteínas con dominios DWD, que forman complejos con CUL4 y DDB1 en plantas⁷⁴ (figura 7).

Por otra parte, COP1 participa en el control de la estabilidad de la proteína "CONSTANS" (CO), regulador clave de la expresión del flórigero "FLOWERING LOCUS T" (FT) que es un factor de transcripción crítico para la inducción de meristemos apicales reproductivos a partir de uno vegetativo^{75,76}. Así, los mutantes *cop1* y *cul4* tienen elevados niveles de expresión de FT y, como consecuencia, fenotipos de floración temprana, además de desetioloación bajo condiciones de crecimiento en oscuridad⁷⁴ (figura 7).

Además, COP1 controla la floración y los ritmos circadianos regulando la actividad de la proteína "GIGANTEA" (GI). Así, durante la noche, COP1 y "EARLY FLOWERING 3" (ELF3) se acumulan en el núcleo,

donde interactúan y forman un complejo con GI para promover su degradación. En este proceso ELF3 actúa también como adaptador de sustrato, permitiendo la unión de COP1 y GI, lo que al final conlleva la propia degradación de ELF3 mediada por COP1 (figura 7). En ausencia de GI, las proteínas F-box FKF1 ("FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1") y ZTL ("ZEITLUPE"), implicadas en control de la floración y del ritmo circadiano, respectivamente, se inactivan. De este modo, dichas proteínas F-box no son capaces de promover la degradación de sus respectivos sustratos: CDF1 ("CYCLING DOF FACTOR 1" en el caso de FKF1) y TOC1 ("TIMING OF CAB EXPRESSION 1", para ZTL), que reprimen la expresión de *CO* el primero, y de genes del ritmo circadiano el segundo.⁷⁷ Por tanto, COP1 regula a *CO* tanto a nivel transcripcional como postraducciona.

COP1 también juega un papel en el control de la fotomorfogénesis bajo condiciones de luz UV. Así, en condiciones de oscuridad, actúa como represor de la fotomorfogénesis promoviendo la degradación de determinados factores de transcripción como se ha indicado anteriormente. Por el contrario, bajo condiciones de luz UV, regula positivamente este proceso mediante la estabilización de HY5. Este cambio de función es inducido por el receptor de UV, "UV RESISTANCE LOCUS 8" (UVR8), que se une a COP1 tras la exposición con luz UV, e induce la disociación de COP1-SPA del complejo CRL4 (figura 7). Por tanto, diferentes condiciones lumínicas y ambientales controlan con qué interactores se asocia COP1, y por consiguiente, definen su actividad E3 ligasa específica^{78,79}.

Los complejos CRL4 también están implicados en el control del tiempo de floración, de una manera independiente de COP1, mediante la regulación de los niveles de FLC ("FLOWERING LOCUS C"), un regulador negativo clave para el proceso de floración⁸⁰. FY ("FLOWERING LOCUS Y") es una proteína DWD que forma parte de la ruta de floración autónoma, y que reprime la actividad de FLC. No está claro cómo FY controla FLC a nivel molecular. Sin embargo, estudios recientes han determinado que FY interactúa con DDB1b y co-inmunoprecipita con CUL4²⁵, lo que apunta a una degradación de FLC o de alguno de sus reguladores mediada por complejos CRL4^{FY}.

Se han descrito otras E3 ligasas de tipo CRL4 que también están implicadas en la regulación de la expresión de *FLC*, tal es el caso de la proteína DWD "MULTI-COPY SUPPRESSOR OF IRA4" (MSI4), que interactúa con los complejos de tipo "CURLY LEAF-POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2" (CLF-PRC2-like). Se sabe que los complejos de tipo CLF-PCR2-like regulan la expresión génica participando en la trimetilación de la histona 3 (H3K27me3). Estos complejos se unen al promotor de *FLC*, marcándolo epigenéticamente y reprimiendo su expresión. Los complejos CUL4^{MSI4} regulan positivamente la actividad de CLF-PRC2, posiblemente activando mediante monoubiquitinación alguna de sus subunidades, o bien modificando proteínas de la cromatina cuya ubiquitinación se requiere para que CLF-PRC2 lleve a cabo su función.⁸¹

DDB1 también interactúa con otros miembros de la familia "MULTI-COPY SUPPRESSOR OF IRA4", como MSI1, cuya interacción con los complejos PRC2-like controla la impronta parental y la iniciación de la formación del endospermo durante el desarrollo de la semilla^{19,82}.

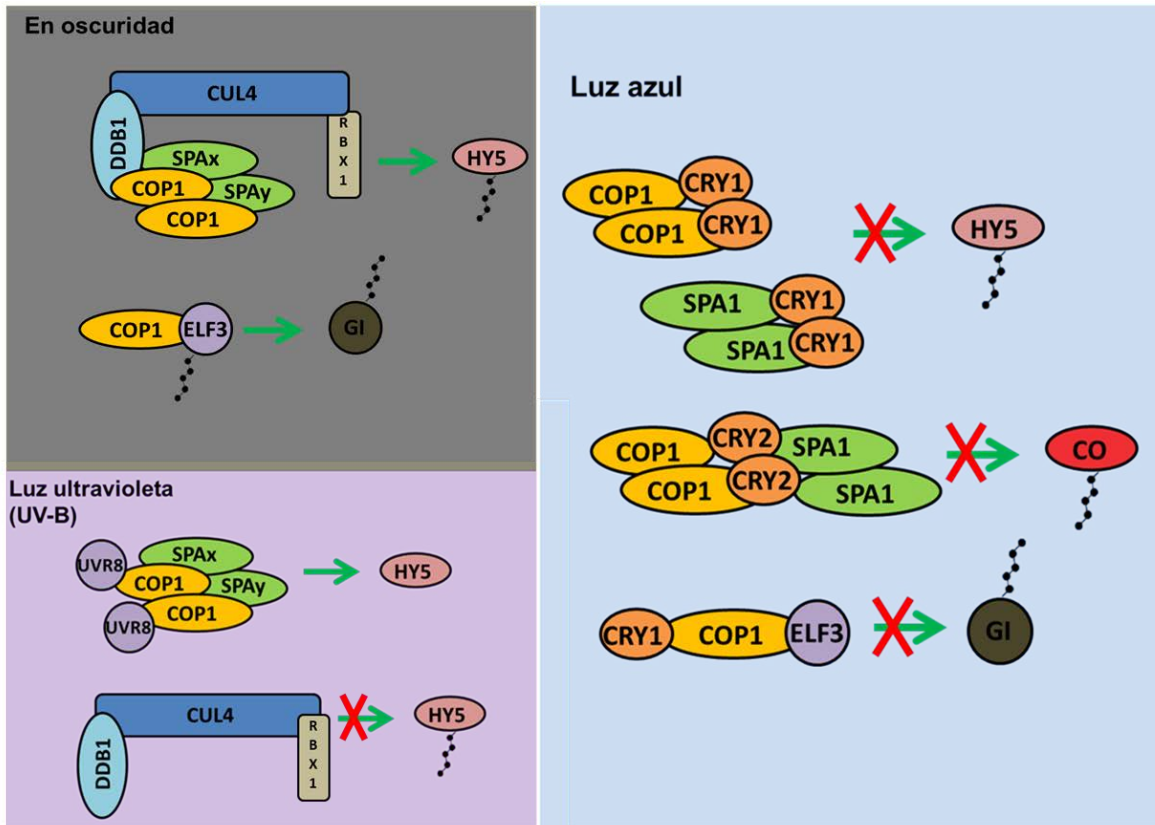


Figura 7: Organización de los complejos que contienen a COP1 dependiendo de las condiciones lumínicas. En oscuridad, los complejos CUL4-DDB1-COP1-SPA median la degradación de HY5, reprimiendo la respuesta a luz. COP1 y ELF3 interactúan y forman un complejo con GI para promover su degradación, degradándose también ELF3. Bajo condiciones de luz azul, la interacción directa entre las proteínas SPA y los criptocromos (CRY1 y CRY2, ambos fotorreceptores de luz azul) inhiben la actividad del complejo COP1-SPA, impidiendo la degradación de HY5 y CO. En presencia de luz UV-B, los complejos UVR8-COP1-SPA estabilizan a HY5. Los complejos COP1-SPA están formados por dos proteínas COP1, y dos proteínas SPA, que pueden ser homogéneas (SPAx) o heterogéneas (SPAx y SPAy). Adaptado de ^{78,83}.

1.3.2. PAPEL DE CUL4 EN LA REPARACIÓN DEL DNA

Cambios en los niveles de DDB1 y CUL4 afectan críticamente a la sensibilidad de las plantas a la luz UV ²⁰. La exposición a luz UV-B y UV-C puede provocar lesiones en el DNA, frecuentemente representadas por dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) o fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP). En plantas, la ruta de reparación predominante de este tipo de lesiones se lleva a cabo mediante fotoliasas, que dependen de la luz para "fotorreactivar" sitios de rotura. Alternativamente, esos sitios pueden ser reparados mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos ("*Nucleotide Excision Repair*" o NER), que se lleva a cabo de manera independiente de luz. Dos proteínas DWD, "DNA DAMAGE BINDING PROTEIN 2" (Ddb2) y "COCKAYNE SYNDROME A" (CSA), desempeñan un papel importante en la detección de lesiones en el DNA por UV, y en la activación de su reparación mediante NER, tanto en animales como en plantas ¹⁶.

DDB2 es una proteína DWD, descrita en humanos inicialmente, capaz de interactuar con DDB1 y con daños en el DNA inducidos por UV, lo que sirve como marca para la reparación de estos sitios a través de la

maquinaria NER⁸⁴. El complejo CRL4^{DDB2} solo es activo cuando DDB2 está unido a DNA dañado, ya que en ausencia de daño inducido por luz ultravioleta, el complejo CSN (que se describe más adelante) inhibe la formación del complejo CRL4^{DDB2}⁸⁵ (figura 8).

CSA fue identificada también en humanos, pero al contrario de DDB2, esta proteína no se une directamente al DNA. CSA se une al RNA mediante su interacción con RNA polimerasas que se encuentran en zonas lesionadas, lo que también sirve como marca para la maquinaria de reparación. Como DDB2, CSA forma complejos con CRL4 a través de su interacción con DDB1, lo que provoca su degradación junto con la RNA polimerasa, haciendo el sitio de rotura accesible para la maquinaria de reparación⁸⁵. De este modo, el mecanismo en el que CSA está implicado solo sirve para reparar zonas activas transcripcionalmente (figura 8).

DDB2 y CSA están funcionalmente conservadas en animales y plantas, y su pérdida de función provoca una hipersensibilidad a la luz UV en *Arabidopsis*, así como una reducción en los mecanismos de reparación del DNA^{16,20}.

En *Arabidopsis*, DDB2 se localiza en el núcleo, y se expresa principalmente en raíces y flores. Su expresión se induce tras la exposición a luz UV, sin embargo, bajo estas condiciones, la proteína se desestabiliza. Esta desestabilización está controlada por los niveles de DDB1 en el núcleo, ya que DDB1 es rápidamente translocado del citosol al núcleo tras la exposición a luz UV^{16,20}.

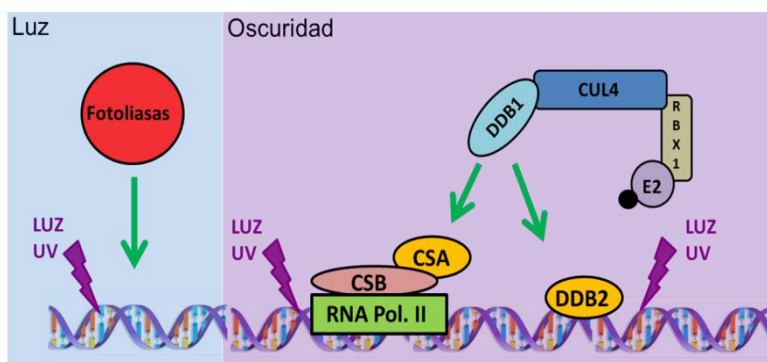


Figura 8: Mecanismos de reparación de daños en el DNA inducidos por luz UV en plantas. Las plantas son capaces de reparar lesiones en el DNA de una manera dependiente de la luz, mediante fotoliasas, o de una manera independiente de la luz, mediante un mecanismo NER. En la reparación por NER están implicados los complejos CRL4, que en *Arabidopsis* pueden interactuar con CSA (que a su vez forma un complejo con "Cockayne Syndrome Factor B" (CSB) y la RNA Pol. II) o con DDB2.

En *Arabidopsis* existen dos homólogos de CSA, ATCSA-1/CSAat1A y CSAat1B. Se expresan en todos los tejidos excepto en anteras y semillas, y su expresión no varía después del tratamiento con UV. Ambas se localizan en el núcleo, en zonas activas transcripcionalmente. Su pérdida de función causa hipersensibilidad al UV, lo que correlaciona con una reducción en los mecanismos de reparación. Asimismo, la sobreexpresión de estas proteínas también resulta en una hipersensibilidad al UV, indicando que una dosis apropiada es crítica para coordinar eficientemente el papel de las CRL4 con la maquinaria de reparación del DNA^{16,86,87}.

DET1 también está implicado en tolerancia a luz UV y reparación de daños en el DNA^{17,27}. Los mutantes nulos *det1* son hipersensibles a la luz UV, y su sobreexpresión resulta en una reducción de los fotoproductos formados tras la exposición a UV, lo que indica que niveles adecuados de esta proteína son

importantes para una actividad NER eficiente ⁸⁶. DET1 se degrada de manera dependiente de CRL4 y UV. Además DDB2 es más estable en el fondo mutante *det1*, indicando una cooperación entre DET1 y DDB2 para la reparación por NER ⁸⁶.

1.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS CRL

Con la excepción de los complejos APC/C, la actividad de los complejos CRLs está regulada por la modificación de la subunidad CUL con la molécula “Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8/Related to ubiquitin” (NEDD8/RUB). NEDD8/RUB es un péptido relacionado con la ubiquitina (“ubiquitin-like modifier” o UBL), con el que guarda un 60% de identidad. NEDD8/RUB está conservado en todos los eucariotas y se une a los residuos lisina de las proteínas sustrato a través de cascadas enzimáticas en las que participan enzimas E1, E2 y E3, de manera análoga a lo que ocurre en el caso de la ubiquitinación. El proceso mediante el cual NEDD8/RUB se une a la culina (concretamente a una lisina conservada en el extremo C-terminal) se conoce como nedilación o rubilación. La nedilación estimula la actividad de los complejos CRLs provocando cambios estructurales en la culina y en RBX1, lo que promueve el reclutamiento de la E3 y su aproximación al sustrato a ubiquitar ^{88,89}. La nedilación de las culinas además impide la unión de la proteína “CULLIN-ASSOCIATED NEDDYLATION DISSOCIATED” (CAND1) al subcomplejo formado por culina y RBX1, como se explicará a continuación.

Los genomas de plantas contienen múltiples genes que codifican para el péptido NEDD8/RUB. En el caso de *Arabidopsis*, *RUB1* y *RUB2* codifican para proteínas NEDD8/RUB casi idénticas que forman dímeros con la ubiquitina, mientras que *RUB3* da lugar a una proteína más divergente que actúa como un monómero ⁹⁰. En *Arabidopsis*, los dobles mutantes *rub1 rub2* presentan un fenotipo de arresto del crecimiento durante las primeras etapas de la embriogénesis, similar al fenotipo de pérdida de función de CUL1, poniendo en evidencia la importancia de NEDD8/RUB para la viabilidad de la planta ⁹¹.

En *Arabidopsis*, las proteínas “AUXIN RESISTANT1” (AXR1) y E1 “C-TERMINAL RELATED1” (ECR1) funcionan como enzima NEDD8/RUB E1 activadora ^{92,93}. Una vez activada, se produce la transferencia de NEDD8/RUB a la enzima E2 “RUB CONJUGATING ENZYME1” (RCE1) ⁹⁴. Se ha descrito que RCE1 permite la unión covalente de NEDD8/RUB a CRL1. En levaduras y animales, la proteína “DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION1” (DCN1) actúa como una NEDD8/RUB E3 ligasa, actuando sinérgicamente con RBX1 ⁹⁵.

En *Arabidopsis*, la pérdida de función de la proteína AXR1 (NEDD8/RUB E1) reduce la actividad del complejo SCF^{TIR1/AFB}, y la consecuente estabilización de las proteínas Aux/IAA, lo que provoca defectos severos en la sensibilidad a la hormona auxina ⁹⁶⁻⁹⁸. Además, las plántulas de *Arabidopsis* mutantes para AXR1 son resistentes a citoquinina, etileno, ABA y brasinoesteroides, y presentan defectos en la biosíntesis de etileno y en

la expresión de genes de respuesta a frío ⁹⁹⁻¹⁰¹, ya que en estas líneas está afectada la actividad de distintas CRLs.

Recientemente se ha identificado el fármaco anticancerígeno MLN4924 como un inhibidor de la nedilación de las culinas. Este fármaco está permitiendo un estudio más amplio de este proceso no solo en humanos sino también en otras especies como *Arabidopsis*. MLN4924 actúa uniéndose a NEDD8/RUB, y este dímero se une a su vez al sitio catalítico de la enzima E1 activadora, bloqueando así su actividad ¹⁰².

La regulación de la actividad CRL por la modificación con NEDD8/RUB es altamente dinámica. NEDD8/RUB es escindida de la culina mediante un complejo conocido como el signalosoma COP9 (CSN), en un proceso que se conoce como denedilación. El complejo CSN está altamente conservado en eucariotas, y consiste en 8 subunidades (CSN1-8). Se identificó originalmente en *Arabidopsis*, ya que sus subunidades pertenecen al loci "*Constitutive Photomorphogenic/De-etioliated/Fusca*" (*COP/DET/FUS*), ya citado anteriormente. Posteriormente fue identificado también en animales ^{103,104}. El complejo CSN está estructuralmente relacionado con la partícula reguladora 19S del complejo proteosoma 26S, así como con el factor 3 de iniciación de la traducción en eucariotas (eIF3). Se compone de seis subunidades con dominios PCI (Proteosoma, COP9, eIF3); que son CSN1-4, CSN7 y CSN8, además de dos subunidades con dominios MPN (Mpr1p, Pad1p N-terminal) que son CSN5 y CSN6 ¹⁰⁴. El complejo CSN se une a las CRLs interactuando con la culina y RBX1 mediante sus subunidades CSN2 y CSN4 ¹⁰⁵. La denedilación de la culina es catalizada por la subunidad CSN5. Sin embargo, CSN5 sólo presenta actividad isopeptidasa cuando se encuentra incorporada dentro del complejo CSN ¹⁰⁶.

Si, como se ha indicado antes, la nedilación de la culina favorece su actividad, se espera que el complejo CSN actúe como un regulador negativo de la función de los complejos CRL puesto que eliminan NEDD8/RUB ¹⁰⁵. Sin embargo, mutantes de *Arabidopsis* nulos para cualquiera de las subunidades CSN presentan el fenotipo propio de los mutantes para el locus *cop/det/fus* (hipocotilo corto, cotiledones abiertos en plántulas crecidas en oscuridad, acumulación de antocianinas y letalidad durante la etapa de plántula) ¹⁰⁴. Además, mutantes hipomorfos viables presentan defectos en rutas de señalización por auxinas ¹⁰⁷, JA-Ile ¹⁰⁸, giberelinas ¹⁰⁹ y SA ⁶³, así como defectos en la respuesta al frío ⁹⁹, regulación del ciclo celular ¹¹⁰ y desarrollo de la flor ¹¹¹. Todos estos fenotipos se podrían explicar debido a la estabilización de los sustratos de los complejos CRL, como resultado de una disminución de su funcionalidad en líneas con pérdida de función de CSN. Estos datos indican que la correcta funcionalidad de los complejos CRL requiere ciclos de nedilación y denedilación (mediada por CSN) de las culinas. Por otra parte, en levaduras y en animales se ha demostrado que los ciclos de nedilación/denedilación también sirve como mecanismo para proteger a la culina y a los adaptadores de sustrato de la autoubiquitinación ¹¹². Así, la nedilación/denedilación de las culinas es un proceso altamente dinámico y necesario para el óptimo desarrollo de la función de los complejos CRL ⁷.

Otro regulador clave de los ciclos de nedilación/denedilación de las culinas es "Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1" (CAND1). La proteína CAND1 fue identificada originalmente en células animales

¹¹³ y es capaz de unirse específicamente a culinas denediladas, formando una estructura con el subcomplejo catalítico culina-RBX1. CAND1 actúa como un regulador negativo de la actividad de los complejos CRL impidiendo su ensamblaje, ocupando tanto el sitio de unión de los adaptadores de sustrato como el sitio de nedilación de la culina ¹¹⁴. Sin embargo, se ha descrito que, al igual que en el caso de los mutantes *csn*, mutantes *cand1* presentan actividad reducida de distintas CRLs ¹¹⁵. La reducción en la actividad de estos complejos se debe a que los ciclos de ensamblaje y desensamblaje mediados por CAND1 son necesarios para su correcto funcionamiento. Se ha descrito que, para todos los tipos de CRL, existe una abundante cantidad de adaptadores de sustrato compitiendo para unirse al mismo núcleo catalítico culina-RBX1. El papel de CAND1 consistiría en desplazar a los adaptadores de sustrato, quedando el subcomplejo culina-RBX1 libre para la unión de nuevos adaptadores. Este "ciclo" aseguraría que los CRL puedan ajustarse a la gran variedad de sustratos a ubiquitinar, que varía dependiendo de las condiciones celulares ⁷.

Respecto a la regulación de la nedilación/denedilación de la culina que determina que CAND1 pueda o no unirse al complejo se sabe, gracias a experimentos *in vitro* en células animales ^{116,117}, que el estatus de nedilación está controlado por la presencia de adaptadores y de proteínas sustrato. Así, determinados complejos CRL se activan en presencia de un sustrato específico, y una vez éste ha sido ubiquitinado y degradado, el complejo CSN es capaz de denedilar a la culina, permitiendo la unión de CAND1 para desensamblar el complejo (figura 9). La presencia de más sustrato promueve la nedilación de la culina e inhibe la denedilación mediada por CSN, favoreciendo la actividad de los CRL ⁷.

Además de este mecanismo regulador basado en el control del ensamblaje de los complejos CRL, existe una regulación más específica que depende del control transcripcional y de la estabilidad de las proteínas que actúan como receptores de sustrato, así como de cambios en la localización de estas proteínas. En el caso de complejos CRL4 se sabe que existen variaciones en la estabilidad de la proteína adaptadora DDB1 ²⁰ y en su localización, que puede ser nuclear o citoplasmática en función de un estímulo dependiente de luz UV ¹¹⁸. Un caso similar ocurre para COP1; su localización subcelular depende de las condiciones lumínicas; en presencia de luz se localiza principalmente en el citoplasma y en oscuridad se acumula en el núcleo, donde promueve la degradación de HY5 y de reguladores positivos de la fotomorfogénesis ¹¹⁹.

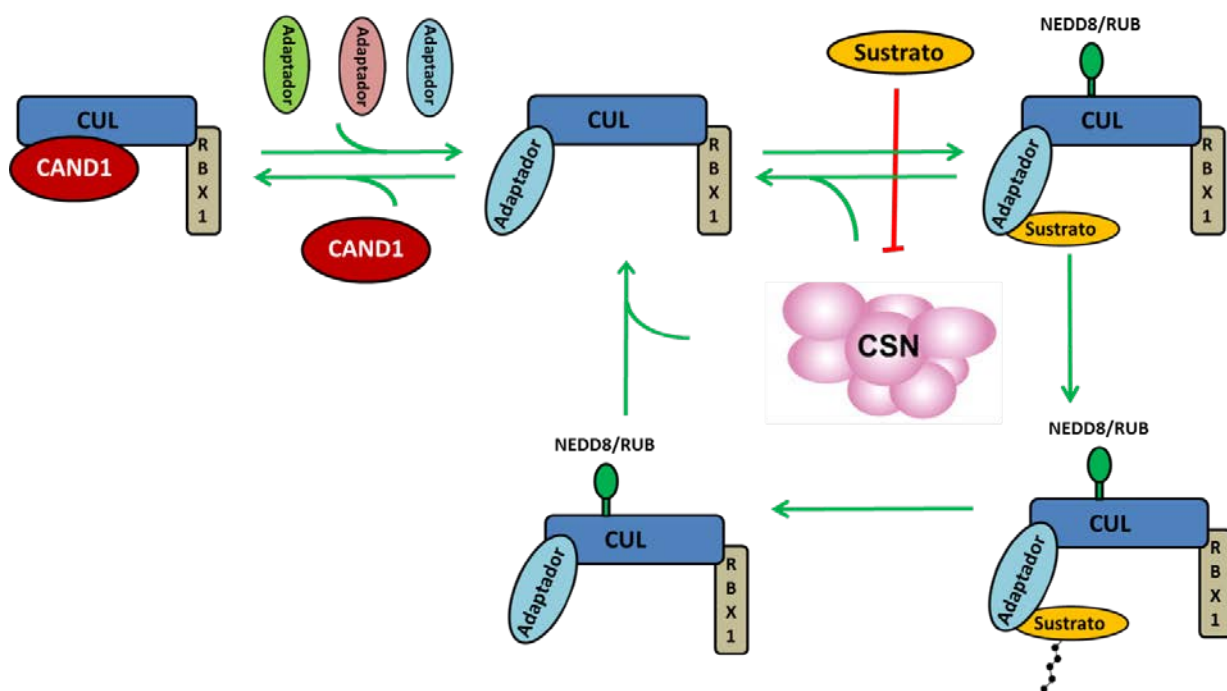


Figura 9. Regulación de los complejos CRL por CAND1 y NEDD8/RUB. CAND1 facilita el ensamblaje de CRLs con distintos adaptadores de sustrato. Una vez producido el ensamblaje, la subunidad CUL es nedilada. Si no hay sustrato disponible, CUL es rápidamente denedilada por el complejo CSN, uniéndose CAND1. Alternativamente, la presencia de sustrato promueve la actividad CRL inhibiendo la denedilación por CSN. Una vez que el sustrato es degradado por el proteosoma 26S, el complejo CSN denedila la culina, lo que conlleva el desensamblaje del complejo mediado por CAND1. Adaptado de ⁷.

2. PERCEPCIÓN Y RESPUESTAS AL ABA

La hormona ácido abscísico (ABA) es un ácido débil 15-C identificado a principios de los 60 como sustancia inhibidora del crecimiento acumulada en frutos maduros de algodón ("*abscisin II*") y en hojas de falso plátano inducidas fotoperiódicamente para la dormancia ("*dormin*")¹²⁰.

El ABA no es un mensajero endógeno exclusivo de plantas ya que algunos hongos fitopatógenos, bacterias y metazoos pueden también sintetizar ABA, existiendo dos mecanismos de síntesis: los hongos producen ABA a partir de farnesil pirofosfato, mientras que las plantas lo pueden sintetizar directamente desde carotenoides^{120,121}. Recientemente se ha descubierto que el ABA también se sintetiza en mamíferos, incluyendo humanos, describiéndose un posible papel terapéutico y profiláctico en modelos de ratones con aterosclerosis y diabetes¹²².

En plantas, las enzimas del metabolismo del ABA están reguladas por señales medioambientales, tales como sequía, salinidad, temperatura y luz, así como por otras hormonas, programas intrínsecos de desarrollo y ritmos circadianos¹²⁰. Así, la sequía y la salinidad provocan un incremento en los niveles de ABA, lo que irá acompañado de cambios en la expresión génica y de una respuesta fisiológica de adaptación a dichos estreses¹²³. Una limitación en el suplemento de agua, por tanto, genera un incremento en la biosíntesis de ABA en la planta, mientras que la humedad elevada activa rápidamente el catabolismo del ABA¹²⁰. Algunos genes reguladores del metabolismo del ABA están, así mismo, regulados por ABA.

El ABA se sintetiza inicialmente en tejidos vasculares a través de la actividad de enzimas tales como ABA2, AAo3 y NCED3 (expresadas específicamente en estos tejidos) y se transporta a tejidos diana. Este transporte ocurre a través del xilema y del floema, lo que permite un movimiento bidireccional (de la raíz al tallo y viceversa). Al tratarse de un ácido débil ($pK_a=4.8$), el ABA se encuentra principalmente en el compartimento apoplástico, pudiendo atravesar fácilmente la membrana plasmática celular. Sin embargo, se han descrito transportadores de ABA localizados en la membrana, como por ejemplo el importador tipo ABC AtABCG40 y el exportador AtABCG25^{120,122}. Estos transportadores cumplen un papel importante cuando la difusión libre de ABA se ve interrumpida en condiciones de estrés hídrico por variaciones en el pH¹²².

Bajo condiciones de sequía, el pH apoplástico aumenta, lo que resulta en una mayor retención apoplástica de ABA, permitiendo un transporte de la raíz al tallo, con el fin de reducir la transpiración en las hojas. Además de esta señalización a larga distancia, cambios en el potencial hídrico debidos a sequía en el suelo y en las raíces, pueden inducir la producción local de ABA en las hojas¹²¹.

El ABA no es solo importante para la respuesta a sequía, también se requiere para un correcto crecimiento y desarrollo de la planta en condiciones óptimas. El ABA está implicado en la maduración del embrión, dormición de la semilla, germinación, división y elongación celular, inducción de la floración, así como en respuestas a otros estreses como salinidad, frío, respuesta al ataque de patógenos y radiación UV¹²⁰.

2.1. ABA Y LA RESPUESTA A ESTRÉS

Las plantas son organismos sésiles y tienen que adaptar su crecimiento y desarrollo a los cambios medioambientales para asegurar su supervivencia. Cambios en la temperatura, la sequía y elevada salinidad del suelo son las principales causas que comprometen el correcto desarrollo de las plantas y la floración. Además, estos estreses limitan el crecimiento de la planta, lo que causa un grave impacto en la productividad de las cosechas a nivel agronómico. Las respuestas celulares a estos estreses incluyen el control de la homeostasis iónica, ajustes osmóticos mediante la síntesis de osmoprotectores, mantenimiento de la integridad de las membranas, y acumulación de metabolitos antioxidantes para contrarrestar el daño producido por las especies reactivas de oxígeno que se generan bajo estas condiciones ¹²⁴.

Una de las funciones principales del ABA durante el crecimiento vegetativo es mediar la respuesta a estreses medioambientales como sequía, salinidad y frío. Estos tres factores producen un estrés osmótico y oxidativo en la célula pero difieren en otros efectos, con lo cual, las respuestas que van a desencadenar en la célula no son idénticas. El ABA también regula la respuesta a hipoxia por inundación, lo que reduce los niveles de ABA en tejidos sumergidos y los incrementa en el tallo ¹²⁰.

A nivel de planta, un estrés hídrico moderado incrementará los niveles de ABA levemente, desencadenando la respuesta, lo que provoca el crecimiento de las raíces, que responden a gradientes de humedad por hidrotropismo positivo, e inhibe el crecimiento del tallo. Por el contrario, un estrés hídrico severo inhibe el crecimiento tanto del tallo como de la raíz, pero promueve la formación de raíces laterales ¹²⁰.

El flujo de agua a través de las membranas celulares para regular el crecimiento y la transpiración están controlados por las acuaporinas presentes en el tonoplasto y en la membrana plasmática. El contenido en acuaporinas está regulado por muchos factores, incluyendo cambios en el pH o en la concentración de Ca^{2+} , y ocurre tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional. El ABA regula postranscripcionalmente este proceso, induciendo la defosforilación de las acuaporinas, lo que reduce el flujo de agua ¹²⁰. Por otro lado, la expresión de la mayoría de acuaporinas se reprime por sequía y estrés salino, lo que limita la pérdida de agua y crea una señal hidráulica que puede inducir el cierre estomático en las partes aéreas.

El ABA también controla la acumulación de sustancias osmoprotectoras como pequeñas proteínas hidrofílicas, azúcares, prolina, etc., además de activar mecanismos de detoxificación que confieren tolerancia a estreses mediante la regulación del balance redox o mediante la modificación del transporte iónico para el restablecimiento de la homeostasis ¹²⁰.

En cuanto a los mecanismos moleculares que gobiernan esta respuesta, se ha observado que en periodos de sequía se activa la expresión de los genes de respuesta a ABA, que tienen elementos en su promotor de tipo ABRE (*“ABA-Responsive Element”*), o secuencias ricas en GC DRE (*“Dehydration-Responsive Element”*) presentes en elementos de respuesta a sequía. Estos elementos son reconocidos por factores de transcripción, principalmente por proteínas de tipo bZIP (*“Leucine Zipper Basic”*), aunque también existen

proteínas con dominio B3 o proteínas con homeodominio junto a una cremallera de leucina (HD-Zip) ¹²⁵. Además, muchos genes regulados por ABA contienen lugares de unión para factores de transcripción de la familia MYB y MYC. Miembros específicos de las familias de APETALA2 (AP2), NAC (“No apical meristem/Ataf/CipShaped cotyledons”), WRKY (W-box), bHLH (“Non MYC basic helix-loop-helix”) y dedos de Zn, también participan en algunas respuestas a ABA. Mediante estos mecanismos de regulación se controla la expresión de efectores de tolerancia al estrés por sequía, como las dehidrinas ¹²⁶.

Los estudios de expresión génica tras la aplicación de un estrés o tras un tratamiento con ABA revelan la existencia de dos picos de respuesta: una respuesta primaria y transitoria a las 3 horas, y una respuesta tardía y mantenida a partir de las 10 horas. Los genes de respuesta temprana codifican para proteínas reguladoras como factores de transcripción, kinasas y fosfatasa, y para genes *erd* (“early response to dehydration”). Muchos de los genes tardíos son: de respuesta a la deshidratación (*rd*), de respuesta al frío (*cor*), inducidos por alta temperatura (*lti*) e inducidos por baja temperatura (*kin*). La mayoría de estos últimos son proteínas similares a las LEA (“Late-Embryogenesis-Abundant”, proteínas sintetizadas durante los últimos estadios de la embriogénesis, y en tejidos vegetativos sometidos a condiciones de estrés), mientras que otras son proteasas, chaperoninas, enzimas del metabolismo del azúcar, canales iónicos y de agua, y enzimas que detoxifican especies reactivas de oxígeno ¹²⁰.

Por lo que se refiere al estrés generado por frío, se ha propuesto que la aclimatación y tolerancia a bajas temperaturas podría estar mediada por un incremento en los niveles de ABA endógeno ¹²⁷.

2.2. EL PAPEL DEL ABA DURANTE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

La germinación es uno de los procesos fisiológicos más influenciados por las hormonas vegetales. La regulación de la germinación y de la dormición de las semillas se lleva a cabo a través de acciones hormonales opuestas ¹²⁸. Así, el ABA tiene una función determinante en el mantenimiento de la dormición y en la inhibición de la germinación de las semillas. Diversos estudios han relacionado la reducción del contenido de ABA en la semilla durante la imbibición con un aumento en los porcentajes de germinación ¹²⁹. Durante la dormición se activa el catabolismo del ABA, ocasionando un descenso de la concentración de la hormona en el embrión ¹³⁰, lo que facilita la germinación. El etileno, por su parte, actúa estimulando la germinación ¹³¹, al igual que los brasinoesteroides ¹³². De todas las hormonas implicadas, las GAs tienen un papel fundamental en la germinación de las semillas de *Arabidopsis* ¹³³.

Durante la germinación, existe un efecto antagónico entre el ABA y las GAs en la movilización de las sustancias de reserva ¹³⁴. En las semillas, las sustancias de reserva van a estar almacenadas en el embrión (cotiledones) o en el tejido extraembrionario (endospermo), formando cuerpos intracelulares que contienen carbohidratos, lípidos, proteínas y compuestos inorgánicos. El hidrato de carbono de reserva más extendido en semillas es el almidón. La activación de α -amilasas cataliza la a movilización del almidón. Las GAs promueven la

expresión de α -amilasas mediante la síntesis del factor de transcripción GAMyb, que se une específicamente a elementos de respuesta a GAs¹³⁵ en los promotores de los genes regulados por esta hormona.

El papel inhibitorio del ABA durante la germinación de las semillas se lleva a cabo mediante cambios en la expresión génica regulados por factores de transcripción, como los de tipo bZIP, explicados anteriormente. Entre los factores de transcripción relacionados con la regulación de la germinación de este tipo se encuentra ABI5¹³⁶. Los factores de transcripción FUS3 ("Fusca 3") y LEC2 ("Leafy cotyledon 2") participan también en el desarrollo de las semillas¹³⁷. Por último, cabe destacar el papel del factor de transcripción de la familia AP2 ABI4 ("ABA insensitive 4") durante este proceso¹²⁰.

2.3. BASES MOLECULARES DE LA PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL ABA

El grupo del Dr. Sean Cutler caracterizó el compuesto Pirabactina como un agonista del ABA, e identificó mutantes de *Arabidopsis* insensibles a este regulador de crecimiento. Así clonaron el locus "*Pyrabactin Resistance 1*" (*PYR1*) y lo caracterizaron junto con homólogos de *PYR1* (PYLs o *PYR-like*). Las proteínas *PYR/PYLs* son inhibidores dependientes de ABA de las fosfatasa de tipo PP2C ("ABA-dependent inhibitors of Mg²⁺ and Mn²⁺ dependent serine/threonine phosphatases type 2C"). El genoma de *Arabidopsis* codifica para 76 PP2Cs¹³⁸. Ejemplos de PP2Cs son ABI1 ("Abscisic Acid Insensitive 1") y su homólogo ABI2, que reprimen las respuestas a ABA. Por su parte, un rastreo de mediante ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H) dirigido a la identificación de reguladores de ABI1 y ABI2 permitió el aislamiento de RCAR1 ("regulatory component of ABA receptor") o *PYL9*, como proteína interactora de ABI1 y ABI2¹²³.

Las proteínas de la familia *PYR/PYL/RCAR* han sido caracterizadas como receptores de ABA. La unión entre estas y una molécula de ABA constituye el subcomplejo central de la señalización por ABA¹²⁰. Los receptores *PYR/PYL/RCAR* presentan en su estructura un bolsillo altamente conservado que sirve para la unión con la molécula de ABA mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas¹³⁸.

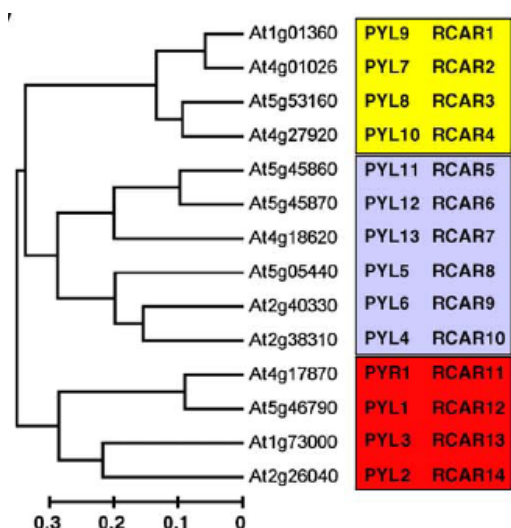


Figura 10. Árbol filogenético de los receptores de ABA en *Arabidopsis*. Las proteínas *PYR/PYL/RCAR* pueden agruparse en 3 subfamilias en base a la homología de sus secuencias¹²³.

Todos los miembros de la familia PYR/PYL/RCAR, con la excepción de PYL13, son capaces de unir una molécula de ABA. Esta unión deriva en un cambio conformacional que permite la formación de un complejo con una proteína PP2C, provocando la inactivación de esta última. Las PP2Cs defosforilan e inhiben la actividad de las kinasas SnRKs ("SNF-1 related kinases"). La inactivación de las PP2Cs como resultado de la formación del complejo PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C provoca la "liberación" de las SnRKs que activarán factores de transcripción, canales iónicos y otros factores implicados en la respuesta a ABA. Las PP2Cs también pueden defosforilar otras clases de kinasas, así como factores de transcripción o canales iónicos, lo que proporciona un mecanismo para restaurar las funciones celulares. También se sabe que proteínas fosfatasa de otras familias pueden inhibir la respuesta al ABA defosforilando alguno de estos factores ^{120,139}.

Los receptores PYR/PYL/RCAR pueden dividirse en monoméricos (PYL4-6 y PYL8-10) o dimericos (PYR1, PYL1, PYL2 y PYL3) en ausencia de ABA. Los dimericos se disocian tras la unión con ABA, exponiendo entonces la superficie que interacciona con las PP2Cs. Su afinidad por la molécula de ABA es entre 50 y 100 veces menor que la de las formas monoméricas. Los receptores monoméricos interaccionan débilmente con las PP2Cs en ausencia de ABA, pero la afinidad tanto de los receptores como de las PP2Cs incrementa en presencia de la hormona, lo que ha hecho que las fosfatasa también sean consideradas como co-receptores a pesar de no unir directamente la molécula de ABA ¹²⁰.

La inactivación de las PP2Cs tras el cambio conformacional que sufren los receptores PYR/PYL/RCAR al unirse la molécula de ABA produce en la mayoría de las células y tejidos vegetales la activación de las SnRKs. Sin embargo, existe especificidad de tejido y de estadio de desarrollo en cuanto al tipo de respuesta que se va a desencadenar, que dependerá del receptor, la kinasa, o el factor de transcripción que se active en cada caso concreto. La comparación de los patrones de expresión y fenotipos en mutantes de estos reguladores de la respuesta al ABA ha demostrado que ninguno de estos loci es específico de un solo tejido o estadio, y que la mayoría presentan redundancia funcional. Además, se sabe que algunos de estos reguladores centrales del ABA tienen un papel en el metabolismo del azúcar, en la respuesta a la salinidad y a otras hormonas ¹²⁰.

Diferentes familias de factores de transcripción regulan positiva o negativamente la respuesta a ABA. Entre los reguladores positivos de esta respuesta, que son además dianas principales de las SnRKs, están los factores tipo bZIP ABFs/AREBs, que reconocen elementos de respuesta a ABA en los promotores de los genes inducibles por dicha hormona ¹²². Los factores de transcripción tipo WRKY también están implicados en esta ruta de señalización. Genes implicados en la respuesta a ABA como *ABF2*, *ABF4*, *ABI4* o *ABI5* contienen secuencias en el promotor reconocidas por factores WRKYs. Así, WRKY63 regula positivamente la expresión de *ABF2*. Otro ejemplo sería WRKY40, que reconoce secuencias en el promotor de *ABI5*, e inhibe su expresión ¹²².

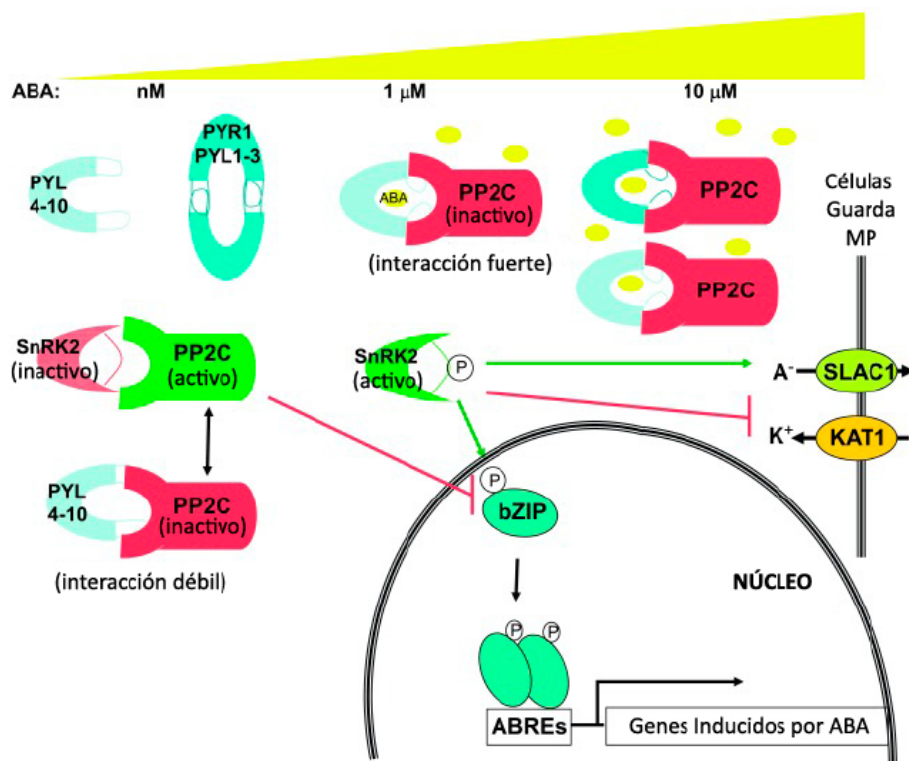


Figura 11. Modelo de la ruta de señalización por ABA. El gráfico muestra las interacciones que se producen en distintos rangos de concentraciones de la hormona. Los receptores monoméricos (PYL4-10) interactúan débilmente con las PP2Cs en ausencia de ABA, y fuertemente a bajas concentraciones de ABA, cuando la unión de la hormona produce un cambio en su conformación. Los receptores diméricos (PYR1/PYL1-3) tienen menos afinidad por ABA, por lo que se necesita más cantidad de hormona para su disociación, tras lo cual interactúan fuertemente con las PP2Cs. Todas las interacciones con PP2Cs provocan su inactivación y la reactivación de las SnRKs, que fosforilarán numerosas proteínas implicadas en la respuesta a ABA ¹²⁰.

Tras la comparación de transcriptomas regulados por ABA, se ha visto que entre el 1 y el 10% del genoma está regulado por ABA, existiendo aproximadamente el mismo número de genes inducidos por ABA que reprimidos en cada experimento. Entre los genes regulados por ABA se encuentran proteínas implicadas en la transmisión de la señal (PP2Cs del clado ABI, factores de transcripción, kinasas, proteínas de unión de lípidos, y varios transportadores), protectores de la desecación o proteínas específicas de la embriogénesis tardía. Entre los genes reprimidos se encuentran, entre otros, múltiples miembros de la familia de receptores PYR/PYL/RCAR, lo que permite la desensibilización de la respuesta y la restauración de la homeostasis ¹²⁰.

De manera independiente al control transcripcional, durante periodos de baja disponibilidad de agua se produce una reducción de la apertura estomática activada por ABA, con el fin de evitar la pérdida de agua por transpiración. El cierre estomático está producido por una pérdida de turgor en las células de guarda, que rodean al poro estomático. Esta pérdida de turgor se produce debido a un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, que activa diversos canales iónicos. La pérdida aniónica va a producir una despolarización de la

membrana que tendrá como consecuencia un intercambio osmótico (por activación de los canales de K^+) y una pérdida de agua y de turgor, causando el cierre estomático.

El control de los canales iónicos de estomas activado por ABA sucede rápidamente, a través de la proteína OST1 (SnRK2.6), que actúa como regulador positivo del cierre estomático. OST1 activa los canales iónicos SLAC1 e inhibe los canales catiónicos KAT1 por fosforilación. Por su parte, ABI1 y PP2Cs inhiben la actividad de OST1 y otras SnRKs. En presencia de ABA, la actividad fosfatasa de las PP2Cs está bloqueada, y como consecuencia, OST1 podrá fosforilar y activar los canales iónicos SLAC1, permitiendo el eflujo de aniones. OST1 interacciona con una NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática que produce H_2O_2 . El incremento de los niveles de H_2O_2 también estimula el cierre estomático, probablemente mediante la inactivación de ABI1 y ABI2, que son muy sensibles a las concentraciones de H_2O_2 y a la oxidación de alguno de sus residuos ¹²³.

Como se verá en las siguientes secciones, en este trabajo se descubre un nuevo mecanismo molecular modulador de la percepción y señalización de ABA en *Arabidopsis*, basado en la actividad de la proteína DDA1. DDA1 es un nuevo tipo de adaptador de sustrato de los complejos CRL4-CDD que reconoce a las proteínas PYR/PYL/RCAR y promueve su degradación, con el fin de permitir la desensibilización de la respuesta al ABA en plantas, por ejemplo, durante la germinación de las semillas o cuando las condiciones de estrés hídrico remiten.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A pesar de la relevancia funcional de los complejos CDD, tanto en animales como en plantas, se desconocen los mecanismos moleculares mediante los cuales dichos complejos regulan y/o facilitan la función de las E3 ligasas de tipo CRL4. Con el fin de entender mejor las bases moleculares de la actividad de los complejos CRL4-CDD y su papel en la regulación del desarrollo y la respuesta a estrés en plantas, nos hemos propuesto la caracterización de uno de sus componentes, la proteína DDA1. Para ello, sugerimos los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Caracterización bioquímica de los complejos que contienen a DDA1 en *Arabidopsis*.

Objetivo 2. Aislamiento y caracterización de proteínas que interactúan con DDA1.

Objetivo 3. Caracterización funcional de DDA1 en *Arabidopsis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. CEPAS BACTERIANAS

- *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) C58C1Rif^R (pGV2260)¹⁴⁰.
- *A. tumefaciens* C58C1Rif^R (pMP90)¹⁴¹.
- *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α ¹⁴².
- *E. coli* DB3.1 (Invitrogen).
- *E. coli* BL21pLysS (Novagen).

1.2. CEPAS DE LEVADURAS

- *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) AH109 (Clontech).
- *S. cerevisiae* Y187 (Clontech).

1.3. MATERIAL VEGETAL

- *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (L.) Heynh. ecotipo Columbia (Col-0).
- *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*).
- Mutantes de pérdida de función de *Arabidopsis* en fondo genético Col-0 (tabla 1).
- Líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* en fondo genético Col-0 (tabla 1).
- Suspensiones celulares PSB-D de *Arabidopsis* (L.) Heynh. ecotipo Landsberg *erecta* (Ler), derivados de MM2d

¹⁴³.

Nombre de la línea	Referencia	Observaciones	TAG
<i>cop10-4</i>	Suzuki et al. (2002) ¹⁴⁴		
<i>det1-1</i>	Peeper et al. (1994) ¹⁴⁵		
<i>cra1</i>	Fernandez-Arbaizar et al. (2012) ¹⁴⁶		
<i>hab1-1/abi1-2</i>	Saez et al. (2006) ¹⁴⁷		
<i>pyl8-1</i>	Antoni et al. (2013) ¹⁴⁸		
<i>cop9-1</i>	Wei and Deng, (1992) ¹⁴⁹		
<i>ddb1a</i>	TAIR	SALK_038757	
amiRNA-DDA1	Este trabajo	pGWB2:amiRNADDA1	
oe3HA-PYL8/ <i>pyl8-1</i>	Antoni et al. (2013) ¹⁴⁸		HA
oeFLAG-COP10	Yanagawa et al. (2004) ²⁸		FLAG
oeHAB1	Saez et al. (2004) ¹⁵⁰		
oeDET1-GFP	Schroeder et al. (2002) ²¹		GFP
oeFLAG-DDB1b	Lee et al. (2008) ²⁵		FLAG
oeTAP-COP1	Rubio et al. (2005) ⁸⁰		TAP
oeFLAG-CAND1/ <i>cand1-1</i>	Feng et al. (2004) ¹¹⁵		FLAG
oeDDA1-GFP	Este trabajo	pGWB5:DDA1	GFP
iDDA1	Cedida por Marisa Irigoyen	pMDC7:DDA1	
pDDA1::DDA1-GFP	Este trabajo	pGWB4:DDA1	GFP
pDDA1::DDA1-GUS	Este trabajo	pGWB3:DDA1	GUS
oeDDA1-GFP/ oeFLAG-COP10	Este trabajo	CRUCE	
oe3HA-PYL8/ <i>pyl8-1</i> /oeDDA1-GFP	Este trabajo	CRUCE	
oe3HA-PYL8/ <i>pyl8-1</i> / <i>cop10-4</i>	Este trabajo	CRUCE	

Tabla 1: Líneas de Arabidopsis mutantes y transgénicas usadas en este estudio.

2. MÉTODOS DE CLONAJE

2.1. GENERACIÓN DE VECTORES EN PDONR207 Y PDONR221

Para generar vectores de expresión en planta, en cultivos celulares, en levadura y en bacteria se utilizó, en la mayoría de los casos, la tecnología "Gateway" de Life Technologies, usando como plásmido de entrada pDONR207 gentamicina^R en la mayoría de los casos y pDONR221 kanamicina^R para la generación de vectores de expresión en cultivos celulares PSB-D de *Arabidopsis*.

Los productos de interés fueron amplificados por PCR ¹⁵¹, con la enzima "Pwo DNA polymerase" (Roche) y con cebadores específicos para cada amplicón (tabla 3), que además llevaban a ambos extremos los sitios de recombinación que reconoce el bacteriófago λ : *attB1* (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACAAA-(inserto)-3') y *attB2* (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTA-(inserto)-3'). Los productos de PCR obtenidos se separaron en geles de agarosa al 1% con SYBR (Invitrogen) y se purificaron con el kit de extracción de DNA en gel "QIAGEN QIAquick® Gel extraction kit". El clonaje se realizó según las especificaciones del fabricante, usando la enzima "Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix" (Life Technologies). Los plásmidos generados se transformaron en *E.*

coli DH5 α . Las bacterias con el plásmido de interés se seleccionaron con el antibiótico correspondiente, se extrajeron con el kit de QIAGEN "QIAprep® Mini-Prep kit", y se analizaron mediante digestión analítica y secuenciación.

2.2. GENERACIÓN DE VECTORES PENTR™

Las construcciones utilizadas se generaron mediante el sistema "Gateway pENTR™ Directional TOPO® Cloning kit" (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante (tabla 2). La amplificación se llevó a cabo con cebadores específicos, que se indican en la tabla 3.

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones	Método de clonaje
DDA1	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
DDA1 (sin STOP)	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
DDA1 (sin STOP)	pDONR 221	Kanamicina		Enzima BP
DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
DDB1b	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
DDB1a (sin STOP)	pDONR 207	Gentamicina	Cedido por V. Rubio	Enzima BP
DDB1b (sin STOP)	pDONR 207	Gentamicina	Cedido por V. Rubio	Enzima BP
DET1	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
COP10	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
DCAF	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
BPA DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
BPB DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
BPA+BPB DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
BPC DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
BPB+BPC DDB1a	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
PYL8	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
amiRNA DDA1	pDONR 207	Gentamicina		Enzima BP
pDDA1::DDA1 (sin STOP)	pENTR™	Kanamicina		TOPO
pEN-L4-2-R1	pENTR™	Kanamicina	http://gateway.psb.ugent.be	
pEN-R2-GStag-L3	pENTR™	Kanamicina		
pEN-R2-Gsrhino-L3	pENTR™	Kanamicina		

Tabla 2: vectores pDONR207, pDONR221 y pENTR™

Nombre	Secuencia	Observaciones
1 DDA1 BF	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAAATAGTGAGCAACTTTAAGTCGA	pDONR
2 DDA1BR sin stop	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATAAGCCCTGAGTAGATGAAGAAGAAGACG	pDONR
3 DDA1 BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTATAAGCCCTGAGTAGATGAAGAAGAAGACG	pDONR
4 DDB1a BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGAGCTCATGGAAGTACG	pDONR
5 DDB1a BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGTGAAGCCTAGTGAGTTC	pDONR
6 DDB1b BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGAGCGTATGGAAGTACG	pDONR
7 DDB1b BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGTGAAGCCTAGTGAGTTC	pDONR
8 DET1 BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGTTACAAGCGGTAAACGTCACCG	pDONR
9 DET1 BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATCGCCTAAAATGGATATTGACG	pDONR
10 COP10 BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGATGACACCTGGCGGAA	pDONR
11 COP10 BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTACTGGCAAATCGCAATG	pDONR
12 DCAF BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGATGCAGATCCAAAGCC	pDONR
13 DCAF BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTACAATTCACCTTCTGCAG	pDONR
14 BPAa BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACTACTCGTGCCTGGCA	pDONR
15 BPAa BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGGCCCAAGTTGATATACCT	pDONR
16 BPBa BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATCAATGAACAGGCGTCTG	pDONR
17 BPBa BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGCTTCTGAATATCATCAAT	pDONR
18 BPCa 1 BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATTGTCGACTTTTGTGTAG	pDONR
19 BPCa BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAGGAAGTGAAGCTATTACTCC	pDONR
20 BPCa 2 BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCACATACGTACTATTCTCCTC	pDONR
21 amiRNA DDA1 BF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCCAACACACGCTCGGACG	pDONR
22 amiRNA DDA1 BR	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCATGGCGATGCCTTAAATAAAG	pDONR
23 pDDA1::DDA1 F	CACCTTGAGGCCAACTAAGTTCACC	pENTR™
24 pDDA1::DDA1 R (sin stop)	TCCGCCACCTCCTAAGCCCTGAGTAGATGAAG	pENTR™

Tabla 3: cebadores usados para clonar fragmentos en pDONR y pENTR™

2.3. GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN EN PLANTA, EN LEVADURAS Y EN BACTERIA.

2.3.1. CONSTRUCCIONES BINARIAS PARA LA TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE *ARABIDOPSIS*

Para generar vectores de expresión en planta se utilizó el sistema "Gateway" de Life Technologies, usando como plásmido de entrada los plásmidos pDONR207 indicados en la tabla 2 (excepto en el caso de pGWB4:pDDA1::DDA1 y pGWB3:pDDA1::DDA1, donde se utilizó como plásmido de entrada pENTR™/SD-TOPO®). El clonaje se realizó según las especificaciones del fabricante, usando la enzima "Gateway® LR Clonase™ II" (Life Technologies). Los plásmidos generados (tabla 4) se transformaron en *E. coli* DH5α. Las bacterias con el plásmido de interés se seleccionaron con el antibiótico correspondiente, se extrajeron con el kit de QIAGEN "QIAprep® Mini-Prep kit", y se analizaron mediante digestión analítica y secuenciación.

Se usaron los vectores pGWB2, pGWB3, pGWB4, pGWB5¹⁵² para la transformación de plantas de *Arabidopsis*.

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones	Método de clonaje
35S::amiRNA DDA1	pGWB2	Kanamicina		Gateway
35S::DDA1-GFP	pGWB5	Kanamicina		Gateway
pDDA1::DDA1-GFP	pGWB4	Kanamicina		Gateway
pDDA1::DDA1-GUS	pGWB3	Kanamicina		Gateway
35S::3HA-PYL8	Alligator2	Spectinomicona	Cedido por P. Rodríguez	

Tabla 4: construcciones binarias usadas para la transformación estable de *Arabidopsis*.

2.3.2. CONSTRUCCIONES PARA ENSAYOS BiFC EN *N. benthamiana*

Para realizar los experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) se generaron vectores de destino pBiFC para la expresión de las proteínas de interés fusionadas al fragmento N-terminal o C-terminal de la E-YFP (proteína fluorescente amarilla) de Clontech, bajo el control de promotor 35S¹⁵³ (tabla 5). Así, se utilizaron 4 plásmidos pBiFC:

-pBiFC1: Sitio Gateway + Fragmento N-terminal de la YFP.

-pBiFC2: Fragmento N-terminal de la YFP + Sitio Gateway.

-pBiFC3: Fragmento C-terminal de la YFP + Sitio Gateway.

-pBiFC4: Sitio Gateway + Fragmento C-terminal de la YFP.

Se utilizaron, también para este ensayo, plásmidos del sistema pYFC43 y pYFN43¹⁵⁴, compatibles los plásmidos del sistema de Clontech. Estas construcciones fueron cedidas por el laboratorio del Doctor Pedro Rodríguez (IBMCP-CSIC, Valencia).

Construcción	Selección	Observaciones	Método de clonaje
pBIF1			
DDA1:YFPN	Spectinomicina		Gateway
DDB1a:YFPN	Spectinomicina		Gateway
pBIF2			
YFPN:PYL8	Spectinomicina		Gateway
pBIF3			
YFPC:PYL8	Spectinomicina		Gateway
YFPC:COP10	Spectinomicina		Gateway
YFPC:DET1	Spectinomicina		Gateway
pBIF4			
DDA1:YFPC	Spectinomicina		Gateway
DDB1a:YFPC	Spectinomicina		Gateway
DDB1b:YFPC	Spectinomicina		Gateway
pYFN43			
YFPN:PYL4	Kanamicina	Cedido por P. Rodríguez	
YFPN:PYL9	Kanamicina		
pYFC43			
YFPC:PYR1	Kanamicina	Cedidos por P. Rodríguez	
YFPC:PYL1	Kanamicina		
YFPC:PYL2	Kanamicina		
YFPC:PYL4	Kanamicina		
YFPC:PYL5	Kanamicina		
YFPC:PYL6	Kanamicina		
YFPC:PYL7	Kanamicina		
YFPC:PYL9	Kanamicina		
YFPC:PYL10	Kanamicina		

Tabla 5: Construcciones usadas para ensayos de BiFC en *Benthamiana*.

2.3.3. CONSTRUCCIONES PARA DOBLE HIBRIDO EN LEVADURAS (Y2H)

Para los ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H) se utilizaron los vectores pGADT7 y pGBKT7 de Clontech modificados mediante la inserción del cassette *ccdB* Gateway (cedidos por la Doctora Marta Boter, CNB, CSIC). Los genes clonados en estos vectores se expresan fusionados al dominio de activación GAL4 (AD) en pGADT7 o al dominio de unión GAL4 (BD) en pGBKT7, ambos bajo el control del promotor T7 (tabla 6).

Construcción	Selección	Observaciones	Método de clonaje
pGADT7 (dominio de activación GAL4, presa)			
DDA1	Ampicilina		Gateway
DDB1a	Ampicilina		Gateway
DDB1b	Ampicilina		Gateway
DET1	Ampicilina		Gateway
COP10	Ampicilina		Gateway
DCAF	Ampicilina		Gateway
BPA	Ampicilina		Gateway
BPA DDB1a	Ampicilina		Gateway
BPB DDB1a	Ampicilina		Gateway
BPA+BPB DDB1a	Ampicilina		Gateway
BPC DDB1a	Ampicilina		Gateway
BPB+BPC DDB1a	Ampicilina		Gateway
BPA DDB1b	Ampicilina		Gateway
BPB DDB1b	Ampicilina		Gateway
BPA+BPB DDB1b	Ampicilina		Gateway
BPC DDB1b	Ampicilina		Gateway
BPB+BPC DDB1b	Ampicilina		Gateway
PYL4 84-207	Ampicilina	Purificado de la librería de M. I. Puga, conteniendo del aa 84 al 207 de PYL4	
PYL9 75-189	Ampicilina	Purificado de la librería de M. I. Puga, conteniendo del aa 75 al 189 de PYL9	
pACT2 (dominio de activación GAL4, presa)			
PYL5	Ampicilina		
Δ NPYL6	Ampicilina	Cedidos por P. Rodríguez	
PYL8	Ampicilina		
PGBKT7 (dominio de unión GAL4, cebo)			
DDA1	Kanamicina		Gateway
DDB1a	Kanamicina		Gateway
DDB1b	Kanamicina		Gateway
DET1	Kanamicina		Gateway
COP10	Kanamicina		Gateway
DCAF	Kanamicina		Gateway

Tabla 6: Construcciones usadas para ensayos tipo Y2H en levaduras

2.3.4. CONSTRUCCIONES PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. coli*

Las construcciones para la purificación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (cepa BL21 pLysS) fueron cedidas por el laboratorio del Doctor Pedro Rodríguez (IBMCP-CSIC, Valencia) (tabla 7).

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones
HIS-PYL8-HIS	pET28a	Kanamicina	Cedidos por P. Rodríguez
HIS-PYL9-HIS	pET28a	Kanamicina	
HIS-PYL4-HIS	pETM11	Kanamicina	
HIS-PYL5-HIS	pETM11	Kanamicina	

Tabla 7: Construcciones usadas para expresión y purificación de proteínas a partir de células de *E. coli*.

2.4. GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN EN SUSPENSIONES CELULARES DE *ARABIDOPSIS* PSB-D.

Para la expresión de proteínas fusionadas al epítipo TAP en cultivos celulares de *Arabidopsis* PSB-D, se utilizó como vector de entrada el plásmido pDONR221:DDA1 (sin STOP). Se usó la tecnología "standard multisite Gateway LR reaction" para generar los plásmidos 35S::DDA1-mTAP y 35S::DDA1-Gsrhino, que llevan la fusión TAP en el extremo C-terminal de DDA1. En el caso de 35S::DDA1-mTAP dicha fusión consiste en dos repeticiones de la proteína G, un sitio de corte para la proteasa TEV (del virus del mosaico del tabaco) y un sitio de unión a la estreptavidina ("Streptavidin Binding Peptide", SBP). 35S::DDA1-GSrino contiene los mismos epítopos separados por un sitio de corte de la proteasa 3C de rinovirus de humano.

Para la generación de estos vectores se utilizaron las siguientes combinaciones, tal y como esta descrito en ^{155,156}:

35S::DDA1-mTAP: plásmidos pKCTAP + pEN-L4-2-R1 (promotor 35S) + pEN-R2-GStag-L3 (Gs TAP tag) + pDONR221:DDA1 (sin stop).

35S::DDA1-Gsrhino: plásmidos pKCTAP + pEN-L4-2-R1 (promotor 35S) + pEN-R2-GSrino-L3 (Gs TAP tag) + pDONR221:DDA1 (sin stop).

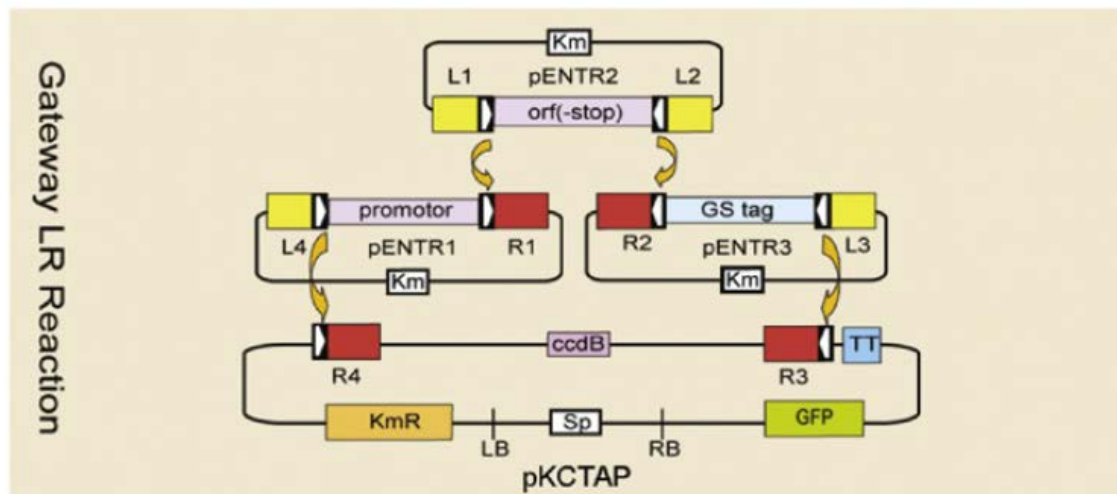


Figura 12: Esquema de la estrategia de clonaje de las construcciones TAP tag. TT: terminador de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor 35S; *accB*: gen tóxico para selección negativa de plásmidos no recombinados; KmR: gen de resistencia a la kanamicina; GFP: proteína fluorescente verde; LB y RB: bordes izquierdo y derecho del T-DNA ¹⁵⁷.

Todos los vectores usados están disponibles en <http://gateway.psb.ugent.be>.

Los vectores pKCTAP tienen resistencia a kanamicina y un cassette de expresión de GFP.

Los plásmidos se transformaron en *E. coli* DH5 α , y se seleccionaron por su resistencia a espectinomicina. Las bacterias con el plásmido de interés se seleccionaron con el antibiótico correspondiente, se extrajeron con el kit de QIAGEN "QIAprep® Mini-Prep kit", y se analizaron mediante digestión analítica y secuenciación. Posteriormente se transformaron en cepas de *A. tumefaciens* C58C1 pMP90, y las colonias de interés se seleccionaron por su resistencia a espectinomicina y gentamicina.

2.5. GENERACIÓN DE VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DE UN miRNA ARTIFICIAL DE DDA1 (amiRNA DDA1) EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS.

Para la generación de una línea de miRNA de DDA1 en *Arabidopsis*, se utilizó la aplicación web "WMD3-Web MicroRNA Designer" que proporciona 4 secuencias de cebadores diseñados para "fabricar" un micro RNA artificial (que será específico para la secuencia proporcionada) a partir del precursor del miR319a de *Arabidopsis*, mediante PCR.

El fragmento específico de DDA1 que reconoce este miRNA artificial (amiRNA) es GTGTGTACATAACATTAAT. Los cebadores diseñados para generarlo se muestran en la tabla 8.

	Nombre	Secuencia
25	cebador I miR-s	GATTTAATGTTATGTACACACGCTCTCTCTTTTGTATTCC
26	cebador II miR-a	AGCGTGTGTACATAACATTAAATCAAAGAGAATCAATGA
27	cebador III miR*s	GAGCATGTGTACATATCATTAAATTCACAGGTCGTGATATG
28	cebador IV miR*a	GAATTAATGATATGTACACATGCTCTACATATATATTCT
29	cebador A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
30	cebador B	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG

Tabla 8: cebadores usados para generar un amiRNA específico para DDA1 de *Arabidopsis*.

Como molde para las PCRs se utilizó el plásmido pRS300 (cedido por el laboratorio del Dr. Crisanto Gutierrez, CBMSO), que contiene el precursor del miR319a.

La estrategia de clonaje se llevó a cabo tal y como se indica en la figura 13.

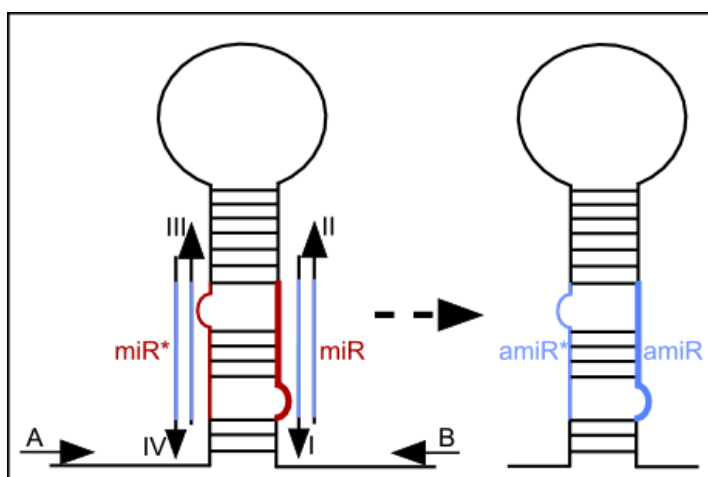


Figura 13: Estrategia para generar amiRNAs a partir del precursor del miR319a (<http://wmd3.weigelworld.org/>).

I: cebador I miR-s

II: cebador II miR-a

III: cebador III miR*s

IV: cebador IV miR*a

A y B: son específicos del plásmido pRS300. Se localizan fuera del sitio de clonaje del pBSK.

Las PCRs que se llevaron a cabo se resumen en la tabla 9.

	Cebador sentido	Cebador antisentido	molde
a	A	IV	pRS300
b	III	II	pRS300
c	I	B	pRS300
d	A	B	a + b + c
e	amiRNA DDA1 BF	amiRNA DDA1 BR	d

Tabla 9: PCRs a realizar para generar un miRNA artificial de Arabidopsis (<http://wmd3.weigelworld.org/>).

Se generaron además los cebadores amiRNA DDA1 BF y BR (tabla 3, cebadores 21 y 22) para poder clonar el fragmento amplificado en un plásmido pDONR207 y posteriormente en un vector pGWB2 siguiendo la tecnología "Gateway".

Los plásmidos se transformaron en *E. coli* DH5 α . Las bacterias con el plásmido de interés se seleccionaron con el antibiótico correspondiente, se extrajeron con el kit de QIAGEN "QIAprep[®] Mini-Prep kit", y se analizaron mediante digestión analítica y secuenciación. Posteriormente se transformaron en cepas de *A. tumefaciens* C58C1 pGV2260.

3. CONDICIONES DE CULTIVO Y TRANSFORMACIÓN

3.1. CULTIVO Y TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

Para el crecimiento de bacterias (*E. coli* DH5 α , BL21 y *A. tumefaciens*) se utilizó el medio de cultivo LB líquido o sólido (10 g/L Triptona, 5g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl, pH 7), con los antibióticos correspondientes en cada caso (ampicilina 100 μ g/mL, gentamicina 50 μ g/mL, kanamicina 50 μ g/mL, rifampicina 50 μ g/mL y espectinomicina 50 μ g/mL). La temperatura de crecimiento fue 37°C para *E. coli* y 28°C para *A. tumefaciens*, y el crecimiento en medio líquido se realizó con una agitación de 250 rpm (revoluciones por minuto).

La transformación de células competentes de *E. coli* se llevó a cabo mediante choque térmico¹⁵¹ o mediante electroporación¹⁵⁸. Para la transformación de *A. tumefaciens* se utilizó el protocolo descrito en¹⁵⁹.

Para el cultivo de *S. cerevisiae* se utilizaron los medios YPD (cepas Y187: 20 g/L peptona/triptona, 10 g/L extracto de levadura, 40% glucose, pH 5.8) e YPAD (cepas AH109: igual composición que el medio YPD, con 40 mg/L adenina). El medio YSD (6.7 g/L de base nitrogenada, más el drop-out (*DO supplement*) correspondiente) se utilizó para la selección de transformantes:

YSD-L: : Base nitrogenada con -Leu/-Trp *DO Supplement* (Clontech) y 0.002% Triptófano.

YSD-W: Base nitrogenada con -Leu/-Trp *DO Supplement* (Clontech) y 0.002% Leucina.

YSD-WL: Base nitrogenada con -Leu/-Trp *DO Supplement* (Clontech).

YSD-WLH: Base nitrogenada con -Leu/-Trp/-His *DO Supplement* (Clontech).

YSD-WLA: Base nitrogenada con -Ade/-His/-Leu/-Trp *DO Supplement* (Clontech) y 0.002% histidina.

YSD-WLHA: Base nitrogenada con -Ade/-His/-Leu/-Trp *DO Supplement* (Clontech).

En los medios sin histidina (YSD-WLH e YSD-WLHA) se añadieron, como complemento extra para la selección, diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), que es un inhibidor del producto del gen *HIS3*, implicado en la biosíntesis de histidina en *S. cerevisiae*.

La temperatura de crecimiento fue de 30°C y la agitación en caso de medio líquido fue de 250 rpm.

Para la generación de células competentes de *S. cerevisiae* y su posterior transformación se siguió el protocolo basado en el uso de acetato de litio, descrito en "Matchmaker Gal4 Two-Hybrid User Manual" (Clontech Laboratories, Inc.). Las colonias co-trasformadas con los vectores pGADT7 y pGBKT7 se seleccionaron en medio YSD-WL. Las colonias transformadas con el plásmido pGBKT7:DDA1 se seleccionaron en medio YSD-W.

3.2. CULTIVO, TRANSFORMACIÓN Y CRUCES DE PLANTAS DE *ARABIDOPSIS*

Para el crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis*, las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio (v/v) y Tween 0.01% durante un tiempo máximo de 7 minutos, tras lo cual se lavaron varias veces con agua destilada y se sembraron en medio "Murashige y Skoog" o MS (Duchefa) con 1% de sacarosa y 0.8% de bactoagar. Una vez sembradas las semillas se estratificaron en placa a 4°C y en oscuridad durante 2 días, tras los cuales se pasaron a cámaras de cultivo en condiciones de día largo (16h luz/ 8h oscuridad), a 22°C y con un 60% de humedad relativa.

Los tratamientos específicos a los que se sometieron las semillas y las plántulas se indicarán más adelante.

Para la obtención de semillas y para realizar cruzamientos, las plántulas de 2 semanas se trasplantaron desde las placas a una mezcla de tierra con vermiculita (en una relación 3:1) para su crecimiento en el invernadero a 22°C, en condiciones de día largo.

Los cruzamientos para obtener las líneas de *Arabidopsis* oeDDA1-GFP/oeFLAG-COP10, oe3HA-PYL8/*pyl8-1*/oeDDA1-GFP y oe3HA-PYL8/*pyl8-1*/cop10-4 se realizaron emasculando las flores antes de que maduraran las anteras del receptor, y frotando su estigma con uno o varios estambres maduros del polinizador. La segregación de la progenie se analizó, según el caso, mediante la resistencia al antibiótico adecuado (higromicina 50 µg/mL para oeDDA1-GFP, PPT (Phosphinothricin) 50 µg/mL para la mutación *pyl8-1* y para FLAG-COP10), mediante la fluorescencia en la semilla (para oe3HA-PYL8) o mediante PCR y secuenciación (para la mutación *cop10-4*).

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante la infiltración por inmersión de las inflorescencias durante 10 minutos en una solución de MS (3.67 g de MS por cada 1.5 L de agua destilada), 5% de sacarosa, 0.02% del agente surfactante Silwet L77, y *A. tumefaciens* con la construcción de interés ¹⁶⁰. Las semillas transformadas obtenidas se seleccionaron en placas de medio MS con el antibiótico correspondiente y 50 µg/mL de carbenicilina para evitar el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Para los ensayos de BiFC y algunos experimentos de CoIP, se usaron plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas, cuyas hojas se infiltraron con suspensiones de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores correspondientes, siguiendo el protocolo descrito por ¹⁶¹. Además, se utilizó el vector p19, que suprime el silenciamiento génico de las construcciones infiltradas ¹⁶². Tras tres días, las hojas fueron usadas para la observación con el microscopio confocal o fueron recogidas y congeladas hasta su posterior utilización.

3.3. CULTIVO Y TRANSFORMACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE *ARABIDOPSIS*

El cultivo de suspensiones celulares de *Arabidopsis* PSB-D se realizó en medio MSMO (4.43 g/L MS-minimal organics Sigma, 30 g/L glucosa, 0.5 mg/L NAA, 0.05 mg/L kinetina, pH 5.7), en oscuridad y en agitación constante a 130 rpm. La temperatura de crecimiento fue de 25 grados. Para el mantenimiento de las líneas generadas también se utilizó el cultivo en medio MSMO sólido (MSMO suplementado con 0.8% de agar).

Para la transformación de estas células, se co-cultivaron durante 72 horas las suspensiones celulares y los cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 pMP90 con la construcción correspondiente, tal y como está descrito en ¹⁵⁶. La selección de las células transformadas se llevó a cabo mediante el cultivo en medio MSMO con los antibióticos carbenicilina (500 µg/mL) y vancomicina (500 µg/mL) durante 3 semanas y a concentraciones decrecientes de kanamicina (50 µg/mL durante las 3 primeras semanas y 25 µg/mL durante la cuarta semana).

Los cultivos de suspensiones celulares en medio líquido se refrescaron con medio nuevo cada 7 días. Para los ensayos de TAP y CoIP se recogió material a los 3 días de refrescar el medio.

4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN *ARABIDOPSIS*

4.1. EXTRACCIÓN DE DNA DE PLANTAS DE *ARABIDOPSIS*

Para la extracción de DNA de plantas de *Arabidopsis* se utilizaron hojas de roseta de planta adulta (3 o 4 semanas). Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por ¹⁶³.

4.2. ANÁLISIS DEL DNA EXTRAÍDO MEDIANTE PCR

El análisis del DNA mediante PCR ¹⁵¹ se usó para la selección de las plantas mutantes *ddb1a* (SALK-038757) y para la selección de las portadoras de la mutación *cop10-4* en los cruces *oe3HA-PYL8/pyl8-1/cop10-4*. Para la amplificación se utilizó la enzima TAQ (Roche) y los cebadores que se detallan en la tabla 10.

	Nombre	Secuencia	Observaciones
31	Genómico <i>ddb1a</i> F	TGAGAGACCATAACCATCTTCTAGC	
32	Genómico <i>ddb1a</i> R	GATGTGCAAAGCCCACTATTG	
33	SALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
34	<i>cop10-4</i> F	CCTGATTGCTCAGCTGGTCC	
35	<i>cop10-4</i> R	CAGCTAAATCAGTAAAGCTCC	

Tabla 10: cebadores usados para genotipar plantas mutantes de *Arabidopsis* para los genes *ddb1a* y *cop10-4*.

En el caso de la línea mutante para DDB1a, el T-DNA está insertado en el quinto intrón, lo que va a generar una línea sin expresión para este transcrito ²⁰. Para su selección, se realizó la amplificación con diferentes combinaciones de cebadores: 31 + 32 para amplificar el gen nativo y 31 + SALK (33) para amplificar el T-DNA. Se utilizaron geles horizontales de agarosa (1%) con "SYBR safe DNA gel stain" (Invitrogen) en tampón TAE (Tris-acetato 50 mM, EDTA 1 mM), para analizar el resultado.

cop10-4 ¹⁴⁴, sin embargo, tiene una mutación puntual en el primer intrón que afecta al sitio de procesamiento, generando una proteína truncada. Para la selección, los productos de PCR obtenidos con los cebadores 34 y 35 se separaron en geles de agarosa al 1% con SYBR (Invitrogen), y la banda resultante se cortó, se purificó con "Qiaquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN) y se analizó mediante secuenciación. Las secuencias fueron visualizadas con el programa ChromasPro, y para su edición y análisis se utilizó JustBio (<http://www.justbio.com>).

4.3. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE RNA DE PLÁNTULAS DE *ARABIDOPSIS*

Para analizar la expresión de DDA1 en líneas oeDDA1-GFP, amiRNA-DDA1 y Col, se extrajo (por triplicado) RNA total de 15 o 20 plántulas de 7 días con el kit "RNeasy plant mini kit" (Qiagen), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la digestión del posible DNA presente en las muestras extraídas con el kit "Ambion® TURBO DNA-free™" (Life Technologies). El RNA obtenido se cuantificó en el NANODROP. El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando el kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit" (Applied Biosystems). Se usaron 10 µL de este cDNA diluido 1:10 en agua, para la reacción de qRT-PCR con la enzima "FastStart Universal SYBR Green Master Mix" (Roche), y con los cebadores que se indican en la tabla 11.

	Nombre	Secuencia	Observaciones
36	DDA1-RT F	CCCTCCGATCCTTCTAATCC	
37	DDA1-RT R	GCTGCGTATAAGAATGTTTTTCAC	
38	ACTINA8-RT F	GGTACTGGAATGGTTAAGGC	Control interno (Actina 8)
39	ACTINA8-RT R	GTCCAACACAATACCGGTTG	

Tabla 11: cebadores usados para analizar la expresión del gen *DDA1* de *Arabidopsis* y *Actina8* como control.

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos, en un termociclador "7300 Real-Time PCR system" (Applied Biosystems) y los resultados fueron analizados con el programa 7300. Las condiciones de PCR fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

Para el análisis de la expresión de *3HA-PYL8* en plántulas *oe3HA-PYL8/pyl8-1/oeDDA1-GFP* y *oe3HA-PYL8/pyl8-1*, plántulas crecidas en medio sólido durante 7 días fueron transferidas durante 1 hora a medio MS líquido con cicloheximida (CLX) (Sigma-Aldrich) a 50 µM y suplementado o no con 50 µM de ABA (Sigma-Aldrich). Se recogieron también plántulas sin tratar como control (tiempo 0). La extracción y análisis del RNA se realizó tal y como se ha descrito anteriormente, usando en este caso los cebadores que se indican en la tabla 12.

	Nombre	Secuencia	Observaciones
40	HA-RT F	CTATGACGTCCCGACTATGCA	
41	PYL8-RT R	CACTGATTATCCACAAGCTCA	
42	EF1α-RT F	CCCAGGCTGATTGTGCTGT	Control interno (Elongation Factor 1α)
43	EF1α-RT R	GGGTGGTGGCATCCATCTTGT	

Tabla 12: cebadores usados para analizar la expresión del transgén *3HA-PYL8* y *EF1 α* como control.

4.4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE RNA DE SEMILLAS DE *ARABIDOPSIS*

Para analizar los niveles de expresión del transcrito *3HA-PYL8* en semillas *oe3HA-PYL8/pyl8-1/oeDDA1-GFP*, *oe3HA-PYL8/pyl8-1*, *oe3HA-PYL8/pyl8-1/cop10-4* y Col tratadas durante 24 horas en placas de MS suplementadas o no con 3 μ M de ABA, se realizó la extracción de RNA de semilla tal y como está descrito en ¹⁶⁴. Tras la extracción, el DNA de cada muestra fue digerido con el kit "Ambion® TURBO DNA-free™" (Life technologies). El cDNA fue sintetizado con "High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit" (Applied biosystems) y la reacción de qRT-PCR se realizó con la enzima "FastStart Universal SYBR Green Master Mix" (Roche) y con los cebadores 40, 41, 42 y 43 que se indican en la tabla 12.

5. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

En este trabajo, se han llevado a cabo dos aproximaciones diferentes de doble híbrido: en primer lugar se han llevado a cabo ensayos de doble híbrido por conjugación entre las cepas AH109 e Y187 de *S. cerevisiae* con el fin de encontrar interactores de DDA1 en una librería de cDNAs de *Arabidopsis*. En segundo lugar se han analizado interacciones entre dos proteínas conocidas mediante ensayos de cotransformación en la cepa AH109.

Para ambos ensayos, se utilizó el sistema "Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System" (Clontech).

5.1. DOBLE HÍBRIDO POR CONJUGACIÓN

Con el fin de buscar interactores de DDA1, el cDNA de esta proteína fue clonado en el plásmido pGBKT7 y transformado en la cepa Y187 (ver apartado 3.1). Analizando la actividad β -galactosidasa de esta cepa se chequeó en primer lugar que la construcción utilizada no autoactivase, tras lo cual se realizó el ensayo de conjugación con una genoteca de cDNAs de plántulas de *Arabidopsis*, clonados en el vector pGADT7 y transformados en la cepa AH109. Esta librería de cDNA fue cedida por la Doctora Mabel Puga (CNB, CSIC).

Los ensayos por conjugación se llevaron a cabo de acuerdo con el manual "Matchmaker Gal4 Two-Hybrid User Manual" (Clontech). Para ello se incubó durante 16 horas un cultivo que contenía una alícuota de la genoteca más la cepa Y187 portadora de la construcción pGBKT7-DDA1. Todo el cultivo se plaqueó en medio YSD-WLHA con diferentes concentraciones de 3-AT. Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. La eficiencia de la conjugación fue de 9.5×10^6 unidades formadoras de colonia. Las 924 colonias positivas se mantuvieron en medio YSD-WL hasta su análisis mediante crecimiento en las distintas auxotrofías (-WLA, -WLH y -WLAH con distintas concentraciones de 3-AT) para discriminar entre las interacciones más fuertes y más débiles. Además, con la misma finalidad, se realizaron ensayos β -galactosidasa ¹⁶⁵.

Una vez seleccionadas las interacciones de interés, se procedió a la extracción del plásmido pGADT7 que contenía en cDNA de la posible proteína interactora. Para ello se realizaron cultivos de las colonias seleccionadas en medio líquido selectivo YSD-L, la extracción del plásmido se llevó a cabo según el protocolo descrito por ¹⁶⁶. Como siguiendo esta metodología el DNA extraído no es muy limpio, los plásmidos extraídos se transformaron en células de *E. coli* DH5 α mediante electroporación y las colonias positivas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina. El plásmido, entonces, fue extraído con el kit de "QIAGEN QIAprep[®] Mini-Prep kit", y el cDNA clonado se analizó mediante secuenciación con los cebadores que se indican en la tabla 13.

	Nombre	Secuencia	Observaciones
44	pGADT7 F	CTATTCGATGATGAAGATACCCC	
45	pGADT7 R	AGATGGTGCACGATGCACAG	

Tabla 13: cebadores usados para secuenciar los plásmidos pGADT7.

5.2. DOBLE HÍBRIDO POR COTRANSFORMACIÓN

Para realizar ensayos de doble híbrido dirigidos, las proteínas en estudio se clonaron en los vectores pGADT7 y pGBKT7 (ver tabla del apartado 2.3) y se cotransformaron en células AH109 (ver apartado 3.1). Las células transformadas con ambas construcciones se seleccionaron en medio YSD-WL, y posteriormente fueron inoculadas en medios YSD-WLH, YSD-WLA y YSD-WLHA, suplementados o no con diferentes concentraciones de 3-AT, para determinar la fuerza de la interacción. En algunos casos, la cotransformación de los clones pGAD-T y pGBK53 en la cepa AH109 (Clontech) fue usada como control positivo.

6. ENSAYOS TIPO TAP O "TANDEM AFFINITY PURIFICATION"

A partir de 2 litros de suspensiones celulares que sobreexpresaban la fusión DDA1-Gsrhino (esto es, dos repeticiones de la proteína G, un sitio de corte para la proteasa 3C de rinovirus y un sitio de unión a SBP, todo ello bajo el control de un promotor constitutivo 35S; ver apartado 2.4) se llevó a cabo un ensayo tipo TAP. El ensayo tipo TAP consiste en la extracción de proteínas de las suspensiones celulares, seguido de un primer paso de purificación con resina de afinidad por la inmunoglobulina G "IgG Sepharose FF" (GE healthcare), una incubación con la proteasa "Rhinovirus 3C protease" (GE healthcare) que corta a 4°C, y un segundo paso de purificación con la resina de unión a la streptavidina "Streptavidin sepharose" (GE healthcare), que requiere destiobiotina para la elución. Todo ello se llevó a cabo tal y como está descrito en ¹⁵⁵.

Para la identificación de proteínas presentes en el eluido final, las proteínas se separaron por electroforesis NuPAGE en un gel de gradiente 4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen), seguido de una digestión

con tripsina, siguiendo el protocolo de ¹⁵⁶. El análisis de los péptidos mediante un sistema nano-LC conectado a un espectrómetro de masas LTQ orbitrap Velos (Thermo-Fisher), y su identificación mediante TAIRplus database se realizó en colaboración con el laboratorio del doctor Geert de Jaeger (VIB, Gante, Bélgica) ¹⁵⁵. Las proteínas contaminantes o de fondo se descartaron basándose en la comparación con las bases de datos de proteínas contaminantes presentes en otros ensayos que disponen en el laboratorio del doctor Geert de Jaeger.

Para realizar los ensayos de CoIP tipo TAP de las fusiones DDA1-GSrhino, las suspensiones celulares transformadas con esta construcción fueron tratadas durante dos horas con 50 μ M de ABA o 50 μ M de GA. Se realizó la extracción de proteínas a partir de 3 gramos de material. Se llevó a cabo el protocolo tal y como está descrito en ¹⁵⁵. Tras las incubaciones pertinentes, el eluido se separó de la resina por centrifugación y fue desnaturalizado por cocción a 99°C durante 5 minutos. Las muestras se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron por western blot con los anticuerpos anti-DDA1 y anti CSN5.

7. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BiFC)

Para realizar los experimentos de BiFC, se generaron plásmidos para la expresión de las proteínas de interés fusionadas al fragmento N-terminal o C-terminal de la E-YFP (ver apartado 2.3.2 y tabla 5). Para comprobar la interacción entre dos proteínas, se agroinfiltraron las construcciones correspondientes y sus respectivos controles (vectores vacíos) en hojas de *N. benthamiana*, junto con el supresor de silenciamiento p19. Las hojas se analizaron a las 72 horas de la infiltración mediante microscopía confocal. La fluorescencia fue visualizada en células epidérmicas de las hojas. Fragmentos de hoja fueron sumergidos durante unos minutos en una solución con DAPI para visualizar los núcleos (1 μ g/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en 100 mM de tampón fosfato y 0.5 de tritón 100%).

Para realizar en conteo de núcleos fluorescentes, se analizaron imágenes de hojas de *N. benthamiana* con un área determinada, agroinfiltradas con diferentes combinaciones de plásmidos, y se analizaron con el programa "ImageJ versión 1.37" (<http://rbs.info.nih.gov/ij>). Se utilizaron los mismos parámetros de contraste de imagen para analizar todas las muestras y sus controles. El total de núcleos analizados se determinó mediante el conteo de núcleos teñidos con DAPI presentes en las mismas áreas estudiadas. Fueron analizados un mínimo de 100 núcleos por combinación y por réplica biológica.

8. MICROSCOPIA

Para el análisis de ensayos BiFC en hojas de *N. benthamiana* y para el análisis de localización subcelular de la proteína DDA1-GFP, se utilizó un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems), con un

objetivo de inmersión 63x o 20x-dry. El programa "LAS AF v.2.3.6" se usó para la adquisición de la imagen. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ.

Para el estudio de la localización subcelular de DDA1-GFP, se analizaron células epidérmicas de raíces de plántulas pDDA1::DDA1-GFP de *Arabidopsis* crecidas en placas verticales durante 4 días.

Los óvulos y semillas de las plantas pDDA1::DDA1-GUS fueron visualizados con un microscopio Zeiss Axioskop, con los objetivos de 10x y 20x.

9. TINCIÓN TIPO β -GLUCURONIDASA (GUS)

La tinción GUS se llevó a cabo como está descrito en ¹⁶⁷.

10. TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS

10.1. INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. COLI*

Para la expresión de las proteínas PYL4, PYL5, PYL8 y PYL9 fusionadas a colas de Histidinas, tanto en el extremo N como en el C terminal, los plásmidos cedidos por el doctor Pedro Rodríguez (IBMCP-CSIC, Valencia; ver apartado 2.3.4) fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21pLysS. Su expresión fue inducida con IPTG durante 3 horas a 30°C y en agitación. Tras realizar la lisis celular mediante sonicación (el tampón de sonicación usado fue 20 mM tris pH8, 100 mM NaCl, 5 % glicerol y 1x de inhibidores de proteasas (Roche)), las proteínas de interés fueron purificadas del total de proteínas solubles, mediante la incubación con la resina "Ni-NTA agarosa" (Quiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la elución de las proteínas fusionadas se utilizaron soluciones a diferentes concentraciones de Imidazol, y los eluidos se recogieron en fracciones de 1 mL. La fracción que contenía la proteína purificada fue dializada para sustituir el tampón con imidazol por otro adecuado para realizar ensayos in vitro, esto es: 20 mM tris pH 7.4 y 10% v/v glicerol. Para la diálisis de usaron los cassettes "Slide-A-Lyzer Dialysis cassette" (Life Technologies), con un tamaño de poro de 3.5 kDa.

10.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLANTULAS DE *ARABIDOPSIS*

Para la extracción de proteínas de plántulas de siete días, se recogió material con pinzas de placas de MS (entre 20 y 40 plantas, dependiendo del experimento), se congeló en nitrógeno líquido y se guardó ultracongelado hasta su utilización. La extracción se llevó a cabo homogeneizando el tejido con ayuda de un palito "pellet pestle blue" (Sigma) en tampón: 50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM PMSF, 0.1% de

NP40 y 1x de inhibidores de proteasas (Roche). Los extractos se centrifugaron a 16.000 g dos veces a 4°C durante 10 minutos, y la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante Bradford (Bio-Rad protein assay kit) por comparación con una curva patrón.

10.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SEMILLAS DE *ARABIDOPSIS*

La extracción de proteínas de semilla se realizó a partir de unas 200 semillas esterilizadas y estratificadas a 4°C durante 48 horas y sembradas en placas de MS o MS con 3 µM de ABA durante 24 horas. Se analizaron las líneas: oe3HA-PYL8/*pyl8-1*, oe3HA-PYL8/*pyl8-1*/oeDDA1-GFP, oe3HA-PYL8/*pyl8-1*/*cop10-4* y Col. Las semillas tratadas se recogieron de las placas con ayuda de un bisturí y fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a - 80°C hasta su utilización. Para la extracción se procedió a la homogeneización con mortero y nitrógeno líquido. Cuando las muestras estaban totalmente homogeneizadas se añadió tampón de extracción (7M urea, 2M tiourea, 4% (v/v) de 3-[(3-cholamidopropyl)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 18 mM tris-HCl pH 7.5, 0.2% tritón X-100, y 1x de inhibidores de proteasa (Roche)) y se incubaron durante 10 minutos a 4°C con rotación, tras lo cual se añadió DTT (a una concentración final de 14 mM) y se continuó con la incubación durante 20 minutos más. Los extractos se centrifugaron a 16.000 g dos veces a 4°C durante 10 minutos, y la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante Bradford (Bio-Rad protein assay kit) por comparación con una curva patrón.

10.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *N. BENTHAMIANA*

Para chequear la interacción en planta entre PYL8 y DDA1, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación en hojas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad. Para ello, se agroinfiltraron dichas hojas con células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción 35S::3HA-PYL8 (plásmido Alligator 2) y con 35S::DDA1-GFP (plásmido pGWB5), junto con el supresor de silenciamiento p19. Como control se agroinfiltraron también ambas construcciones por separado. Para determinar si la interacción era dependiente de ABA, las hojas se infiltraron a las 48 horas con una solución con 50 µM MG132 y 50 µM ABA.

Las hojas se recogieron a las 72 horas de la infiltración, y se "crosslinkaron" con una solución 1% de formaldehído en PBS 1x, manteniendo el vacío durante 15 minutos. La reacción se paró añadiendo glicina 300 mM incubando al vacío 5 minutos más. Las hojas se lavaron dos veces con PBS 1x, se secaron bien con papel absorbente, se congelaron en Nitrógeno líquido, y se guardaron a menos 80 hasta su posterior utilización. La muestras se homogeneizaron con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, y una vez trituradas totalmente se mezclaron con tampón de extracción para ensayos de coimmunoprecipitación (CoIP): 50 mM tris pH 7.4, 80 mM NaCl, 10% glicerol, 0.2% NP40, 1 mM PMSF, 50 µM MG132, 1 µM DTT, 5 µM ATP y 1x de inhibidores de proteasa (Roche). Además, para las hojas tratadas con ABA, el tampón de extracción se suplementó con ABA, a

una concentración final de 50 μ M. Los extractos se centrifugaron a 16.000 g dos veces a 4°C durante 10 minutos, y la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante Bradford (Bio-Rad protein assay kit) por comparación con una curva patrón.

10.5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUSPENSIONES CELULARES DE *ARABIDOPSIS* PSB-D

Para el chequeo de expresión de las suspensiones celulares transformadas con DDA1-mTAP y DDA1-Gsrhino, así como para los ensayos tipo TAP y de CoIP, entre 3 y 15 gramos de suspensiones celulares de *Arabidopsis* fueron homogeneizados con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. El material triturado se mezcló con el tampón de extracción (que contiene 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 15 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 15 mM *p*-nitrofenil fosfato, 60 mM β -glicerofosfato, 0.1% NP-40, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 μ M E64, 1/10 mL del cocktail "EDTA-free Ultra Complete Tablet", 5% de etilen-glicol y 2500 unidades de benzonasa) con ayuda de un molinillo de café previamente enfriado, y se incubó durante media hora a 4°C con rotación. Los extractos se centrifugaron dos veces a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C para evitar la degradación de proteínas, y la concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante Bradford (Bio-Rad protein assay kit) por comparación con una curva patrón¹⁵⁵.

10.6. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Las muestras de proteínas extraídas se calentaron a 99°C para su desnaturalización, durante 5 minutos en tampón de carga 2x con 63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (p/v), 20% glicerol, 125 mM azul de bromofenol y 3 mM 1,4-ditiotreitol y 10% de β -mercaptoetanol.

Estas muestras así tratadas se separaron en geles SDS-PAGE, según¹⁵¹. El gel concentrador se realizó siempre al 4% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (Biorad), y el gel separador se realizó a una concentración variable, dependiendo del tamaño de la proteína a analizar (al 6%, 10% o 12%). Se utilizó como tampón de electroforesis: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS (Tris-glicina 1X) y los geles se resolvieron a 35 mA el gel concentrador y a 55 mA el gel separador.

Para el análisis de expresión de proteínas purificadas en *E. coli*, el gel se tiñó en una solución 0.05% azul de Coomassie, 45% metanol y 7% ácido acético. Posteriormente se trató el gel con solución de desteñir compuesta por 25% metanol y 7% ácido acético.

Para el resto de análisis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, Millipore) de 0.45 μ m de tamaño de poro, en un tampón semi-seco (50 mM Tris, 40 mM glicina, 0,040% SDS y 20 % metanol a un pH de 8.3), y aplicando un voltaje de 110 mA por gel durante hora y media.

Para el bloqueo, las membranas se incubaron durante una hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5% disuelta en PBS con 0.1% tween-20 (PBS-T). Tras el bloqueo, se procedió a la incubación con los anticuerpos (tabla 14) diluidos en leche en polvo 1x en tampón PBS-T, durante una hora para los anticuerpos conjugados con la peroxidasa (o HRP). En el caso de los anticuerpos no conjugados, la incubación se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C, seguido de 3 lavados de 10 minutos con PBS-T y la incubación durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario diluido 1:10000 en leche 1x PBS-T. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-Mouse IgG (Amersham Bioscience) y anti-Rabbit (GE Healthcare). Tras esta segunda incubación, las membranas volvieron a lavarse como se ha indicado anteriormente. Como sistema de detección se usó "ECL Plus Western Blotting Detection System" (Amersham) o "SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Chemiluminescent Substrate" (Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante.

Anticuerpo	Título	Detección	Secundario	Descripción
anti-GFP-HRP	1:2000	DDA1-GFP y DET1-GFP		Milteny Biotec
anti-HA-HRP	1:1000	PYL8-HA		Roche
anti- PAP	1:2000	TAP-COP1 de <i>Arabidopsis</i>		Sigma-Aldrich
anti-FLAG M2	1:1000	FLAG-COP10 y FLAG-DDB1B	Anti-Mouse	Sigma-Aldrich
anti- CUL4	1:500	CUL4 de <i>Arabidopsis</i>	Anti-Rabbit	Chen et al., 2006 ¹⁸
anti- DDA1	1:300	DDA1-Gsrhino en cultivos celulares	Anti-Rabbit	cedido por Dr. V. Rubio
anti-HIS	1:1000	PYL4, PYL5, PYL8 y PYL 9 purificadas en bacteria	Anti-Mouse	Clontech
Anti-CAND1	1:1000	CAND1 de <i>Arabidopsis</i>	Anti-Rabbit	Feng et al., 2004 ¹¹⁵
Anti-ubiquitina	1:1000	Molécula de ubiquitina	Anti-Rabbit	Boston Biochem
Anti-CSN5	1:1000	CSN5 de <i>Arabidopsis</i>	Anti-Rabbit	Kwok et al., 1998 ¹⁶⁸
Anti-CSN3	1:1000	CSN3 de <i>Arabidopsis</i>	Anti-Rabbit	Peng et al., 2001 ¹⁶⁹
Anti-RPT5	1:1000	RPT5 de <i>Arabidopsis</i> (control de carga)	Anti-Rabbit	Kwok et al., 1999 ¹⁷⁰

Tabla 14: Anticuerpos usados para los experimentos de Western Blot.

Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-RPT5 o la tinción de las membranas con Rojo Ponceau.

10.7. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Los ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas en *Arabidopsis* se llevaron a cabo en plántulas de 7 días: oeFLAG-COP10, oeDET1-GFP, oeFLAG-DDB1b, oeTAP-COP1, oeFLAG-CAND1/*cand1-1*, oeDDA1-GFP, oeDDA1-GFP/oeFLAG-COP10 y Col. Las plantas se recogieron cuidadosamente con pinzas y se incubaron

durante una noche en medio MS líquido, suplementado con 50 μM de MG132 (Sigma-Aldrich) y con diferentes combinaciones de ABA (50 μM , Sigma-Aldrich), GA (50 μM , Duchefa) y MLN4924 (10 μM , cedido por el Dr. Claus Schwechheimer, Technische Universität, Munchen, Alemania). Para algunos experimentos, las plantas oeDDA1-GFP fueron tratadas durante 3 horas con 50 μM de MG132, 50 μM de CLX y 50 μM de ABA y/o 50 μM de GA.

Tras el tratamiento se retiró el exceso de líquido con papel secante, y las plantas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

El material extraído de unas 80 plantas con tampón de extracción para ColP (50 mM tris pH 7.4, 80 mM NaCl, 10% glicerol, 0.2% NP40, 1 mM PMSF, 50 μM MG132, 1 μM DTT, 5 μM ATP y 1x de inhibidores de proteasa (Roche), con o sin hormonas, dependiendo del tratamiento recibido) fue normalizado en concentración y volumen con los correspondientes controles.

Estos extractos se incubaron con 5 μL de anticuerpo anti-GFP (Living Colors Full-Length A:V: polyclonal antibody) durante 2 horas a 4°C con rotación, seguido de la incubación otras 2 horas con 20 μL de resina "Protein A-Sepharose[®] from *Staphylococcus aureus*" (Sigma-Aldrich) para inmunoprecipitar DDA1-GFP (en *Arabidopsis* y en *N. benthamiana*) y DET1-GFP. Para separar de la resina el extracto proteico no unido tras las dos horas de incubación, se lavó 3 veces con 1 mL de tampón de extracción, y las proteínas de interés fueron eluidas mediante cocción a 99°C en tampón de carga 2x. Antes de su uso, la resina "Protein A-Sepharose[®]" fue tratada con Glicina 0.1 M, pH 2.7, y lavada 3 veces con 1 mL de tampón de extracción.

Para la inmunoprecipitación de FLAG-COP10, FLAG-DDB1B y FLAG-CAND1/*cand1-1*, la incubación se hizo durante 2 horas a 4°C con 20 μL de resina "ANTI-FLAG M2 Affinity Gel" (Sigma-Aldrich). Tras dos lavados de 1 mL con tampón de extracción se procedió a la elución de la fracción unida con cocción en 50 μL de tampón de carga 2x. Antes de su uso, la resina "ANTI-FLAG M2 Affinity Gel" fue previamente lavada 3 veces con 1 mL de tampón de extracción.

Para la inmunoprecipitación de TAP-COP1 se utilizó resina "IgG Sepharose FF" (GE healthcare) que se usó en las mismas condiciones que en el caso anterior.

Esta resina "IgG Sepharose FF" (GE healthcare) fue también usada para inmunoprecipitar DDA1-mTAP expresado en suspensiones celulares PSB-D. Se realizó la extracción de proteínas a partir de 3 gramos de material, tal y como está descrito en el apartado 10.5. Los extractos proteicos se incubaron con 25 μL de la resina durante 1 hora, a 4°C y con rotación. Se realizaron 5 lavados con 750 μL del tampón TEV (descrito en ¹⁵⁵) en columnas "Mobicol column 0.35 μm bottom filter" (ImTec) para eliminar las proteínas no unidas, tras lo cual, la resina fue incubada durante otras 2 horas con 5 μL de proteínas recombinantes fusionadas a colas de histidinas PYL4, PYL5, PYL8 o PYL9 purificadas de bacteria (ver apartado 10.1). A continuación, la resina lavada otras 5 veces con 750 μL de TEV y resuspendida en 30 μL del mismo tampón, fue incubada durante 1 hora a 16°C con 4 μL de AcTEV[™] Protease (Invitrogen) para eluir DDA1. El eluido se separó de la resina por centrifugación y fue

desnaturalizado por cocción a 99°C durante 5 minutos. Las muestras se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron por western blot con anticuerpo anti-His.

Para inmunoprecipitar 3HA-PYL8 expresado en hojas de *N. benthamiana* se realizó la extracción como está indicado en el apartado 10.4, tras lo cual se procedió a la incubación durante 2 horas a 4°C con 20 µL de resina "Anti-HA affinity matrix" (Roche) previamente lavada. Se realizaron 3 lavados con 1 mL de tampón de extracción y las fracciones de interés se eluyeron de la resina por cocción durante 5 minutos con el tampón de carga 2x.

Las muestras y sus controles se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF para su análisis por western blot, tal y como está descrito en el apartado 10.6.

10.8. PURIFICACIÓN POR AFINIDAD DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS

Para la purificación de proteínas ubiquitinadas, plántulas oe3HA-PYL8/*pyl8-1* y Col de 7 días fueron recogidas con pinzas de las placas de MS donde estaban creciendo, y transferidas durante una noche a medio líquido MS con 50 µM de MG132, suplementado o no con 50 µM de ABA y/o 50 µM de GA. Tras el tratamiento las plantas se secaron con papel, se congelaron en Nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

El proceso de extracción y purificación de proteínas se llevó a cabo como está descrito en ¹⁷¹ con algunas modificaciones. Las plántulas homogeneizadas se mezclaron con tampón de extracción BI (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 0.1 % NP40, 5 mM ATP, 1x de inhibidores de proteasa (Roche), 1mM PMSF, 50 µM MG132, 10 nM ub aldehído (Enzo Life Science) y 10 mM N-ethylamida, suplementado o no con 50 µM de ABA). Los extractos se centrifugaron dos veces durante 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se normalizaron en concentración y volumen con sus respectivos controles, tras valorar la concentración mediante Bradford usando una recta patrón.

Tras retirar un pequeño volumen de cada extracto que se usó como control de carga, se añadieron a cada muestra 40 µL de resina "p62 agarose" ¹⁷² previamente lavada con tampón de extracción, o solo agarosa para los controles negativos. Se realizó una incubación de 4 horas a 4°C en rotación, tras lo cual se procedió al lavado de la resina dos veces con 1 mL de tampón BI, seguido de 1 lavado con 1 mL de tampón BII (igual composición que el tampón BI con 200 mM NaCl). Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas por cocción durante 5 minutos a 99°C en 50 µL de tampón de carga 2x.

Los extractos se separaron en geles SDS-PAGE, transferidos a membrana, e incubados con los anticuerpos anti-ubiquitina (para detectar la presencia de proteínas ubiquitinadas) y con anti-HA-HRP para la detección de la proteína 3HA-PYL8.

10.9. ENSAYOS DE DEGRADACIÓN IN VIVO

Plantas de 7 días *oe3HA-PYL8/pyl8-1/oeDDA1-GFP* y *oe3HA-PYL8/pyl8-1* fueron transferidas de placa a medio líquido MS conteniendo 50 μM de CLX y en presencia o ausencia de 50 μM de ABA y/o 50 μM de GA, durante 30 minutos, 1 hora y 6 horas. También se recogieron plantas sin tratar como control a tiempo inicial (T0). El efecto de la inhibición del proteosoma se chequeó mediante la adición de 50 μM de MG132 durante 6 horas de incubación. La extracción de proteínas de unas 40 plantas tratadas se llevó a cabo como está indicado en el apartado 10.2, y posteriormente se llevó a cabo una separación en geles SDS-PAGE y western blot como está indicado en el apartado 10.6. Se usaron los anticuerpos anti-HA-HRP y como control de carga las membranas fueron teñidas con rojo ponceau. Para analizar la intensidad de las bandas se utilizó el programa ImageJ versión 1.37.

10.10. ENSAYOS DE CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN MOLECULAR

Los ensayos de fraccionamiento por filtración en gel mediante columnas de FPLC se llevaron a cabo con extractos proteicos de plantas *oeDDA1-GFP* con el fin de separar complejos proteicos por su tamaño. Para ello plántulas de 7 días fueron tratadas durante una noche en medio MS líquido con 50 μM MG132 y suplementado o no con 50 μM ABA. El material fue homogeneizado con ayuda de un palito "pellet pestle blue" y nitrógeno líquido. La extracción se llevó a cabo con el tampón: 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 200 mM NaCl; 10% glicerol; 5 mM β -mercaptoetanol; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1x de inhibidores de proteasa (Roche) y 50 μM ABA en los casos correspondientes. Extractos de entre 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se filtraron con un filtro "Whatman® Puradisc 30 syringe filters" con tamaño de poro de 0.22 μm , y se inyectaron en una columna "Superdex 200 Increase 10/300 GL" (GE healthcare) que permite separar proteínas o complejos con un peso molecular entre 10 y 600 KDa. La columna fue previamente lavada con agua y con 50 mL del tampón anteriormente descrito, tras lo cual se inyectó el extracto proteico y se recogieron 24 fracciones de 0.5 mL cada una, descartando los primeros 7.5 mL de eluido.

Las proteínas presentes en todas las fracciones fueron concentradas añadiendo 10 μL de resina "StrataClean" (Agilent Technologies) durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron por cocción a 99°C durante 5 minutos en 40 μL de tampón de carga 2x. Las muestras se analizaron mediante separación en geles SDS-PAGE y western blot, como está indicado en el apartado 10.6.

11. ENSAYOS DE GERMINACIÓN, ESTABLECIMIENTO DE LA SEMILLA Y CRECIMIENTO DE LA RAÍZ

Para caracterizar la respuesta de las plantas a la hormona ABA y a diferentes estreses abióticos como NaCl y manitol, semillas procedentes de plantas crecidas y recogidas al mismo tiempo fueron esterilizadas y

estratificadas en placa durante 72 horas a 4°C. Las placas de MS estaban suplementadas o no con 0.5 µM de ABA, 1 µM de ABA, 150 mM de NaCl o 400 mM de manitol. Para el análisis de las líneas iDDA1, se añadió ABA al medio a una concentración final de 1 µM, así como 10 µM de β-estradiol. Se analizó la cantidad de semillas germinadas a las 72 y 96 horas, considerando semillas germinadas aquellas en las que era visible la emergencia de la raíz. A los 5 días se contabilizó el número de semillas que habían desarrollado cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas (establecimiento de la semilla).

Para los ensayos de crecimiento de la raíz las semillas se sembraron y crecieron en placas de MS durante 4 o 5 días, tras lo cual fueron transferidas a placas cuadradas (para el crecimiento en vertical) suplementadas o no con 10 µM de ABA. Tras 10 días se tomaron imágenes de las placas, y se analizó el crecimiento de las raíces usando el programa ImageJ versión 1.37.

12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE DDA1 EN DIFERENTES ESPECIES VEGETALES

Para el análisis filogenético de DDA1, se buscaron mediante BLAST secuencias de proteínas homólogas en las bases de datos: Plaza (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>), Phytozome (<http://phytozome.net>), Gramene (<http://gramene.org>), TAIR (<http://Arabidopsis.org>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias incompletas fueron descartadas para los análisis. Se realizó un alineamiento con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) usando la matriz de comparación de proteínas Gonnet y los parámetros que se aplican por defecto, seguido de una inspección manual para detectar posibles problemas en las secuencias. El mejor modelo para nuestro alineamiento fue seleccionado usando ProtTest ¹⁷³. El modelo seleccionado fue Jones-Taylor-Thornton para sustitución de aminoácidos con una distribución gamma discreta (de cuatro categorías), una proporción invariable, y un árbol inicial BIONJ. Este modelo se usó para realizar un análisis de máxima verosimilitud (maximum likelihood) con un "bootstrap" calculado en 1000 réplicas, con el programa MEGA5 (<http://megaprograma.net>). Las secuencias de DDA1 en *Selaginella moellendorffii* y en *Picea glauca* se usaron como raíz del árbol realizado.

RESULTADOS

Debido a la potencial relevancia de DDA1 en la regulación de los procesos de ubiquitinación mediados por CRL4-CDD, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización tanto bioquímica como funcional de esta proteína, con el objetivo de entender mejor el papel de los procesos de ubiquitinación en el desarrollo y la respuesta a estrés en plantas.

1. DDA1 ES UNA PROTEÍNA ÁLTAMENTE CONSERVADA EN PLANTAS VASCULARES

DDA1 fue identificada inicialmente en humanos, en una búsqueda de interactores de Det1 en células HEK293³³. En dicho trabajo se describió a hDda1 como una proteína pequeña, de función desconocida, pero altamente conservada en invertebrados, vertebrados y plantas. Para determinar si DDA1 también está presente en especies vegetales, y cuál es su similitud entre ellas, se llevó a cabo una búsqueda de homólogos de DDA1 de *Arabidopsis* en las bases de datos: Plaza (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>), Phytozome (<http://phytozome.net>), Gramene (<http://gramene.org>), TAIR (<http://Arabidopsis.org>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Como resultado, se encontraron homólogos de DDA1 en 49 especies y subespecies vegetales; donde, en la mayoría de los genomas, sólo apareció una copia del gen. Sólo se encontraron dos copias del gen en los casos de maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*) y algodón (*Gossypium hirsutum*). Para analizar el grado de conservación de la proteína correspondiente en estas especies, se realizó un alineamiento de las secuencias peptídicas empleando el programa ClustalW2 (ver apartado 12 de materiales y métodos) y se determinó la existencia de un 66% de identidad de secuencia aminoacídica, como promedio.

Los análisis filogenéticos mostraron que DDA1 está conservada en plantas vasculares, incluyendo el pteridofito *Sellaginella moellendorffii*, pero no existe en algas o en el musgo *Physcomitrella patens*. En el caso de angiospermas, DDA1 se puede encontrar tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

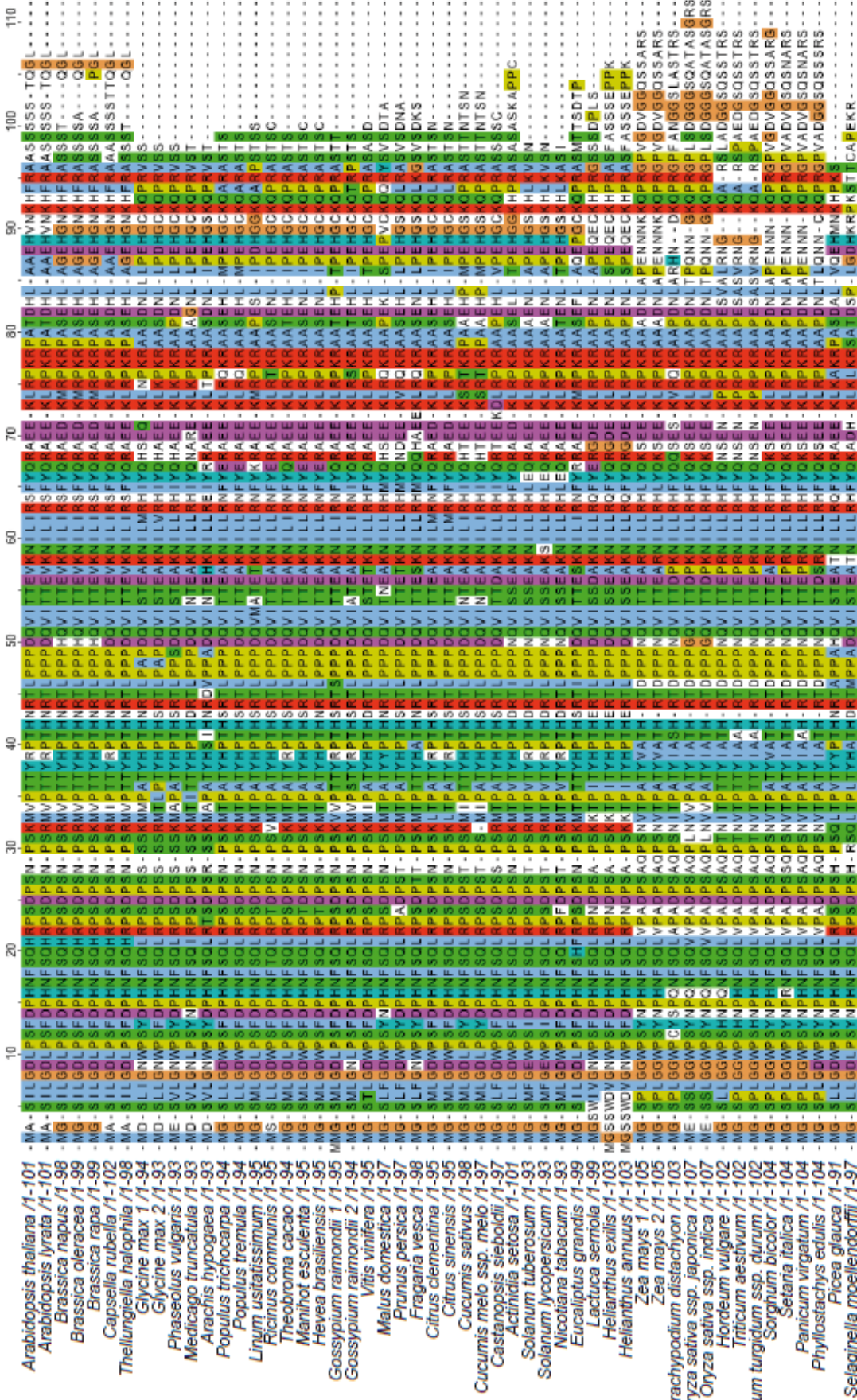


Figura 14: Alineamiento de secuencias múltiple de la proteína DDA1 en diferentes especies vegetales usando el programa CLUSTALW2.

2. DDA1 DE *ARABIDOPSIS* FORMA PARTE DEL COMPLEJO CDD.

hDda1 ha sido descrita como un componente de los complejos CDD (Cop10-Det1-Ddb1) en células animales ³³. Sin embargo, no existen evidencias de su asociación con el complejo CDD en plantas.

Para determinar si DDA1 forma parte del complejo CDD en *Arabidopsis*, se purificaron proteínas asociadas a DDA1 mediante la técnica "*Tandem affinity purification*" (TAP). Para ello, se clonó DDA1 con el epítipo TAP fusionado a su extremo C-terminal, y se expresó y purificó a partir de dos suspensiones celulares de *Arabidopsis* independientes transformadas con dicha construcción. La identidad de las proteínas que fueron co-purificadas junto con DDA1 se determinó mediante análisis de espectrometría de masas y posterior búsqueda en la base de datos TAIR plus, en colaboración con el grupo de doctor Geert de Jaeger (VIB, Gante, Bélgica).

Número AGI	Proteína Identificada	Nº exp
AT4G21100	DDB1b	2
AT4G05420	DDB1a	2
AT4G10180	DET1	2
AT5G12920	DCAF desconocida	2
AT3G13550	COP10	2
AT5G41560	DDA1 (Cebo)	2
AT5G46210	CUL4	2
AT3G61140	CSN1	1
AT3G45620	DCAF desconocida	1

Tabla 15: Proteínas identificadas en los ensayos tipo TAP como interactoras de DDA1. Se indican los códigos AGI (*Arabidopsis genome initiative*), y los nombres de las proteínas de las proteínas co-purificadas, junto con el número de experimentos en las que fueron encontradas.

Junto con DDA1, en los experimentos tipo TAP se encontraron todos los componentes del complejo CDD en *Arabidopsis* (DDB1a, DDB1b, DET1 y COP10), indicando que DDA1 forma parte de estos complejos (tabla 15). Además, DDA1 apareció asociada (posiblemente como parte del complejo CDD) a complejos más grandes que incluyen a CUL4, dos receptores de sustrato tipo DCAF (proteínas con motivos WD40, capaces de interactuar con DDB1) y CSN1, subunidad del complejo CSN que participa en la regulación de la actividad de los complejos que contienen a CUL4.

Para confirmar la interacción de DDA1 con proteínas del complejo CDD, se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido en levaduras. En concordancia con estudios previos llevados a cabo en células de mamífero ^{33,174,175}, nuestros ensayos mostraron que DDA1 de *Arabidopsis* es capaz de interactuar fuertemente tanto con DDB1a como con DDB1b (figura 16A), y que esta unión ocurre a través del dominio " β -propeller A" (BPA) de DDB1 (figura 16C). La asociación de DDA1 con el resto del complejo CDD ocurre gracias a esta interacción física con DDB1, ya que no se observó interacción directa con DET1 o COP10 (figura 16B). Tampoco se encontró evidencia de interacción entre DDA1 y una de las proteínas DCAF identificadas en los ensayos TAP (AGI: AT5G12920), sugiriendo que su asociación también es indirecta. Sin embargo, esta DCAF mostró interacción directa con DDB1a.

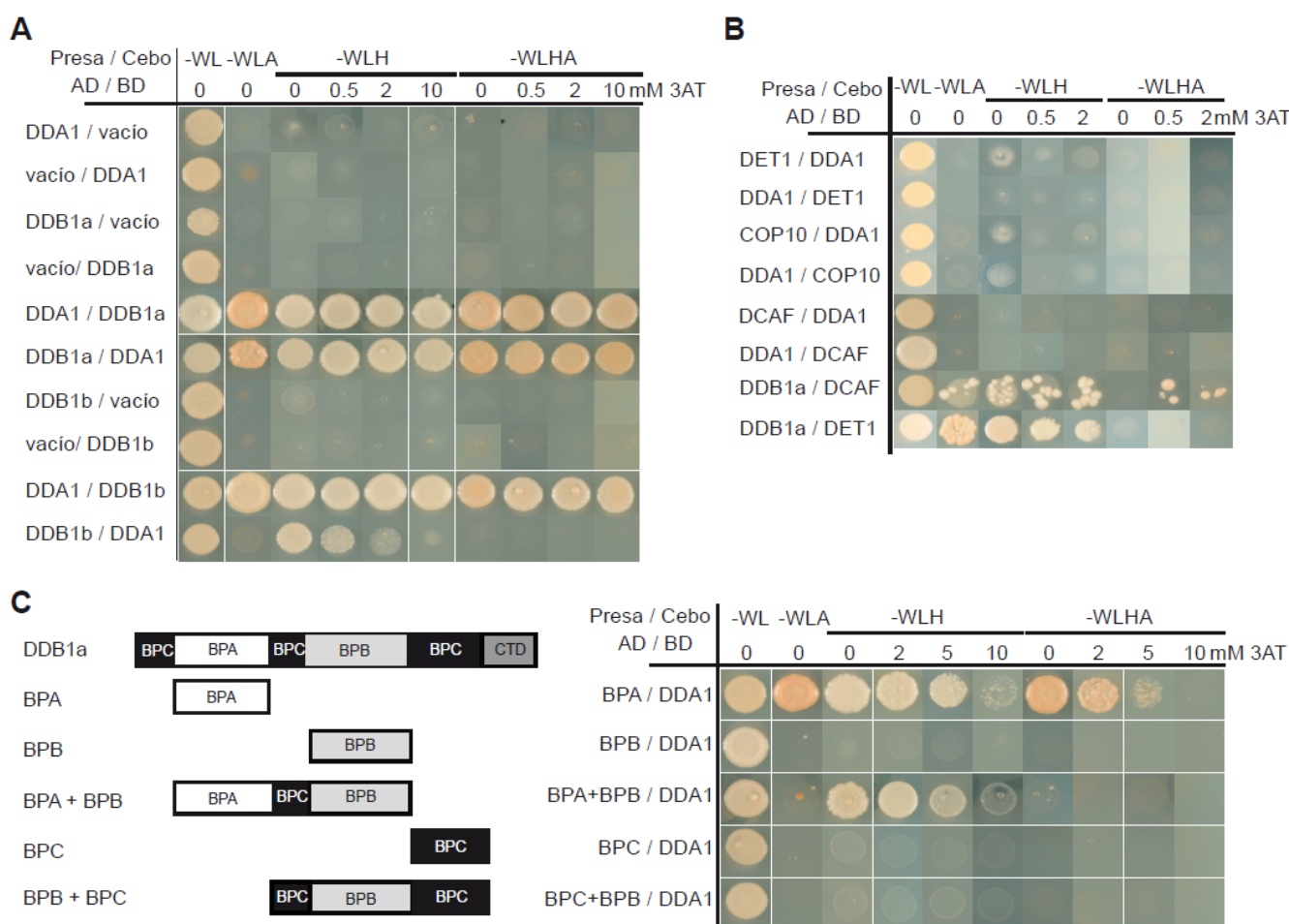


Figura 16: DDA1 se une directamente a las proteínas DDB1.

(A) y (B) DDA1 interactúa con proteínas DDB1 en ensayos de doble híbrido en levaduras ("*Yeast two hybrid*", Y2H). Se muestra en la figura el análisis de interacciones de DDA1 con los componentes del complejo CDD de *Arabidopsis*: DDB1a y DDB1b (A), DET1, COP10 y la proteína DCAF AT5G12920 (B). El crecimiento de las levaduras co-transformadas con las construcciones que se indican se realizó en medio selectivo (indicado en la parte superior de la tabla) con diferentes concentraciones de 3AT (de 0.5 a 10 mM). La interacción DET1-DDB1a (previamente demostrada) fue usada como control positivo. Los vectores vacíos se usaron como control negativo.

(C) DDA1 interactúa con el dominio BPA de DDB1a. Se muestra el análisis mediante Y2H de la interacción de DDA1 con una serie de deleciones de DDB1a (panel derecho), conteniendo distintas combinaciones de dominios (representados esquemáticamente en el panel izquierdo).

Se ha demostrado que hDDA1, como parte del complejo CDD, es capaz de asociarse a complejos más grandes que contienen a CUL4¹⁷⁵. La co-purificación de CUL4 junto con DDA1 en los ensayos tipo TAP indica que esta situación puede darse también en *Arabidopsis*. Para confirmar esta hipótesis se generaron líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresan, bajo el promotor constitutivo 35S, el cDNA de DDA1 fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal (oeDDA1-GFP). Los niveles de expresión de estas líneas sobrepresoras de *DDA1-GFP* fueron analizados en líneas independientes mediante qRT-PCR (figura 17A). Se encontró que tres de estas líneas presentaban niveles altos de *DDA1-GFP*, entre 100 y 1000 veces superior a los niveles de *DDA1* endógenos en plantas silvestres. Para analizar si la fusión DDA1-GFP es capaz de asociarse con el complejo CDD, se cruzaron plantas oeDDA1-GFP (línea 3, figura 17A) con líneas FLAG-COP10²⁸, y se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación. Como se muestra en la figura 17B, FLAG-COP10 co-inmunoprecipita con DDA1-GFP, por lo que concluimos que esta fusión es funcional y capaz de asociarse al resto del complejo CDD. Además, la proteína CUL4 se detectó en muestras de DDA1-GFP tras la inmunoprecipitación (figura 17C), lo que reconfirma la asociación de DDA1 con los complejos que contienen a CUL4.

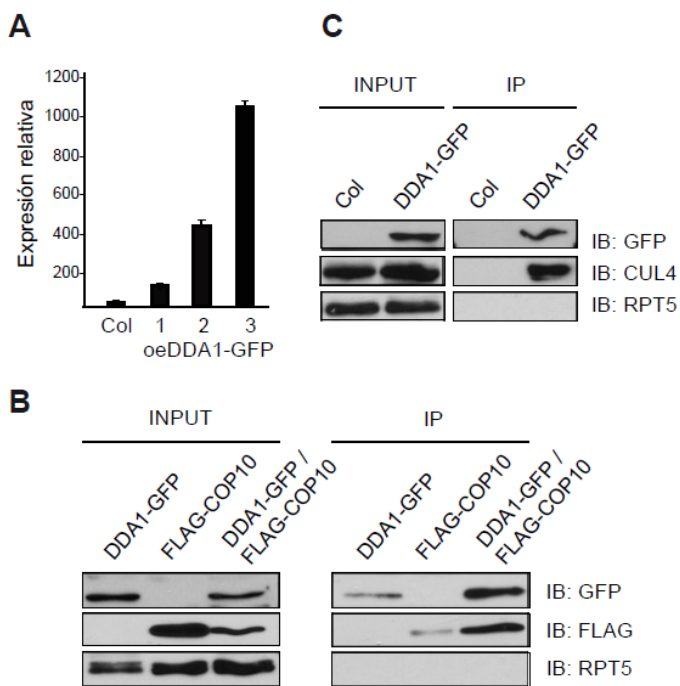


Figura 17: DDA1 se asocia con los complejos CDD y con CUL4 in vivo.

(A) Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión de DDA1-GFP en tres líneas oeDDA1-GFP independientes, comparadas con los niveles endógenos de DDA1 en plantas silvestres (Col). Los datos representados son la media de tres réplicas biológicas por muestra. Las barras de error representan la desviación estándar.

(B) La inmunoprecipitación de las fusiones DDA1-GFP se realizó a partir de extracto total de proteínas de plántulas oeDDA1-GFP, oeFLAG-COP10 y oeDDA1-GFP/oeFLAG-COP10 de 7 días. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP y anti-FLAG, para detectar DDA1-GFP y FLAG-COP10 respectivamente. Western blots frente al anticuerpo anti-RPT5 fueron usados como control de carga.

(C) Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo como en (B), usando extracto proteico de plántulas de 7 días oeDDA1-GFP. Se usaron anticuerpos anti-GFP y anti-CUL4 para detectar DDA1-GFP y CUL4 respectivamente. Western blots frente al anticuerpo anti-RPT5 fueron usados como control de carga.

3. DDA1 PRESENTA LOCALIZACIÓN NUCLEAR.

Para analizar la localización subcelular de DDA1 en *Arabidopsis*, se generaron líneas transgénicas que expresan DDA1 fusionado a la GFP por el extremo C-terminal, bajo el control de su propio promotor (pDDA1::DDA1-GFP). Para ello se clonó el DNA genómico de DDA1 más los 1600 pares de bases previos al primer ATG (secuencia promotora). El análisis de las raíces de las líneas transgénicas obtenidas en el microscopio confocal indican que DDA1 es una proteína nuclear (figura 18A y 18B). Sin embargo, DDA1-GFP también apareció asociada a organelos citoplasmáticos cuya identidad queda pendiente de elucidar.

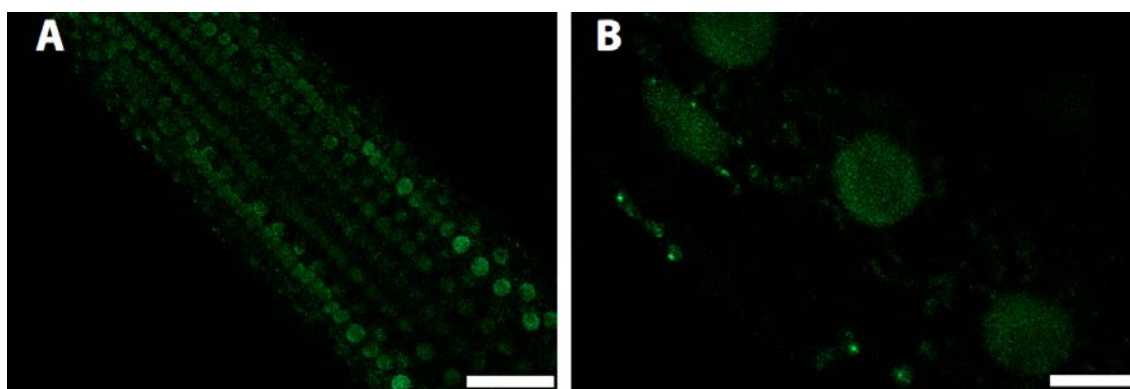


Figura 18: La fusión DDA1-GFP se localiza en el núcleo. Imágenes de raíces de plantas pDDA1::DDA1-GFP de 5 días, analizadas con microscopio confocal. (B) es un detalle de (A). La barra del panel izquierdo indica 50 μ M y la del derecho 10 μ M.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DDA1 EN DIFERENTES TEJIDOS Y ÓRGANOS.

Los análisis de los patrones de expresión del transcrito *DDA1* disponibles en las bases de datos (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) nos indican que la expresión de este gen en planta adulta y plántula es moderada, sin embargo incrementa en las semillas y durante el desarrollo del embrión (figura 19A). Se observó también que los niveles de *DDA1* incrementan en respuesta a algunos estreses regulados por la hormona ABA, como osmótico y altas temperaturas (figura 19B).

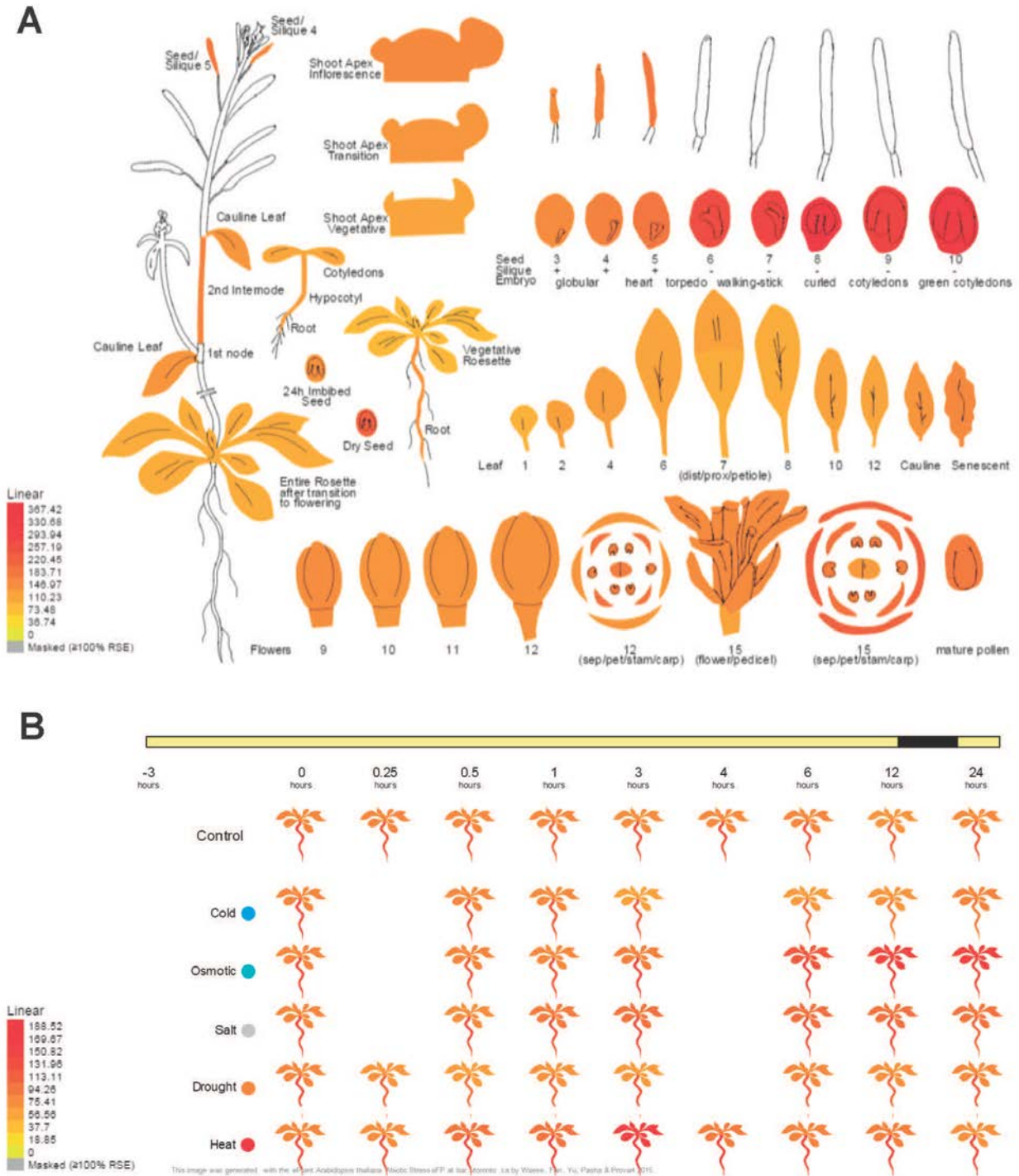


Figura 19: Mapa de la expresión del gen *DDA1* durante el desarrollo de la planta (A) y en plántulas de 18 días sometidas a las siguientes condiciones (B): 4°C (Cold), 300 mM de manitol (Osmotic), 150 mM NaCl (Salt), 15 minutos de exposición a un flujo de aire seco (Drought) y 3 horas a 38°C (Heat). Se representan los datos de expresión absoluta disponibles en <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.

Con el fin de obtener más información sobre la función de *DDA1*, se analizó el patrón de expresión de esta proteína en distintos estadios del desarrollo de la planta. Para ello se generaron líneas transgénicas que

expresan el gen *DDA1* fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS), bajo el control del promotor de *DDA1* (*pDDA1::DDA1-GUS*). Se observó expresión de *DDA1* en los cotiledones, meristemo apical y ápice radicular de plántulas de 3 días (figura 20A). El patrón de expresión es similar cuando las plantas de esta misma edad han sido germinadas en medio suplementado con ABA o con GA, dos hormonas que juegan un papel fundamental durante la germinación de las semillas y desarrollo de la plántula (figura 20B y 20C). En plantas adultas de 4 semanas, la tinción GUS se observó en yemas axilares (D), inflorescencias (E) y flores maduras (H), en los óvulos (F y G), en las anteras y el filamento de los estambres, así como en el polen (I), y en semillas con distinto grado de maduración (J), indicando niveles de expresión de *DDA1* en tejidos y órganos reproductivos con elevado grado de división celular. Sin embargo, no se observó expresión significativa en tejidos vegetativos desarrollados tales como hojas caulinares o de roseta, y tampoco en tallos.

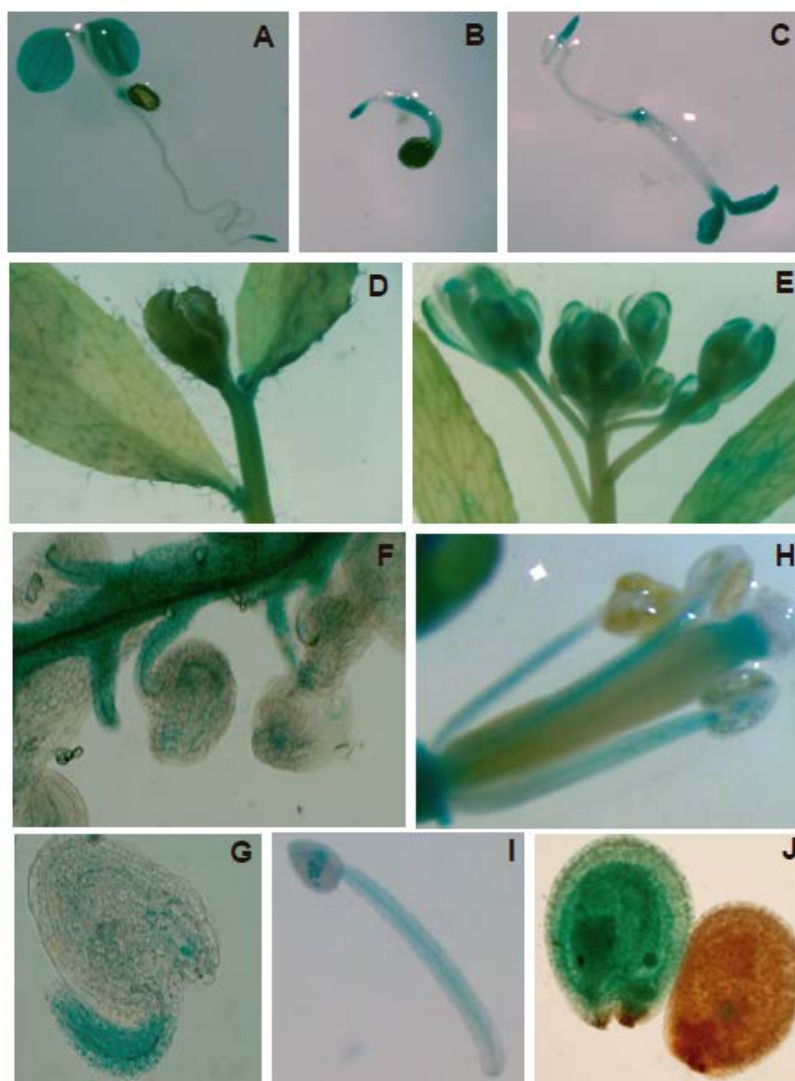


Figura 20: Expresión espacio-temporal de *DDA1* en *Arabidopsis* usando el gen reportero GUS. La actividad GUS fue analizada en plántulas de 3 días (A-C) germinadas en medios: (A) MS, (B) MS suplementado con 0.5 μM ABA y (C) en MS suplementado con 50 μM GA. Además se analizó la expresión en plantas adultas (D-J): (D) yemas axilares, (E) inflorescencias, (F) y (G) óvulos, (H) flor madura, (I) estambre y (J) semillas maduras. Los ensayos se realizaron en 3 líneas transgénicas independientes.

5. DDA1 INTERACCIONA CON LOS RECEPTORES DE ABA PYR/PYL/RCAR

En el momento en el que comenzó este estudio, no se conocían las bases moleculares de la actividad de DDA1 en plantas, y aunque esta proteína fue descrita inicialmente en humanos ³³, tampoco estaba claro su papel en sistemas animales. Con el fin de arrojar luz sobre los mecanismos de acción de DDA1, se realizó una búsqueda de interactores directos de esta proteína utilizando el sistema de doble híbrido en levaduras. Para ello, se realizó un ensayo de conjugación usando la secuencia completa de DDA1 de *Arabidopsis* fusionada al dominio de unión de GAL4 (pGBKT7-DDA1) clonada en la cepa Y187 y una genoteca de cDNAs de plántulas de *Arabidopsis* clonados en el vector pGADT7 y transformados en la cepa AH109. Se identificaron unos 200 posibles interactores de DDA1, de los cuales 20 fueron confirmados mediante ensayos de doble híbrido por cotransformación.

Entre las proteínas que interactúan con DDA1 se encontraron proteínas implicadas en:

- Progresión del ciclo celular
- Remodelación de la cromatina
- Respuesta a distintos estreses
- Desecación de la semilla

Entre estos putativos interactores, se encontraron dos clones correspondientes a versiones truncadas de los receptores de ABA: PYL4 (del aminoácido 84 al 207) y PYL9 (del aminoácido 75 al 187) (figura 21A).

La familia de receptores de ABA PYR/PYL/RCAR está formada por 14 miembros en *Arabidopsis*, de los cuales, 13 son capaces de unir directamente una molécula de ABA. Estas proteínas son nucleares y citoplasmáticas, y tienen un papel fundamental en la ruta de señalización hormonal regulada por ABA, ya que la unión con una de estas moléculas deriva en un cambio conformacional que desencadena la respuesta celular ¹²⁰.

El siguiente paso en el estudio del papel de DDA1 fue determinar si es capaz de interactuar también con otros miembros de la familia PYR/PYL/RCAR, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras. Como resultado, se encontró que DDA1 también interactúa con PYL8 (figura 21B). Además, se chequeó la capacidad de unión entre PYL8 y otros miembros del complejo CDD, y como se puede observar en la figura 21B, el receptor no interactúa con las proteínas DDB1, DET1 o COP10.

Para reconfirmar esta interacción *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Para ello, hojas de *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) fueron infiltradas con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) transformados con DDA1 y el cDNA completo del receptor de ABA PYL8, fusionados al extremo N o C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP). Para determinar la existencia de interacción física entre DDA1 y PYL8 se analizó la reconstitución de la fluorescencia de la YFP. De este modo, se pudo determinar la existencia de interacción física entre DDA1 y PYL8 *in vivo* (figura 21C). La

interacción entre DDA1 y los receptores de ABA ocurre en el núcleo, ya que la señal fluorescente colocaliza con la tinción nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Como medida de cuantificación de esta interacción con BiFC, se analizó el porcentaje de núcleos fluorescentes resultantes de la interacción YFPN:PYL8/DDA1:YFPC. Los resultados indican que el ratio de interacción entre DDA1 y PYL8 es de la misma magnitud que el del control positivo DDA1 y DDB1a (figura 21D).

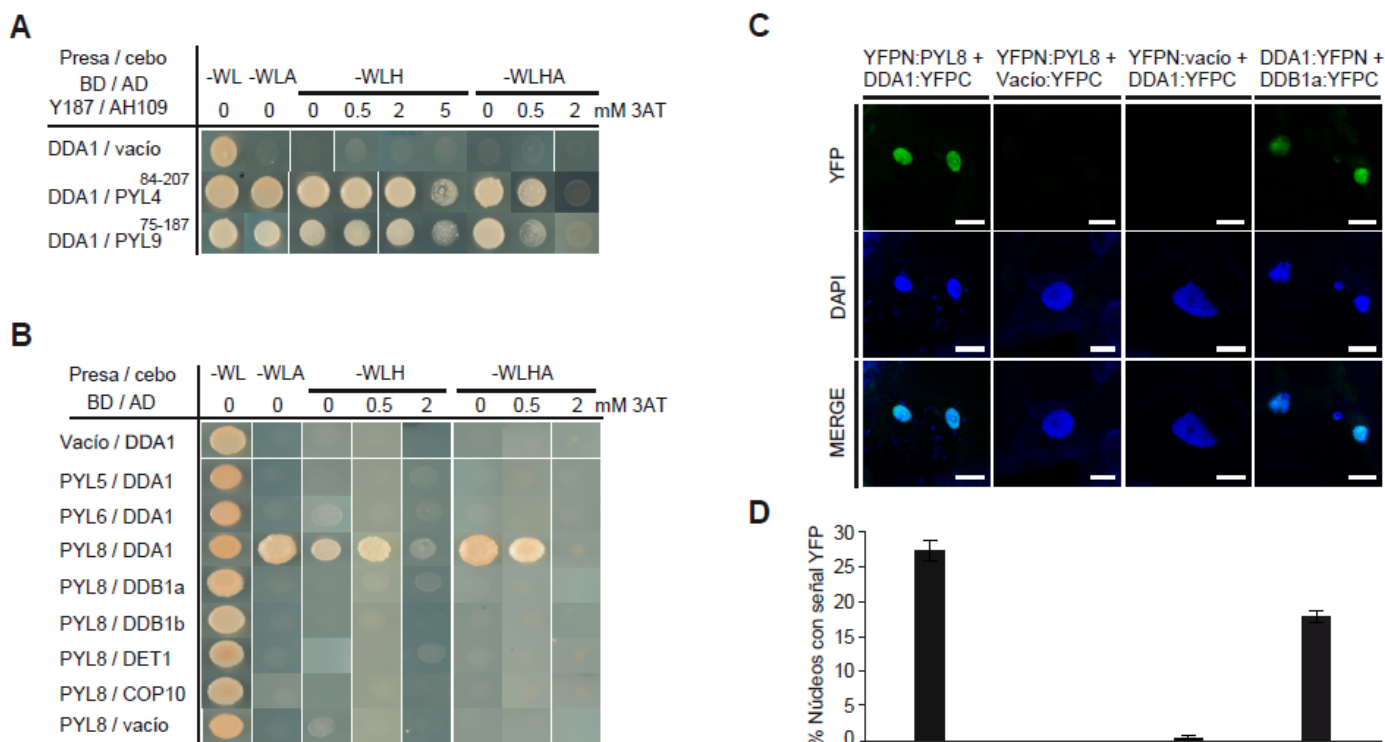


Figura 21: DDA1 interacciona con miembros de la familia PYR/PYL/RCAR de receptores de ABA.

(A) Levaduras de la cepa Y187 fueron transformadas con pGBKT7-DDA1 y usadas para analizar la interacción mediante conjugación con una genoteca de cDNAs de plántulas de *Arabidopsis* clonados en el vector pGADT7 y transformados en la cepa AH109. Entre los clones positivos se encontraban versiones truncadas de los receptores de ABA PYL4 y PYL9. Estos clones crecieron en medio selectivo conteniendo diferentes concentraciones de 3AT (desde 0.5 a 5 mM). Los vectores pGADT7 vacíos fueron usados como control negativo.

(B) Ensayos de doble híbrido en levaduras para analizar la interacción entre DDA1 y versiones completas de PYL5, PYL6 y PYL8, y entre PYL8 y otros miembros del complejo CDD en *Arabidopsis* (DDB1a, DDB1b, DET1 y COP10).

(C) Análisis de la interacción entre DDA1 y PYL8 mediante ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC). Se muestran las imágenes obtenidas con microscopía confocal en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana* expresando las diferentes combinaciones de proteínas que se indican en la parte superior. La reconstitución de la señal fluorescente de la YFP indica que DDA1 y PYL8 interaccionan directamente. Las fusiones con DDB1a y DDA1 se usaron como control positivo. En la imagen se muestran además las imágenes de la tinción DAPI y la superposición de DAPI e YFP (MERGE). Las barras indican 10 μ M.

(D) Porcentaje de núcleos que presentan fluorescencia en los ensayos BiFC realizados como en (C). Las barras representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes; $n > 100$ para cada combinación.

Se llevaron a cabo ensayos de BiFC para reconfirmar la interacción entre DDA1 y otras proteínas de la familia PYR/PYL/RCAR, no encontrada previamente en ensayos de Y2H. Como resultado, se observó reconstitución de la fluorescencia de la YFP en células co-infiltradas con las construcciones correspondientes: DDA1:YFPC y YFPN:PYL (PYL1, PYR1, PYL2, PYL4, PYL5, PYL6, PYL7, PYL9 y PYL10) (figura 22). De este modo, se pudo determinar la existencia de interacción física entre DDA1 y PYR1, PYL2, PYL4, PYL7, PYL9 y PYL10 *in vivo*. Esta asociación (en aquellos casos en los que se observó) ocurre en el núcleo, ya que la señal fluorescente resultante de la interacción colocaliza con la tinción nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

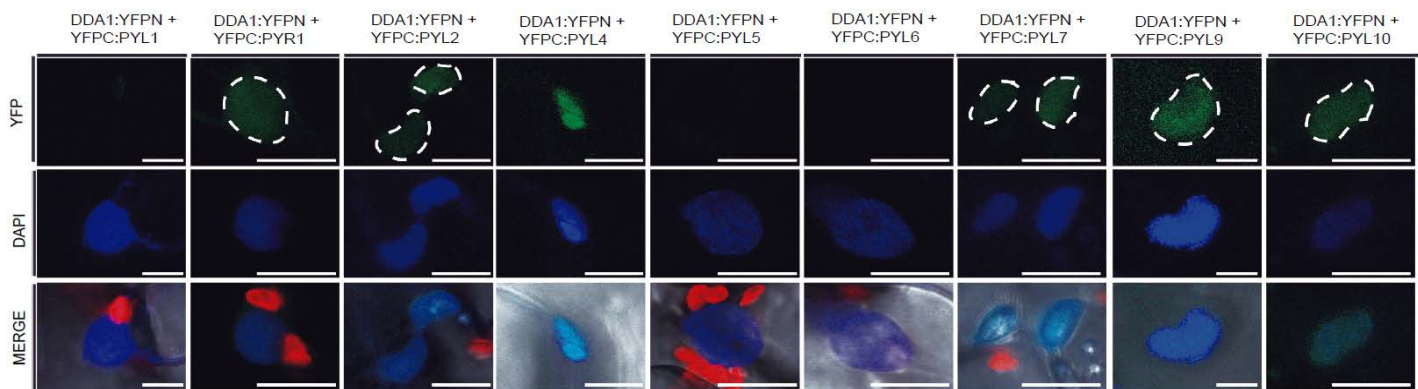


Figura 22: DDA1 interacciona con numerosos miembros de la familia PYR/PYL/RCAR *in vivo* (ensayos de BiFC). Se muestran imágenes obtenidas con microscopio confocal de células epidérmicas de *N. benthamiana* expresando diferentes combinaciones, indicadas en la parte superior. La reconstitución de la señal fluorescente de la YFP en el caso de PYR1, PYL2, PYL4, PYL7, PYL9 y PYL10 indica que estas proteínas son capaces de interactuar directamente con DDA1. La interacción (si ocurre) sucede en el núcleo, ya que la señal fluorescente colocaliza con los núcleos teñidos con DAPI (segunda fila). Se muestra además la superposición de DAPI y YFP (MERGE). Las barras indican 10 μ m.

Por último, y de acuerdo con los datos previos de Y2H, no se encontró mediante ensayos de BiFC interacción directa entre PYL8 y otros componentes del complejo CDD, tal y como se observa en la figura 23.

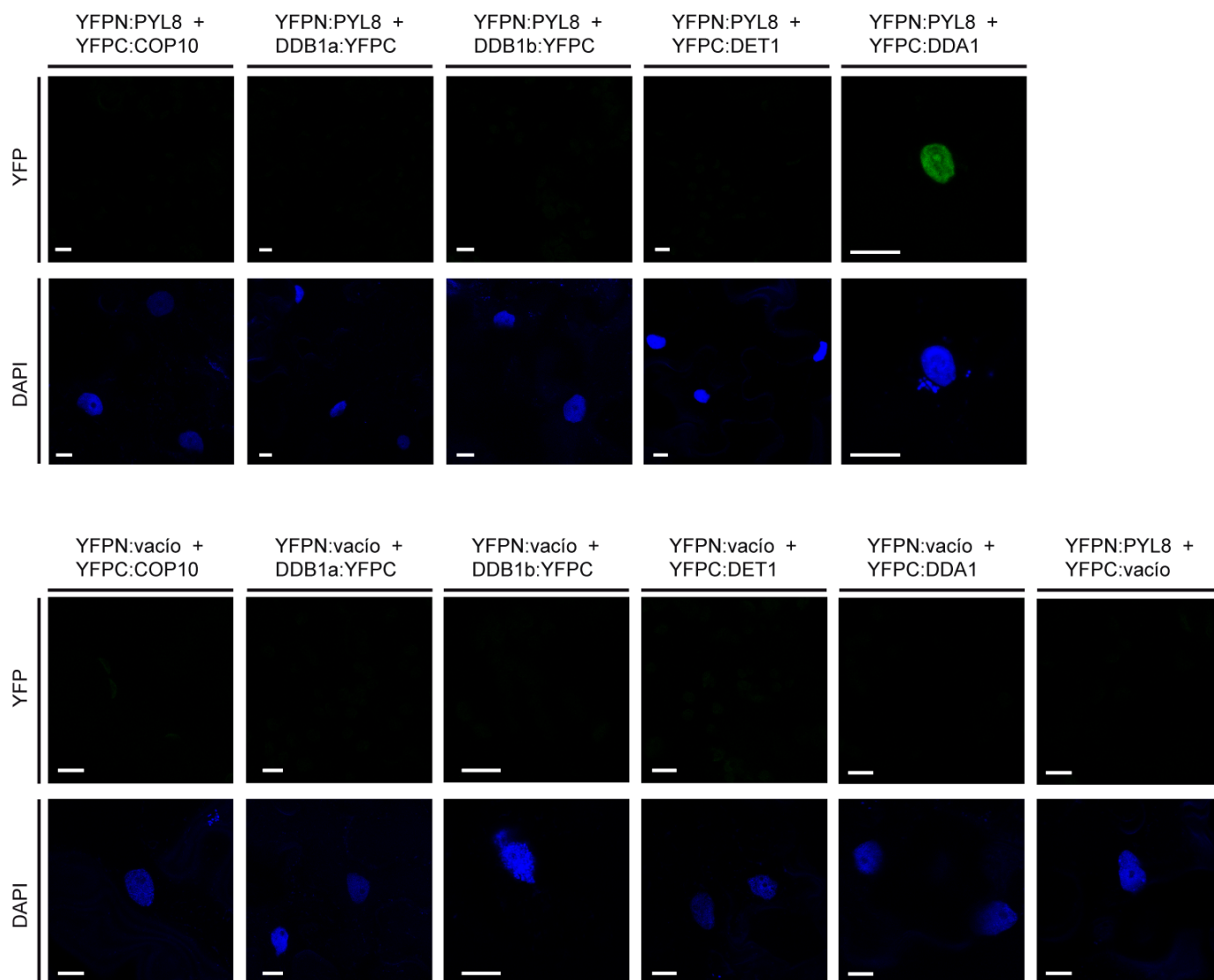


Figura 23: PYL8 interacta in vivo con DDA1 pero no con otros miembros del complejo CDD. Se muestran imágenes del análisis mediante BiFC para chequear la interacción de PYL8 con COP10, DDB1a, DDB1b, DET1 y DDA1. Las imágenes fueron obtenidas con microscopía confocal en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana* expresando las diferentes combinaciones de proteínas, que se indican en la parte superior. La reconstitución de la señal fluorescente de la YFP indica que sólo DDA1 y PYL8 interactúan directamente. En la imagen se muestran además los núcleos teñidos con DAPI. Las barras indican 10 μM .

Se llevó a cabo, además, una tercera aproximación para confirmar la interacción entre DDA1 y los receptores de ABA. Así, se realizó una inmunoprecipitación de DDA1-mTAP expresada en suspensiones celulares PSB-D. La fusión DDA1-mTAP fue incubada con proteínas PYL4, PYL5, PYL8 y PYL9 fusionadas a colas de histidinas, expresadas y purificadas a partir de bacterias. Como se muestra en la figura 24, los receptores fueron co-inmunoprecipitados al incubarse con la resina conjugada con DDA1, pero no en los controles usando resina sin conjugar.

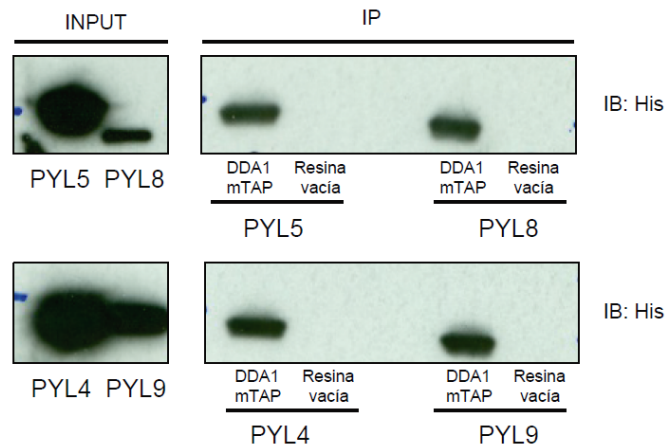


Figura 24: Ensayos de coimmunoprecipitación indican que DDA1 interacciona con diversos miembros de la familia PYL/PYL/RCAR.

La inmunoprecipitación de las fusiones DDA1-mTAP se realizó a partir de extracto total de proteínas de suspensiones celulares PSB-D que sobreexpresan DDA1-mTAP, incubando primero con resina IgG y luego con las proteínas recombinantes purificadas de bacteria que se indican en la parte inferior. Una muestra de estas proteínas purificadas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con el anticuerpo anti-His, para detectar estas proteínas recombinantes fusionadas a histidinas.

6. EL RECEPTOR DE ABA PYL8 SE UBIQUITINA Y DEGRADA POR EL PROTEOSOMA 26S

Estudios previos indican que el complejo CDD facilita la ubiquitinación y subsecuente degradación de proteínas específicas mediante el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) ^{18,27,32}. El hecho de que algunos receptores PYR/PYL/RCAR sean capaces de interactuar con DDA1, un componente del complejo CDD, nos llevó a pensar que podrían ser sustratos del UPS. Para comprobar esta hipótesis, nuestros análisis se centraron en PYL8, ya que se ha demostrado que, a pesar de la elevada redundancia funcional existente en la familia PYR/PYL/RCAR, PYL8 tiene un papel predominante en la ruta de señalización del ABA ¹⁴⁸.

Así, primeramente se comprobó si PYL8 se degrada por el proteosoma 26S, tratando plántulas de *Arabidopsis* que expresan PYL8 fusionado al epítipo HA (oe3HA-PYL8) ¹⁴⁸ con el inhibidor del proteosoma MG132. Mediante western blots usando anticuerpo anti-HA, se observó un incremento en la acumulación de la proteína 3HA-PYL8 en muestras tratadas con MG132, comparadas con plantas sin tratamiento (figura 25A). Además, tras la inhibición del proteosoma, se detectaron bandas de alto peso molecular, que podrían corresponder a isoformas de 3HA-PYL8 poliubiquitinadas.

Para confirmar la posible ubiquitinación de PYL8, se llevó a cabo una purificación de proteínas ubiquitinadas de plántulas *oe3HA-PYL8*, usando la resina comercial "p62 agarose" (p62)¹⁷², que tiene afinidad por las moléculas de ubiquitina y las une de forma no covalente. Western blots usando anticuerpo anti-HA detectaron la presencia de la fusión 3HA-PYL8 y de múltiples bandas de mayor peso molecular cuando las muestras fueron incubadas con resina p62, pero no cuando se usó resina sin afinidad por la ubiquitina, indicando que 3HA-PYL8 está marcado con moléculas de ubiquitina en planta (figuras 25B y 25C).

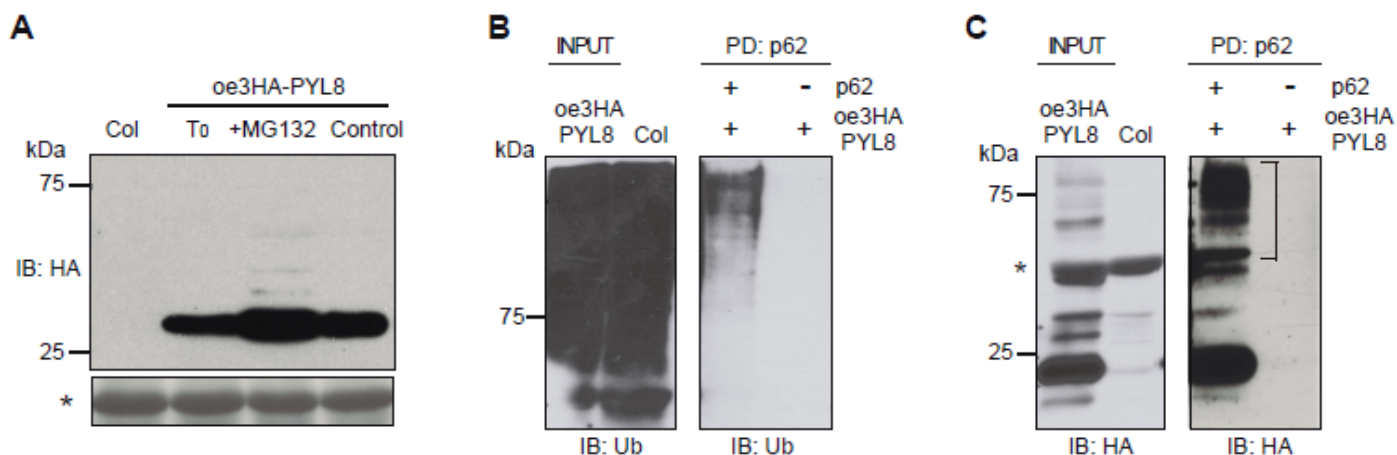


Figura 25: PYL8 se degrada por el sistema ubiquitina proteosoma.

(A) El inhibidor del proteosoma, MG132, estabiliza a 3HA-PYL8. Plántulas *oe3HA-PYL8* fueron tratadas o no durante dos horas con 50 μ M de MG132. Extractos proteicos de plantas recogidas a tiempo 0 (T₀) fueron usados como control. El panel marcado con * indica la posición de la subunidad mayor de la RuBisCo visualizada mediante tinción Ponceau, que fue usada como control de carga.

(B) y (C) Purificación de 3HA-PYL8 poliubiquitinado. Extractos proteicos de 3HA-PYL8 fueron incubados con resina de afinidad por la ubiquitina (p62) o resina de agarosa sin afinidad como control negativo. El anticuerpo anti-Ub fue usado en (B) para detectar el total de proteínas ubiquitinadas. Anti-HA permite la detección de 3HA-PYL8 y sus isoformas poliubiquitinadas [Ub_(n)-3HA-PYL8, indicadas con corchete] en (C). Extractos proteicos de plantas silvestres Col se usaron como control. El asterisco (*) indica la posición de una proteína no específica detectada con anti-HA (control de carga).

7. LA SOBREPRESIÓN DE DDA1 FACILITA LA DEGRADACIÓN DE PYL8

Dado que PYL8 es diana de degradación por el proteosoma, y DDA1 y PYL8 interaccionan físicamente, el siguiente paso fue estudiar si DDA1 está mediando la desestabilización de PYL8. Para ello, se comparó el grado de degradación de la fusión 3HA-PYL8 en plantas sobrepresoras de esta proteína, comparándolas con plantas que sobrepresan *oe3HA-PYL8* en el fondo *oeDDA1-GFP/pyl8-1* (obtenidas mediante cruzamiento). Estos análisis se llevaron a cabo en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX), para evitar cualquier efecto debido a la variación de la expresión del transgén durante el tratamiento. Como resultado, se encontró que la sobrepresión de DDA1-GFP incrementa la degradación de 3HA-PYL8 si lo comparamos con

el ratio de degradación en plantas control (*oe3HA-PYL8/pyl8-1*) (figuras 26A y 26B). Además los tratamientos con ABA limitan la degradación de 3HA-PYL8, aunque este efecto hormonal se ve reducido cuando se sobrexpresas DDA1-GFP (figuras 26A y 26B). Los análisis por qRT-PCR corroboran que ninguno de los efectos observados es causado por cambios en la expresión del transgen *3HA-PYL8* (figura 26D). En estos experimentos, el tratamiento de plantas de ambos genotipos con el inhibidor del proteosoma MG132 atenúa la desestabilización de 3HA-PYL8, confirmando la regulación dependiente del proteosoma de la estabilidad del receptor (figura 26C).

Se sabe que los receptores de ABA PYR/PYL/RCAR se acumulan en semillas donde son capaces de mediar la inhibición de la germinación dependiente de ABA ¹⁷⁶. En este sentido, se analizó si DDA1 también regula los niveles de PYL8 en semilla. Western blots de extractos proteicos de semillas embebidas mostraron que la sobrexpresión de DDA1-GFP reduce la acumulación de 3HA-PYL8, tanto en semillas tratadas con ABA como en semillas no tratadas (figura 27A y 27B). De nuevo, el ABA permitió un incremento en la acumulación del receptor. Análisis por qRT-PCR indicó que cambios en los niveles de 3HA-PYL8 no correlacionan con variaciones en la expresión del transgen correspondiente (figura 27C).

En conjunto, estos datos indican que el ABA y DDA1 juegan un papel opuesto en la regulación de la acumulación de PYL8: mientras que DDA1 facilita la degradación de PYL8, el ABA previene su desestabilización.

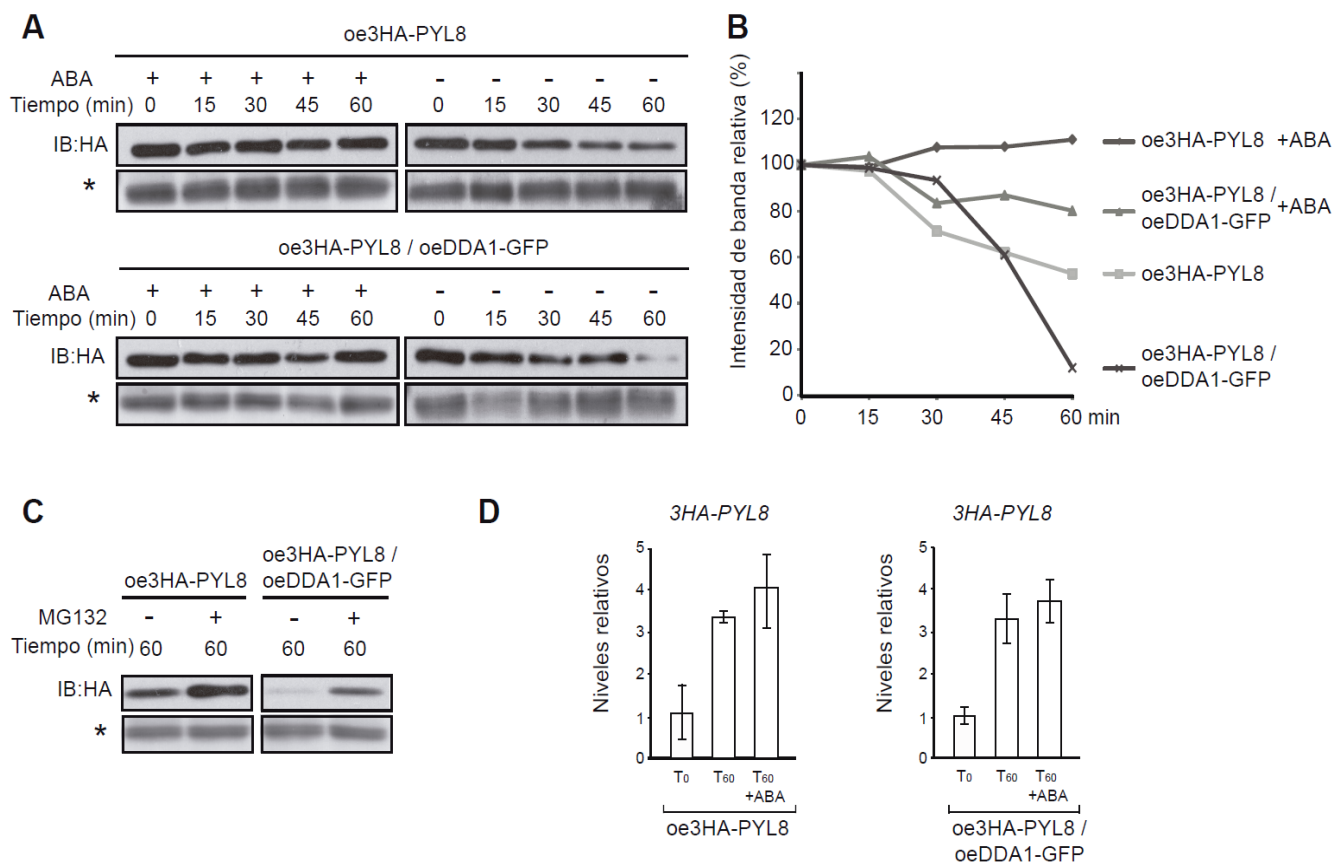


Figura 26: DDA1 facilita la degradación de PYL8 en plántulas.

(A) y (B) Análisis de la abundancia relativa de 3HA-PYL8 en plántulas de 8 días tratadas con 50 μ M de cicloheximida (CLX) en presencia (+) o ausencia (-) de 50 μ M de ABA, y recogidas a diferentes tiempos. El análisis de los niveles de proteínas en (B) se llevó a cabo usando el programa ImageJ. Los paneles marcados con * indican la tinción de la subunidad mayor de la RuBisCo con Ponceau, que fue usada como control de carga.

(C) Western blots mostrando la estabilización de 3HA-PYL8 por el inhibidor del proteosoma MG132 en plantas tratadas con cicloheximida.

(D) Análisis mediante qRT-PCR de la expresión del transgen *3HA-PYL8* en plántulas de 8 días *oe3HA-PYL8/pyl8-1/oeDDA1-GFP* y control (*oe3HA-PYL8/pyl8-1*) tratadas con 50 μ M de cicloheximida durante 60 minutos (T₆₀) y en presencia (+ABA) o ausencia de 50 μ M de ABA. *eEIF1 α* fue usado como control interno. Los niveles de expresión son relativos al tiempo cero (T₀) en cada caso, que fue normalizado a 1. Los datos son la media de tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. Las barras de error representan la desviación estándar.

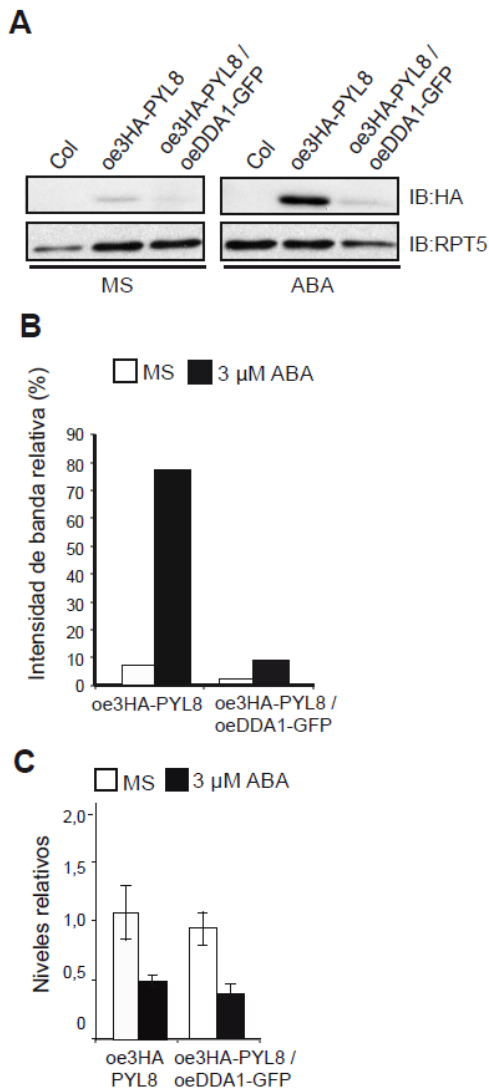


Figura 27: DDA1 facilita la degradación de PYL8 en semillas.

(A) y (B) Análisis de la abundancia relativa de 3HA-PYL8 en semillas embebidas y mantenidas 24 horas en placas de MS o MS con 3 μ M de ABA. (A) Análisis por western blot de los niveles de 3HA-PYL8 usando anticuerpo anti-HA y anti-RPT5. Este último fue usado en el control de carga. El análisis de los niveles de proteínas en (B) se llevó a cabo usando el programa ImageJ.

(C) Análisis de los niveles de expresión del transgen *3HA-PYL8* por qRT-PCR en semillas *oe3HA-PYL8/pyl8-1/oeDDA1-GFP* y control (*oe3HA-PYL8/pyl8-1*). Antes de la extracción de RNA, las líneas fueron embebidas y sembradas durante 24 horas en medio MS con o sin 3 μ M de ABA. *eEIF1 α* fue usado como control interno. Los niveles de expresión son relativos a los niveles en plantas germinadas en MS. Los datos son la media de tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. Las barras de error representan la desviación estándar.

8. LA SOBREPRESIÓN DE DDA1 REDUCE LA SENSIBILIDAD DE LA PLANTA AL ABA.

Nuestros datos indican que DDA1 facilita la degradación de PYL8, y posiblemente la de otros receptores PYR/PYL/RCAR con los que interacciona, lo que apunta a que DDA1 posee un papel regulador negativo en la ruta de señalización del ABA. Para comprobar esta hipótesis, se caracterizaron varias respuestas al ABA en plantas *oeDDA1-GFP*, incluyendo la inhibición de la germinación de las semillas mediada por ABA, del establecimiento de las semillas y del crecimiento de la raíz. Como control, se emplearon plantas silvestres y *oeHAB1* (que sobreexpresan la fosfatasa PP2C HAB1, usada como control de plantas insensibles al ABA)¹⁵⁰.

Comparadas con plantas silvestres, las plantas *oeDDA1-GFP* mostraron una respuesta de sensibilidad reducida a ABA en todos los casos (figuras de 28A a 28C, 28G y 28H). Estos ensayos se realizaron en

colaboración con el grupo del doctor Pedro L. Rodríguez (IBPM-CSIC, Valencia). Además, las líneas oeDDA1-GFP fueron menos sensibles que las silvestres a la inhibición de la germinación mediada por NaCl y manitol; i.e.: salinidad y estrés osmótico, respectivamente; (figuras 28D y 28E), indicando que el efecto de la sobreexpresión de DDA1 es también evidente bajo condiciones de estrés que incrementan los niveles endógenos de ABA^{128,177}. Como control para estos experimentos, se usaron las líneas mutantes insensibles a ABA *coi1-16 (cra1)*¹⁴⁶.

Para confirmar que esta reducción en la sensibilidad a ABA se debe a la sobreexpresión de DDA1, se analizaron plantas de *Arabidopsis* que expresan el cDNA de *DDA1* bajo el control de un promotor inducible por β -estradiol (iDDA1, cedidas por la Dra. Marisa Irigoyen). El porcentaje de establecimiento de semilla de las plantas iDDA1 crecidas en medio MS suplementado o no con ABA o con β -estradiol era indistinguible del de las plantas silvestres. Sin embargo, el ratio de establecimiento de semilla en presencia de ABA se incrementa en plantas iDDA1 tras la inducción de la expresión de DDA1 con β -estradiol (figuras 28F y 28I).

9. LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE DDA1 PROVOCA HIPERSENSIBILIDAD A ABA

Dado que DDA1 tiene un papel regulador negativo en la ruta de señalización de ABA, y su sobreexpresión produce una respuesta de sensibilidad reducida a ABA, cabe esperar que la pérdida de función de DDA1 provoque una respuesta contraria a la hormona. Para confirmar esta hipótesis se generaron líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresan, bajo el promotor constitutivo 35S, un miRNA artificial de DDA1 (amiRNA-DDA1). Los niveles de expresión de *DDA1* en estas líneas sobreexpresoras del miRNA artificial fueron analizados en 2 líneas independientes mediante qRT-PCR (figura 29A). Estas dos líneas presentaban entre 6 y 8 veces menos transcrito de *DDA1* endógeno que las plantas silvestres. Empleando dichas líneas con niveles reducidos de DDA1 se caracterizó el grado de inhibición del establecimiento de las semillas mediado por ABA, NaCl y manitol. Como control, se usaron plantas silvestres y oeDDA1-GFP (líneas de sobreexpresión de DDA1, usadas como control insensible a ABA, salinidad y estrés osmótico).

Comparadas con las plantas silvestres y las líneas de sobreexpresión oeDDA1-GFP, las plantas amiRNA-DDA1 1 y 2 mostraron una respuesta hipersensible a todos los tratamientos (figuras 29B- 29F).

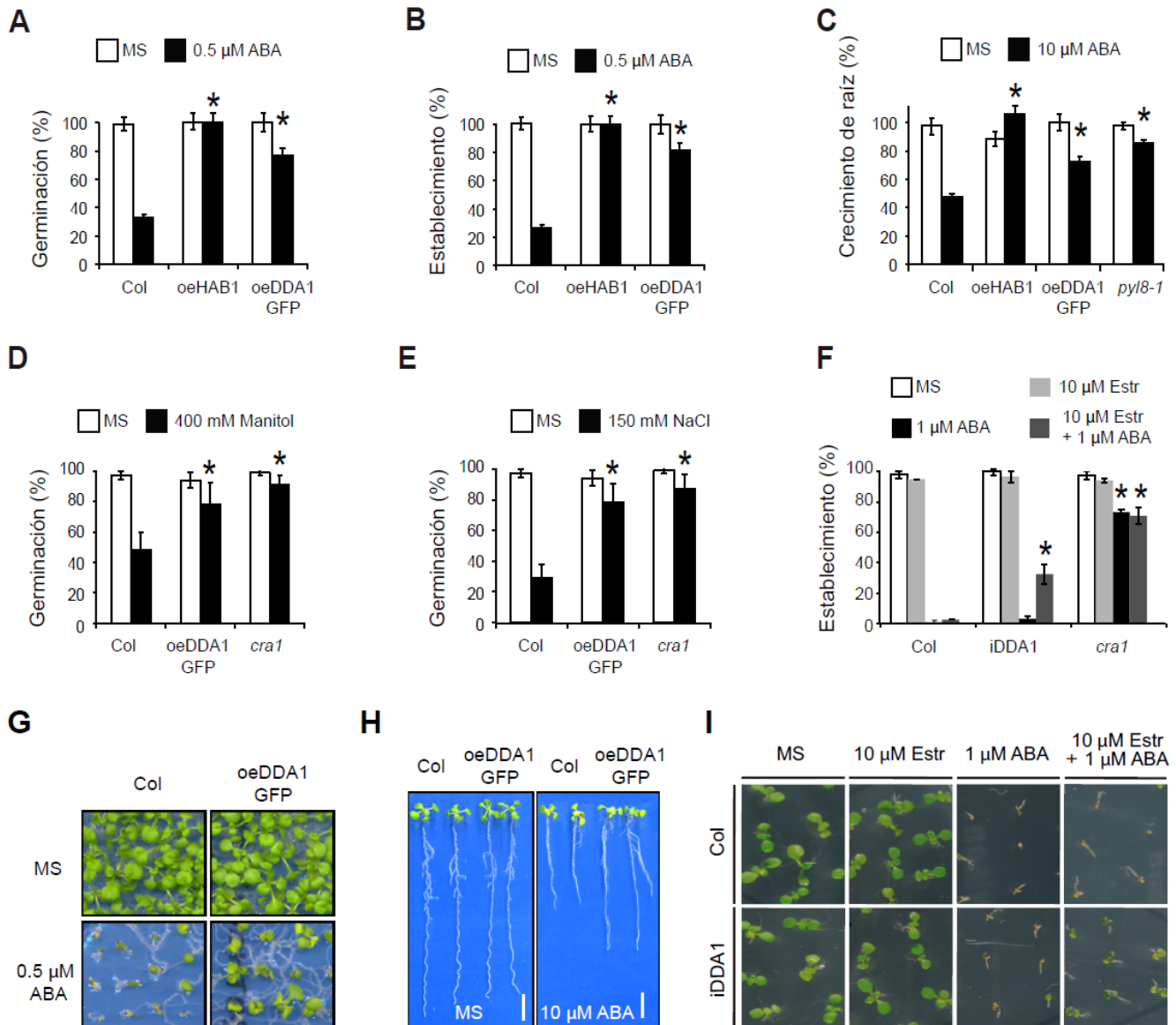


Figura 28: Las plantas que sobreexpresan DDA1 presentan una sensibilidad reducida al ABA.

(A) Porcentaje de semillas germinadas (emergencia radicular) en presencia de 0.5 μ M de ABA a las 72 horas de la siembra. Se analizaron plantas silvestres (Col), oeDDA1-GFP, y oeHAB1 (control insensible al ABA).

(B) Porcentaje de semillas que germinan y desarrollan cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas a los 5 días. Se compararon los mismos genotipos que en (A).

(C) Cuantificación de la inhibición del crecimiento de la raíz mediado por ABA. Se compararon los mismos genotipos que en (A), además de plantas mutantes *pyl8-1*.

(D) y (E) Porcentaje de semillas que germinan a los 5 días en presencia de 400 mM de manitol (D) o 150 mM de NaCl (E). Se analizaron las líneas silvestres (Col), oeDDA1-GFP y *cra-1* (como control insensible a estrés por salinidad y estrés osmótico).

(F) Porcentaje de semillas que germinan y desarrollan cotiledones verdes a los 5 días en presencia o no de 1 μ M de ABA y/o 10 μ M de β -estradiol (Estr.). Se analizaron los genotipos correspondientes a las líneas silvestres (Col), *cra-1* (como control insensible), y plantas que expresan DDA1 bajo el control de un promotor inducible por estradiol (*iDDA1*).

(G) Inhibición del crecimiento mediado por ABA en líneas Col (silvestre) y oe-DDA1-GFP que germinaron en presencia de 0.5 μ M de ABA como en (B). Las fotografías fueron tomadas 10 días después de la siembra.

(H) Reducción de la sensibilidad a la inhibición del crecimiento de las raíces dependiente de ABA en plantas oeDDA1-GFP comparadas con plantas silvestres, analizadas como en (C). Las barras equivalen a 1 cm.

(I) Fotografía de las plantas analizadas en (F), tomadas a los 10 días tras la siembra.

*p < 0.01 (Test t de Student) con respecto a las líneas silvestres sometidas a las mismas condiciones experimentales. En todos los casos, los datos indicados son la media de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). El medio MS fue usado como control en todos los análisis.

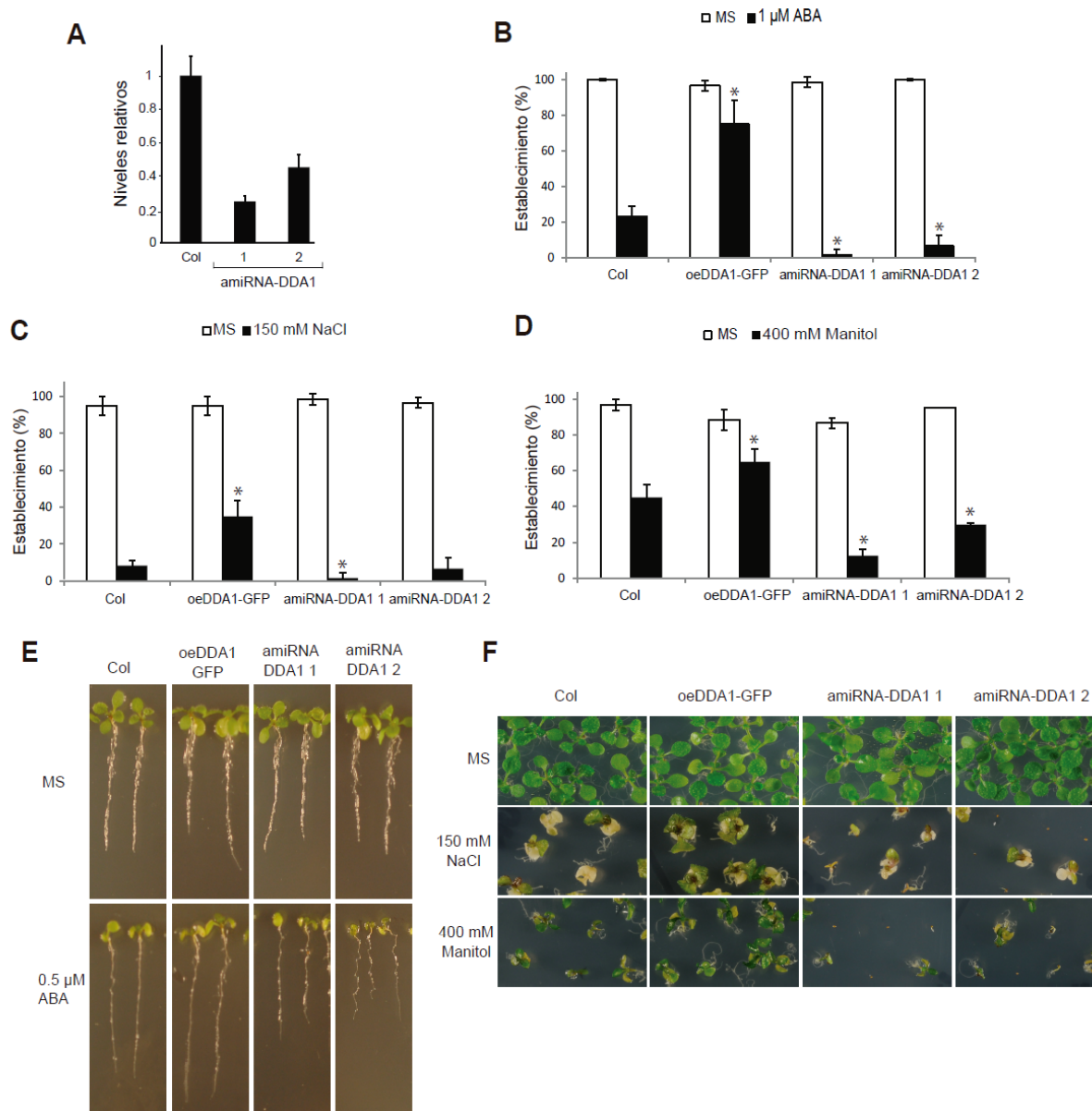


Figura 29: Las plantas con pérdida de función parcial de DDA1 presentan fenotipos de hipersensibilidad a ABA.

(A) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de *DDA1* en dos líneas amiRNA-DDA1 independientes, comparadas con los niveles endógenos de *DDA1* en plantas silvestres (Col). Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas por muestra, con tres réplicas técnicas cada una. *Actina8* fue usado como control interno. Las barras de error representan la desviación estándar.

(B) Porcentaje de semillas que germinan y desarrollan cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas a los 5 días. Se han analizado plantas silvestres (Col), oeDDA1-GFP (control insensible a ABA) y amiRNA-DDA1 1 y 2.

(C) y (D) Porcentaje de semillas que germinan y desarrollan cotiledones verdes a los 5 días en presencia de 400 mM de manitol (D) o 150 mM de NaCl (C). Se analizaron las mismas líneas que en (B).

(E) Inhibición del crecimiento mediado por ABA en líneas Col, oeDDA1-GFP y amiRNA-DDA1 1 y 2. En las fotografías se muestran plantas de 10 días, germinadas y crecidas en medio horizontal suplementado o no con 0.5 μ M de ABA.

(F) Fotografía de las plantas analizadas en (C) y (D), tomadas a los 10 días tras la siembra.

* $p < 0.01$ (Test *t* de Student) con respecto a las líneas silvestres sometidas a las mismas condiciones experimentales. En todos los casos, los datos indicados son la media de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). El medio MS fue usado como control en todos los análisis.

10. LA PÉRDIDA PARCIAL DE FUNCIÓN DE MIEMBROS DEL COMPLEJO CDD CAUSA HIPERSENSIBILIDAD A ABA

Dado que DDA1 de *Arabidopsis* forma parte del complejo CDD, analizamos el fenotipo de diferentes líneas mutantes para los componentes de este complejo cultivadas en presencia de ABA. Así, los análisis de las respuestas a ABA mostraron que mutaciones que provocan pérdida de función parcial de DDB1, DET1 o COP10^{19,21,144} causan una respuesta contraria a la sobreexpresión de DDA1. Así, los mutantes *ddb1a*, *cop10-4* y *det1-1* mostraron una mayor respuesta a la inhibición de la germinación y del establecimiento de la semilla mediado por ABA, cuando las comparamos con las del fenotipo silvestre (figuras 30A, 30B y 30C). En el caso de los mutantes *det1-1*, la respuesta de hipersensibilidad a ABA también se hace evidente al analizar el crecimiento de la raíz (figuras 30D y 30E). Como control, se emplearon plantas silvestres y la línea doble mutante para las fosfatasa ABI1 y HAB1 *hab1-1/abi1-2*¹⁴⁷ (usada como control hipersensible al ABA). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo del doctor Pedro L. Rodríguez (IBMCP-CSIC, Valencia).

A continuación, se analizó si esta respuesta hipersensible al ABA correlaciona con un incremento en la acumulación de PYL8 en mutantes para componentes del complejo CDD. Para ello, se cruzaron plantas *oe3HA-PYL8* con líneas mutantes *cop10-4*. Análisis por western blot de extractos totales de proteínas de semilla mostraron que las líneas mutantes *cop10-4* acumulan más cantidad de proteína 3HA-PYL8 tras el tratamiento con ABA y en condiciones control (figura 31A y 31B). El análisis por qRT-PCR de este mismo material indicó que estos cambios en los niveles de la proteína 3HA-PYL8 no correlacionan con variaciones en la expresión del transgen (figura 31C).

Estos datos indican que todos los componentes del complejo CDD cooperan para regular la estabilidad del receptor de ABA, y modular de esta manera las respuestas a esta hormona.

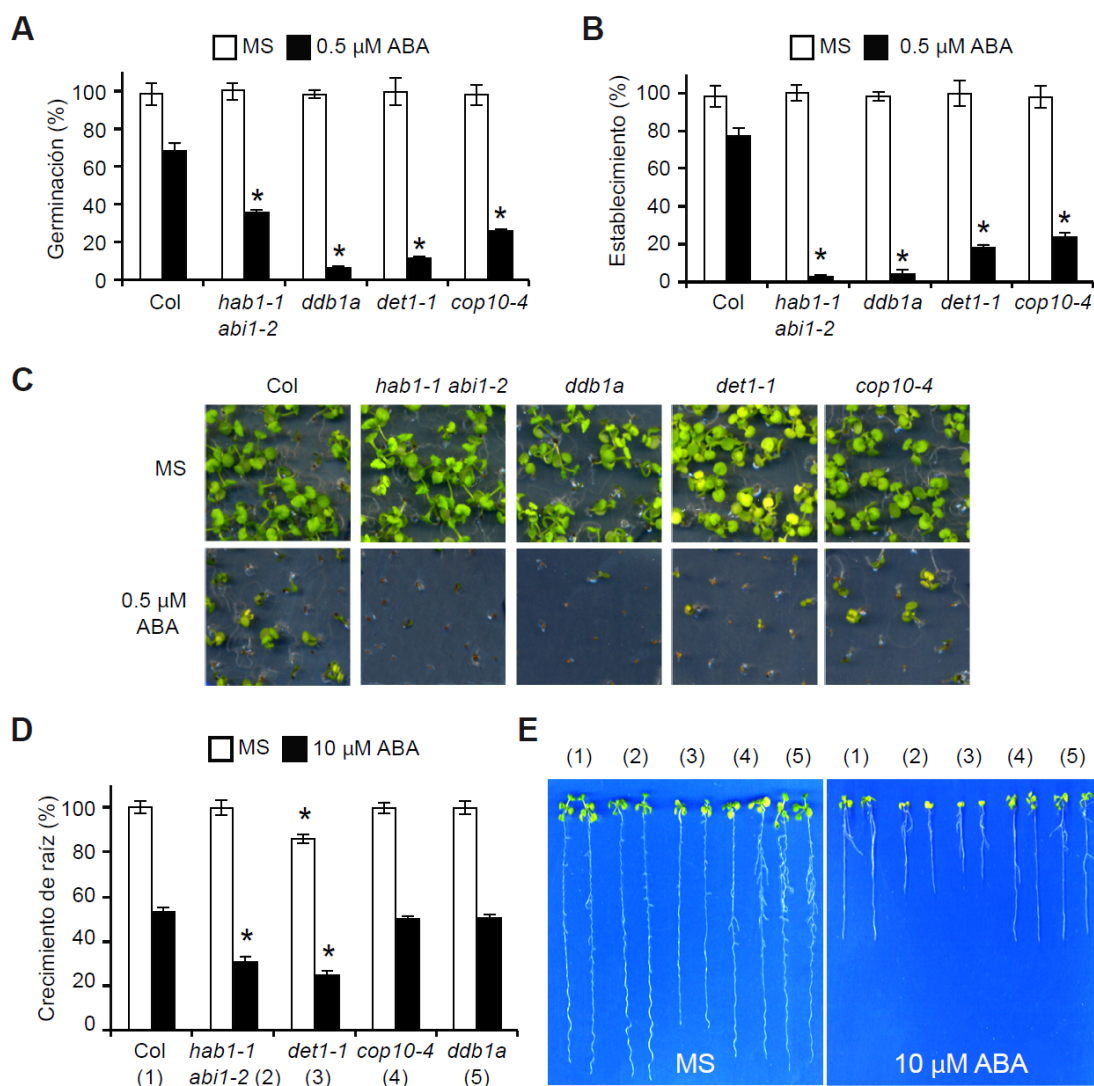


Figura 30: Plantas mutantes hipomorfas para componentes del complejo CDD muestran mayor sensibilidad a ABA.

(A) Comparación del porcentaje de semillas que germinaron (emergencia de la radícula) a los 4 días de la siembra en medio suplementado con 0.5 μ M de ABA, para las líneas silvestre (Col), *hab1-1/abi1-2*, *det1-1*, *cop10-4* y *ddb1a*.

(B) Porcentaje de semillas que germinan y desarrollan cotiledones verdes y el primer par de hojas verdaderas a los 7 días. Los genotipos analizados fueron los mismos que en (A).

(C) Fotografías representativas de plántulas de 10 días crecidas como en (A).

(D) Cuantificación de la inhibición del crecimiento de la raíz mediado por ABA de las líneas silvestre (1) comparadas con *hab1-1/abi1-2* (2), *det1-1* (3), *cop10-4* (4) y *ddb1a* (5). Las semillas fueron germinadas en medio MS y transferidas a placas con 10 μ M de ABA durante 10 días.

(E) Fotografías de plántulas representativas tratadas como en (D).

* $p < 0.01$ (Test t de Student) con respecto a las líneas silvestres sometidas a las mismas condiciones experimentales. En todos los casos, los datos indicados son la media de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). El medio MS fue usado como control en todos los análisis.

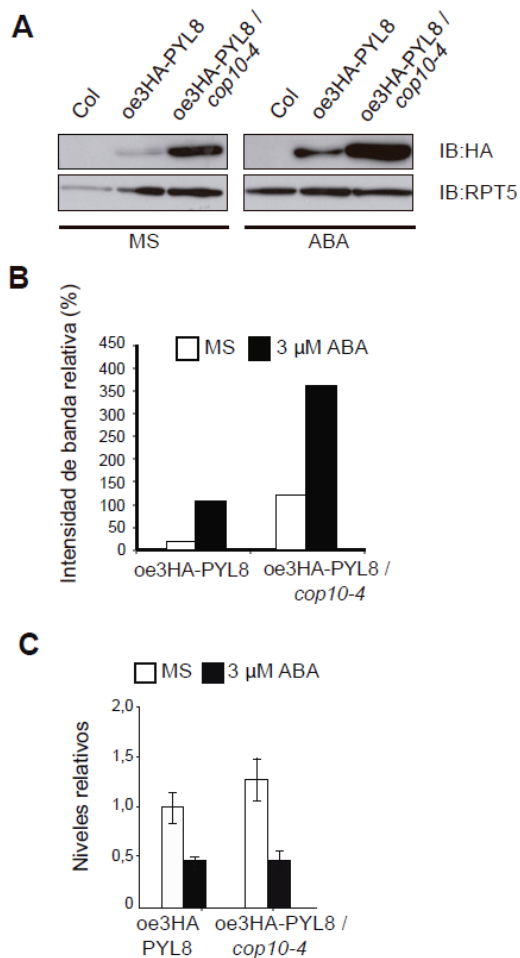


Figura 31: Las semillas mutantes para COP10 acumulan más proteína 3HA-PYL8.

(A) Análisis por western blot de los niveles de proteína 3HA-PYL8 en semillas de líneas oe3HA-PYL8/*pyl8-1* y oe3HA-PYL8/*pyl8-1/cop10-4*. Antes de la extracción de proteínas, las semillas se sembraron en placas de MS con o sin 3 μM de ABA y se mantuvieron durante 24 horas. Se utilizaron los anticuerpos anti-HA y anti-RPT5 para detectar 3HA-PYL8 y en el control de carga, respectivamente.

(B) Análisis de los niveles de proteína mostrados en (A) se llevaron a cabo usando el programa ImageJ.

(C) Análisis de los niveles de expresión del transgen *3HA-PYL8* por qRT-PCR en semillas oe3HA-PYL8/*pyl8-1/cop10-4* y control (oe3HA-PYL8/*pyl8-1*). Antes de la extracción del RNA, las líneas fueron embebidas y sembradas durante 24 horas en medio MS con o sin 3 μM de ABA. El gen *eEIF1α* fue usado como control interno. Los niveles de expresión son relativos a los niveles en plantas germinadas en MS. Los datos son la media de tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. Las barras de error representan la desviación estándar.

11. EL ABA LIMITA LA POLIUBIQUITINACIÓN DE PYL8.

Para caracterizar el mecanismo de acción del ABA en la estabilización de PYL8, primero se analizó si el ABA es capaz de inhibir la interacción entre las proteínas DDA1 y el sustrato PYL8. Para ello, se realizaron experimentos de doble híbrido en levaduras y ensayos de coimmunoprecipitación de las fusiones DDA1-GFP y 3HA-PYL8 expresadas de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana* y en presencia o ausencia de ABA. Como resultado, se observó que el ABA no impide la unión entre DDA1 y PYL8 (figuras 32A y 32B). Además, fuimos capaces de coimmunoprecipitar DDA1-GFP con 3HA-PYL8 solo en plantas tratadas con ABA, lo que sugiere que la protección con ABA de PYL8 también favorece su asociación con DDA1, ya que en ausencia de ABA, PYL8 se degrada rápidamente (figura 32B).

Se comprobó a continuación si los niveles de ABA afectan al ratio de ubiquitinación de PYL8. Para ello, se purificaron proteínas conjugadas con ubiquitina a partir de líneas oe3HA-PYL8, después de un tratamiento con ABA. Como se puede observar en la figura 32C, se detectan menos bandas de 3HA-PYL8 poliubiquitinado tras el tratamiento con ABA comparado con el control sin tratar, indicando que el ABA reduce la poliubiquitinación de PYL8.

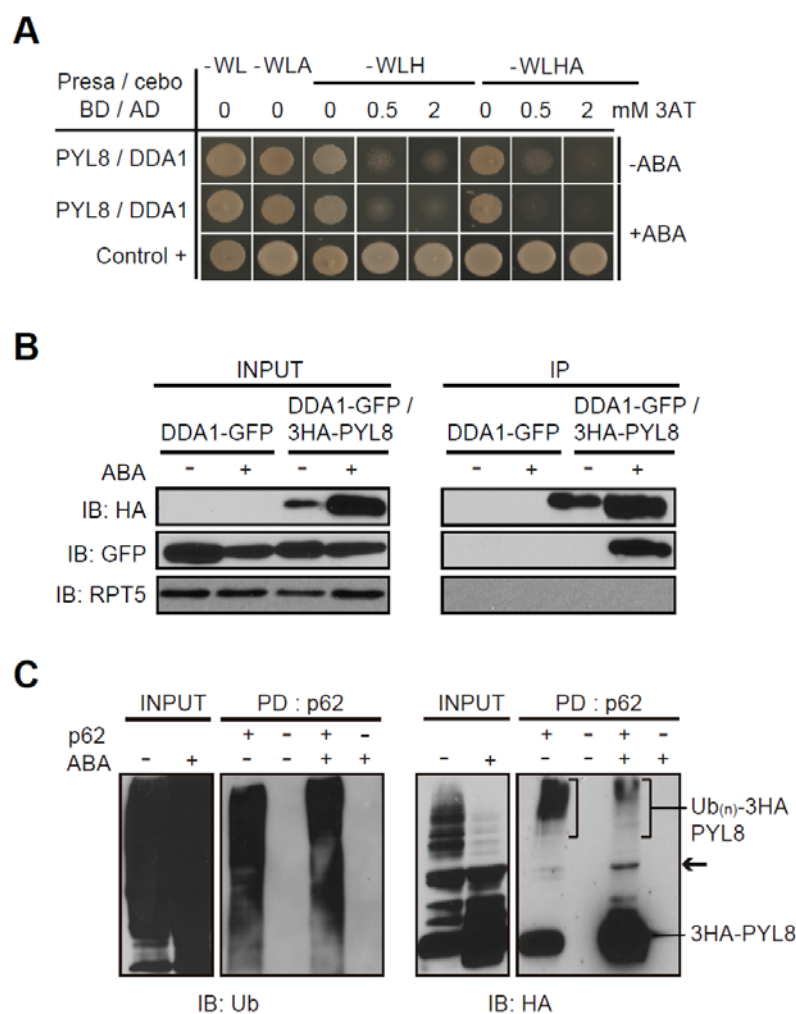


Figura 32: El ABA reduce la poliubiquitinación de PYL8 pero no su interacción con DDA1.

(A) En ABA no impide la interacción entre PYL8 y DDA1 en ensayos de Y2H. Levaduras transformadas con los vectores indicados fueron cultivadas en placas selectivas con o sin 100 μ M de ABA. Los medios selectivos contienen diferentes concentraciones de 3AT (desde 0 a 2 mM). Los clones pGAD-T y pGBK-53 (clontech) fueron usados como control positivo (control +).

(B) DDA1-GFP se une in vivo a 3HA-PYL8 en presencia de ABA. 3HA-PYL8 y DDA1-GFP fueron expresados transitoriamente en hojas de 3 semanas de *N. benthamiana* tratadas con MG132 y en presencia o ausencia de 50 μ M de ABA. Los extractos totales (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron sometidos a análisis por inmunoblot con anticuerpos anti-GFP y anti-HA. Western blots frente al anticuerpo anti-RPT5 fueron usados como control de carga.

(C) Los tratamientos con ABA reducen la poliubiquitinación de PYL8. Para realizar la purificación de proteínas ubiquitinadas, los extractos de proteína total obtenidos de plántulas oe3HA-PYL8/pyl8-1 tratadas o no con MG132 y ABA, fueron incubados con resina p62, o resina de agarosa sin afinidad por la ubiquitina como control negativo. Se usó anticuerpo anti-ubiquitina para detectar el total de proteínas ubiquitinadas. El anticuerpo anti-HA se utilizó para detectar 3HA-PYL8 y sus isoformas poliubiquitinadas [Ub_(n)-3HA-PYL8, indicadas con corchete]. La flecha indica la posición de una proteína no específica detectada con anti-HA (usada como control de carga).

12. EL ABA MODULA EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS CRL4-CDD.

Dado que el ABA no impide la interacción entre DDA1 y PYL8, pero sí reduce la poliubiquitinación del receptor, se analizó si el ABA afecta al ensamblaje de los complejos CRL4-CDD. Para ello, se testó la capacidad de interacción entre proteínas que forman parte de estos complejos tras el tratamiento con ABA.

Así, se analizó la asociación entre dos miembros del complejo CDD (DDA1 y COP10) en líneas transgénicas estables que sobreexpresan DDA1-GFP y FLAG-COP10 (oeDDA1-GFP/oeFLAG-COP10), usando la línea sobreexpresora de FLAG-COP10 (oeFLAG-COP10²⁸) como control. Cuando DDA1-GFP fue inmunoprecipitado a partir de plantas tratadas con ABA, FLAG-COP10 fue coimmunoprecipitado al mismo nivel que en plantas control sin tratar (figura 33A). Este resultado sugiere que la asociación entre DDA1 y COP10 no es dependiente de la presencia o ausencia de ABA. Como DDA1 no interactúa directamente con COP10, podemos extrapolar este resultado a la relación de DDA1 con el resto de componentes del complejo CDD. Así, suponemos que el tratamiento con ABA no afecta a la interacción directa entre DDB1a y DDB1b con DDA1, y tampoco debe afectar a su asociación con DET1.

También se analizó si la asociación entre DDA1 y CUL4 se está viendo afectada por la presencia de la hormona. Para ello se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación con líneas oeDDA1-GFP. Como se muestra en la figura 33B, CUL4 no coimmunoprecipita con DDA1-GFP tras el tratamiento con ABA. Además, se llevó a cabo el mismo experimento en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX). En estas condiciones, la pérdida de asociación entre DDA1-GFP y CUL4 causada por el ABA sigue siendo detectable (figura 33C). Con lo cual, este efecto no depende de variaciones a nivel transcripcional en respuesta al ABA, sino que el mecanismo por el cual el ABA impide el ensamblaje del complejo requiere factores que están presentes antes del incremento de los niveles de la hormona. Con este experimento también podemos concluir que este proceso ocurre en la célula rápidamente (es detectable a las 3 horas del inicio del tratamiento).

Usando plántulas oeDET1-GFP²¹, oeFLAG-COP10²⁸, oeFLAG-DDB1b²⁵ y TAP-COP1⁸⁰ comprobamos que el tratamiento con ABA también afecta a otros componentes del complejo CDD en su asociación con CUL4 (figura 33D, 33E, 33F), pero no a otras proteínas adaptadoras de sustrato que forman parte de los complejos CRL4, como COP1 (figura 33G). Con lo cual, el tratamiento con ABA impide la asociación del complejo CDD con CUL4, y este efecto sobre el ensamblaje afecta específicamente a este tipo de complejos.

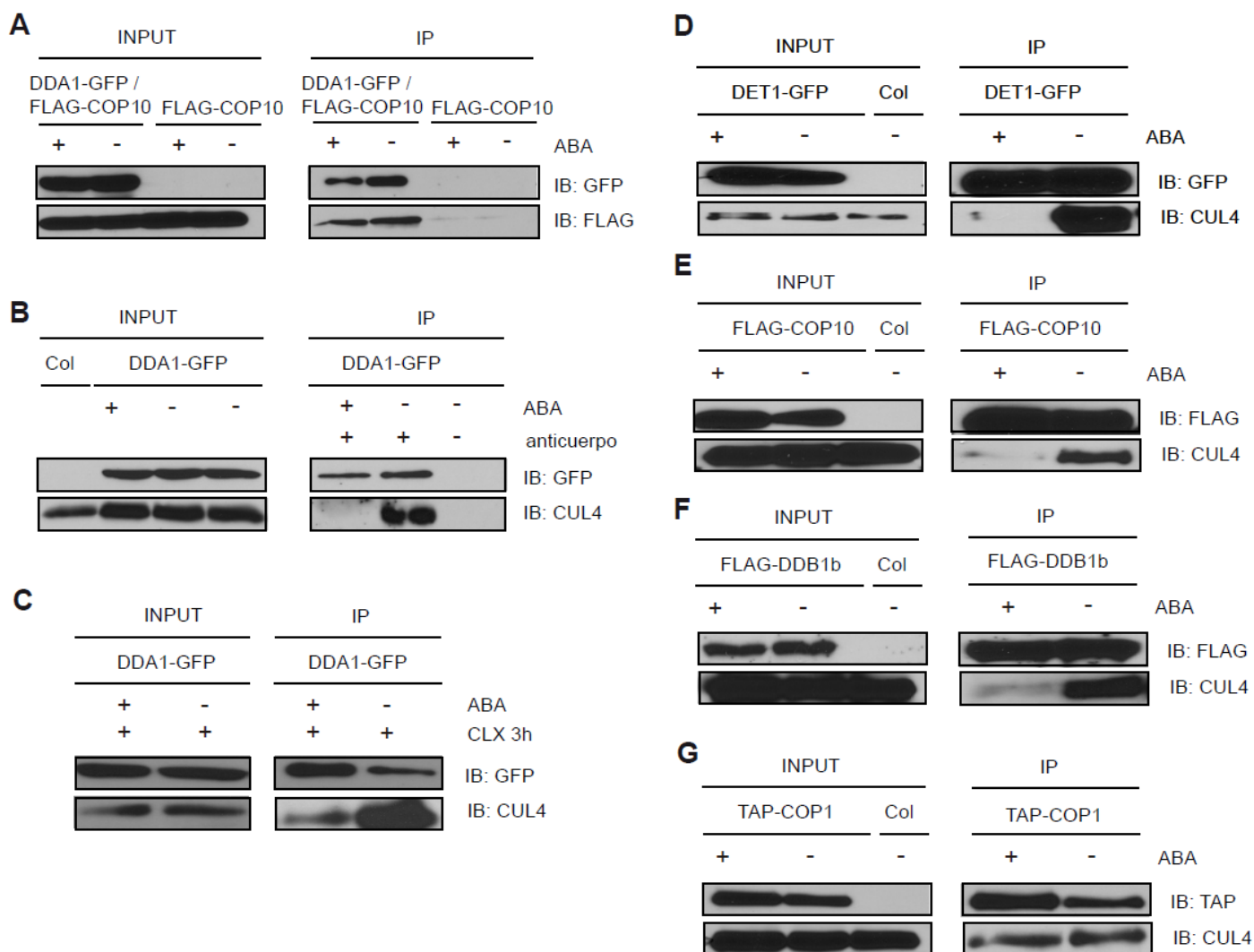


Figura 33: El ABA impide la asociación del complejo CDD con CUL4.

(A) DDA1-GFP se une in vivo a FLAG-COP10 en presencia de ABA. La inmunoprecipitación de las fusiones DDA1-GFP se realizó a partir de un extracto total de proteínas de plántulas *oeDDA1-GFP/oeFLAG-COP10* y *oeFLAG-COP10* de 7 días tratadas con MG132 y en presencia (+) o ausencia (-) de 50 μ M de ABA. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP y anti-FLAG, para detectar DDA1-GFP y FLAG-COP10, respectivamente.

(B-C) DDA1-GFP no se asocia con CUL4 en presencia de ABA. Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo como en (A), usando extracto proteico de plántulas *oeDDA1-GFP* de 7 días. Se usaron anticuerpos anti-GFP y anti-CUL4 para detectar DDA1-GFP y CUL4, respectivamente. Se incluye también un control en el cual el extracto proteico no se incubó con anticuerpo anti-GFP.

(C) Ensayos de coimmunoprecipitación usando extracto proteico de plántulas *oeDDA1-GFP* de 7 días tratadas durante 3 horas con MG132 y cicloheximida (50 μ M) y en presencia (+) o ausencia (-) de 50 μ M de ABA. Se usaron los mismos anticuerpos que en (B).

(D-G) El ABA reduce la asociación del complejo CDD con CUL4. Se muestra la inmunoprecipitación usando extracto proteico de plántulas *oeDET1-GFP* (D), *oeFLAG-COP10* (E), *oeFLAG-DDB1b* (F) y *oeTAP-COP1* (G) de 7 días, tratadas con MG132 y en presencia (+) o ausencia (-) de 50 μ M de ABA. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP, anti-FLAG, anti-PAP y anti-CUL4 para detectar DET1-GFP, FLAG-COP10, FLAG-DDB1b, TAP-COP1 y CUL4, respectivamente.

13. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN EL ESTADO DE NEDILACIÓN DE LA CUL4 MEDIADOS POR ABA.

Estudios previos han determinado que, en *Arabidopsis*, los ciclos de nedilación/denedilación de las culinas son necesarios para el correcto funcionamiento de los complejos CRL, ya que protegen a sus componentes de la autodegradación¹¹², al mismo tiempo que permiten la unión de nuevos adaptadores de sustrato⁷. Así, la nedilación de CUL4 está relacionada con un incremento en la actividad de estos complejos, ya que CUL4 nedilada es capaz de interactuar con los módulos adaptadores de sustrato que reconocen a la proteína a ubiquitinar¹⁸. De acuerdo con esta idea, los complejos que contienen DDA1, que actúan como adaptadores de sustrato, deben estar principalmente asociados con CUL4 en su estado nedilado. Confirmamos esta teoría mediante dos aproximaciones experimentales; la primera, analizando mediante ensayos de coimmunoprecipitación el estado de nedilación de la fracción de CUL4 que se asocia con DDA1-GFP. Como control para determinar la posición de la banda correspondiente a CUL4 nedilada, usamos extracto de proteína del mutante *cop9-1*¹⁴⁸, que presenta niveles incrementados de culinas nediladas. De esta manera pudimos concluir que la mayoría de CUL4 asociada con DDA1 está modificada con nedilación (figura 34A). La segunda aproximación consistió en analizar si CUL4 denedilada es capaz de asociarse con DDA1-GFP. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación en líneas oeDDA1-GFP tratadas con MLN4924, que es un inhibidor de la enzima E1-activadora de la nedilación¹⁰². Así, al igual que ocurre tras el tratamiento con ABA, fuimos capaces de detectar menos CUL4 asociada con DDA1-GFP en presencia del inhibidor (figura 34B), confirmando que DDA1 se asocia fundamentalmente a complejos proteicos que contienen CUL4 nedilada.

La proteína CAND1 está implicada en la regulación de los complejos CRL E3 ubiquitina ligasas. CAND1 es capaz de unirse a las culinas en su estado denedilado, ocupando físicamente el lugar de unión de los módulos adaptadores de sustrato¹¹⁴. Tras confirmar que los complejos que contienen a DDA1 son capaces de unirse a complejos de CUL4 en su estado nedilado, y que esta asociación disminuye tras el tratamiento con ABA, analizamos si la asociación entre CUL4 y CAND1 también se ve afectada por la hormona. Para ello usamos líneas transgénicas estables que sobreexpresan FLAG-CAND1 (oeFLAG-CAND1/*cand1-1*) tratadas o no con 50 μ M de ABA. Cuando FLAG-CAND1 fue inmunoprecipitado de plantas tratadas con ABA, CUL4 fue detectado en unos niveles similares que en plantas control sin tratar (figura 34C), no pudiendo concluir que la presencia de la hormona esté afectando a la capacidad de asociación global entre CUL4 y CAND1.

Posteriormente, analizamos la asociación entre DDA1-GFP y CAND1 en presencia o ausencia de ABA. Como se muestra en la figura 34D, claramente CAND1 no se encuentra entre las proteínas que inmunoprecipitan junto con DDA1, en ninguna de las condiciones analizadas. Este resultado indica que DDA1 y CAND1 no coexisten en el mismo complejo, lo que es consistente con el hecho de que CAND1 preferentemente interactúa con las culinas no modificadas, inhibiendo la interacción entre la culina y su adaptador de sustrato, y regulando negativamente la actividad enzimática de estos complejos¹¹⁴.

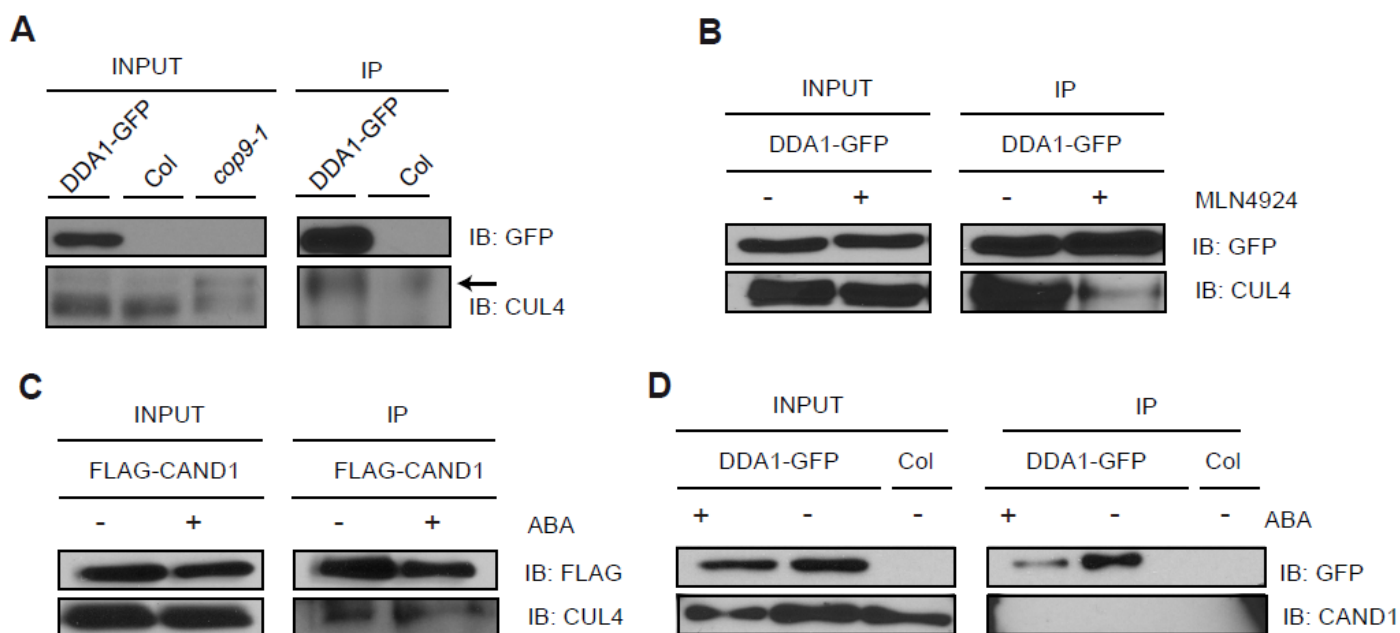


Figura 34: Formación de complejos DDA1-CUL4 y CUL4-CAND1 dependiente del estado de nedilación/denedilación de la CUL4 y el ABA.

(A y B) DDA1 se asocia preferentemente con CUL4 nedilada. (A) Ensayos de inmunoprecipitación de DDA1-GFP a partir de extracto total de plántulas *oeDDA1-GFP* y *Col* de 7 días tratadas con MG132. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP y anti-CUL4, para detectar DDA1-GFP y CUL4, respectivamente. Como control para discernir entre la banda nedilada (señalada con flecha) y denedilada de la CUL4 se usó extracto de proteína total de la línea mutante *cop9-1*. (B) Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo como en (A), usando extracto proteico de plántulas de 7 días *oeDDA1-GFP* tratadas con MG132 e incubadas o no con 10 μM de MLN4924.

(C) La asociación entre CAND1 y CUL4 no es dependiente de ABA. Extractos totales de proteínas de plántulas de 7 días *oeFLAG-CAND1/cand1-1* tratadas o no con MG132 y 50 μM de ABA fueron incubados con resina anti-FLAG M2. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-FLAG y anti-CUL4, para detectar FLAG-CAND1 y CUL4, respectivamente.

(D) DDA1 no se asocia con CAND1. Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo como en (A), usando extractos proteicos de plántulas *oeDDA1-GFP* y *Col* de 7 días tratadas o no con MG132 y 50 μM de ABA. Se usaron anticuerpos anti-GFP y anti-CAND1, para detectar DDA1-GFP y CAND1, respectivamente.

14. DDA1 INTERACCIONA CON COMPONENTES DEL SIGNALOSOMA, Y ESTA INTERACCIÓN INCREMENTA EN PRESENCIA DE ABA.

En *Arabidopsis*, los procesos de nedilación/denedilación de CUL4 son necesarios para la correcta funcionalidad de los complejos CRL4 *in vivo*, y este proceso está regulado por el complejo CSN, que consta de varias subunidades. CSN5 posee actividad denedilasa, con lo cual, el complejo CSN denedila a las culinas favoreciendo la asociación con CAND1 e inhibiendo la actividad de los complejos CRL¹¹⁴.

Se ha descrito en humanos que la proteína hDda1 se asocia con subunidades del complejo Csn³³. Para comprobar si dicha asociación también ocurre en *Arabidopsis*, se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación, empleando distintas fusiones de DDA1. Como se muestra en la figura 35A, DDA1 interacciona con dos subunidades del complejo CSN: CSN5 y CSN3. Además, otros miembros del complejo CDD como COP10 también son capaces de coimmunoprecipitar con CSN5 (figura 35B). Estos resultados confirman la asociación de los complejos que contienen a DDA1 con CSN en *Arabidopsis*.

Para analizar si existen cambios en esta asociación en presencia de ABA, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación tipo TAP a partir de cultivos celulares de *Arabidopsis* transformados con la construcción DDA1-Gsrhino. Entre las proteínas que coimmunoprecipitan con DDA1-Gsrhino aparece CSN5, y esta asociación se incrementa levemente (pero de manera significativa) tras el tratamiento del cultivo con 50 μ M de ABA durante 2 horas (figura 35C). Este resultado sugiere que, en presencia de la hormona, los complejos que contienen a DDA1 están más accesibles a la unión con CSN, el cual facilitaría la desestabilización del complejo CRL4-CDD, mediante la denuclilación de CUL4.

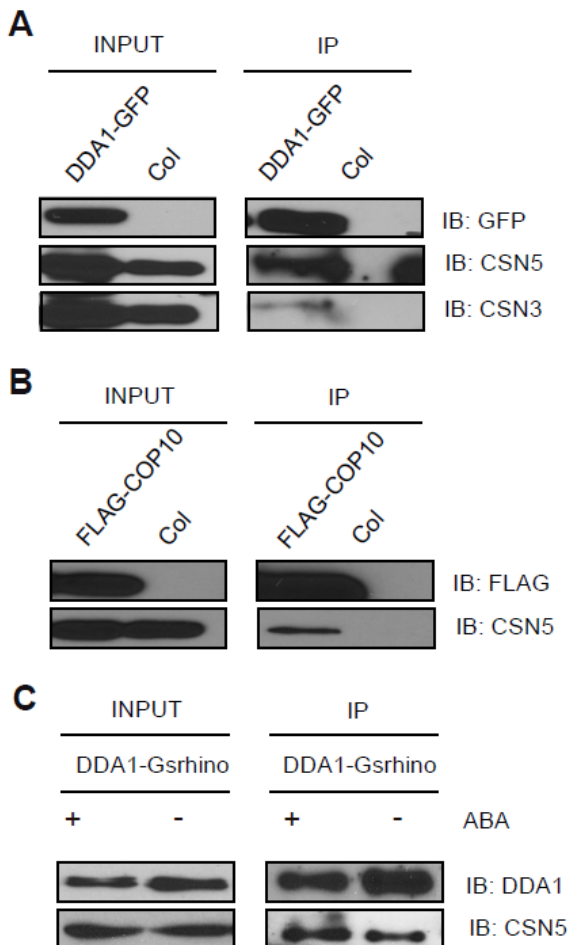


Figura 35: El complejo CDD interacciona con subunidades del complejo CSN, y esta asociación se incrementa en presencia de ABA.

(A) Inmunoprecipitación de las fusiones DDA1-GFP a partir de extracto total de plántulas oeDDA1-GFP y Col de 7 días. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP, anti-CSN5 y anti-CSN3, para detectar DDA1-GFP y las subunidades del signalosoma CSN5 y CSN3, respectivamente.

(B) Ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo como en (A), usando extractos proteicos de plantas oeFLAG-COP10 y Col de 7 días. Se usaron los anticuerpos anti-FLAG y anti-CSN5, para detectar FLAG-COP10 y CSN5, respectivamente.

(C) Inmunoprecipitación tipo TAP de las fusiones DDA1-Gsrhino a partir de extracto total de suspensiones celulares de 3 días tratadas (+) o no (-) durante 2 horas con 50 μ M de ABA. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-DDA1 y anti-CSN5, para detectar DDA1-Gsrhino y la subunidad del signalosoma CSN5.

15. EL ABA PROVOCA CAMBIOS GENERALES EN EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS QUE CONTIENEN A DDA1, CUL4 Y CAND1.

El análisis de fraccionamiento por filtración en gel mediante columnas de FPLC (cromatografía de exclusión molecular) de plántulas *oeDDA1-GFP*, muestra que DDA1-GFP predominantemente eluye en fracciones próximas a los 650 kDa (figura 36, panel superior), existiendo un pico menos abundante cerca de 14 kDa que podría corresponder a DDA1-GFP en forma monomérica. Tras el tratamiento con ABA, el pico de elución mayoritario se desplaza hacia fracciones de menor peso molecular, al mismo tiempo que se incrementa la cantidad de proteína en forma monomérica. Estos resultados correlacionan con el desensamblaje del complejo en presencia de ABA indicado en apartados anteriores.

Por otro lado, los complejos que contienen a CUL4, que en condiciones normales eluyen en fracciones correspondientes a proteínas de 450 kDa, aproximadamente, pasan a formar parte de complejos de mayor peso molecular tras el tratamiento con ABA, tal y como se puede observar en los paneles 3 y 4 de la figura 36.

En el caso del complejo CSN, en western bots empleando anti-CSN3 y anti-CSN5 se observan ambas proteínas en fracciones correspondientes a una tamaño de 500 kDa (figura 36, paneles 5, 6, 7 y 8), existiendo cofraccionamiento con DDA1-GFP, CUL4 y CAND1. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos de tamaño tras el tratamiento con ABA. En el caso de la proteína CAND1, esta aparece en fracciones correspondientes a proteínas de unos 300 kDa, y tras el tratamiento con ABA, la mayoría de la proteína detectada pasa a formar parte de complejos de menor peso molecular (aproximadamente 200 kDa, figura 36, paneles 9 y 10).

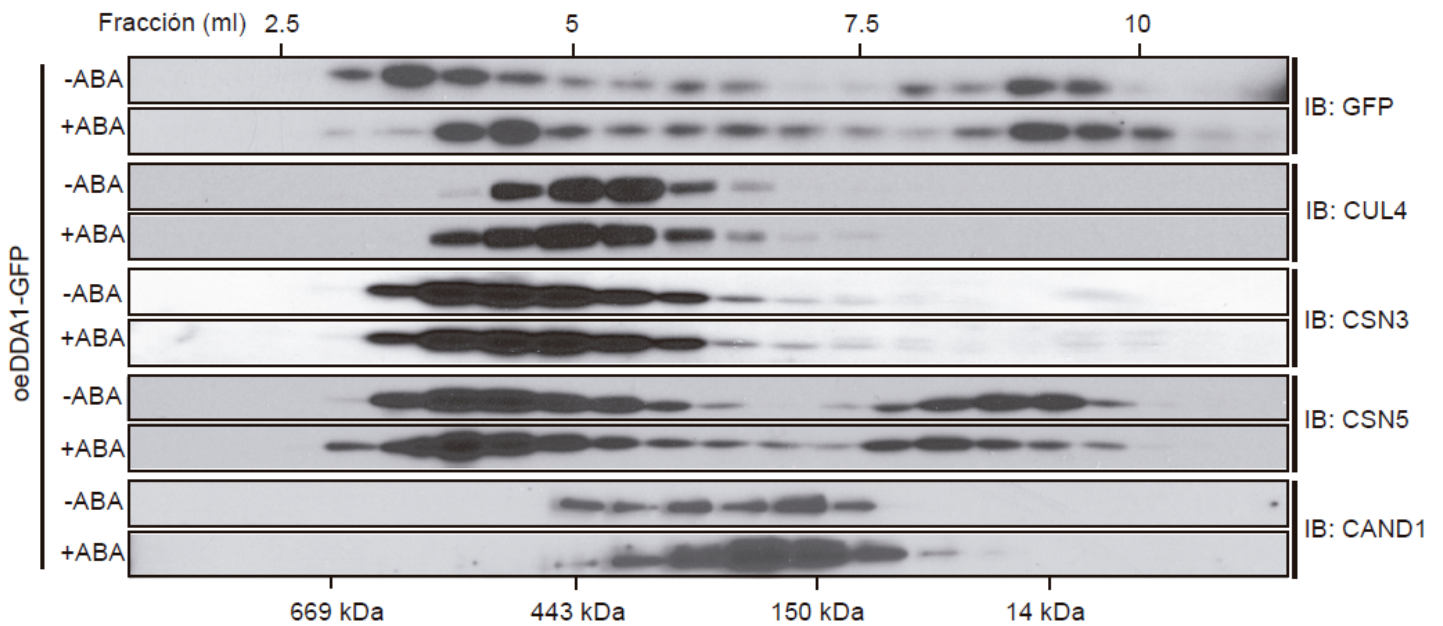


Figura 36: Caracterización del patrón de fraccionamiento en ensayos de cromatografía por exclusión molecular de los complejos CRL4-CDD e interactores tras el tratamiento con ABA. Extractos proteicos purificados a partir de plántulas *oeDDA1-GFP* de 7 días tratadas (+) o no (-) con 50 μ M de ABA, fueron separados y fraccionados con una columna "Superdex 200 Increase 10/300 GL". Se recogieron fracciones de 0.5 mL y se analizaron por western blot (IB) con anticuerpos anti-GFP (para detectar DDA1-GFP), anti-CUL4, anti-CSN3, anti-CSN5 y anti-CAND1.

16. LAS GIBERELINAS FAVORECEN EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS CDD Y CRL4, Y LA POLIUBIQUITINACIÓN DE PYL8.

Según los resultados explicados anteriormente, los complejos que contienen a DDA1 tienen un papel regulador negativo en la respuesta a ABA, controlando, entre otros procesos, la germinación de la semilla cuando los niveles de dicha hormona disminuyen.

Las giberelinas (GAs) poseen también una función clave durante la germinación, desempeñando un papel antagónico al ABA en el control de este proceso ¹²⁰. Por ello, quisimos comprobar si las giberelinas y el ABA también juegan un papel opuesto en el control de la estabilidad de los complejos CRL4-CDD. Así, analizamos en primer lugar si la presencia o no de giberelinas afecta a la asociación entre DDA1 y CUL4. Para ello se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación con líneas *oeDDA1-GFP* en presencia de ABA, GAs o ambas. Como se muestra en la figura 37A, CUL4 no coimmunoprecipita con DDA1-GFP tras el tratamiento con ABA, tal y como mostramos anteriormente (figura 33B). Sin embargo, al hacer un tratamiento con giberelinas, o con ambas fitohormonas, fuimos capaces de coimmunoprecipitar más CUL4 asociada con DDA1-GFP que en los controles sin tratar. Además, se llevó a cabo el mismo experimento en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX), y en estas condiciones, el efecto de las giberelinas sigue siendo evidente en la asociación DDA1-GFP y CUL4 (figura 37B). Estos resultados nos indican que las giberelinas incrementan la

estabilidad de los complejos CRL4-CDD, y que, al igual que ocurre con el ABA, el efecto de las giberelinas sobre el ensamblaje del complejo no depende de cambios transcripcionales.

En segundo lugar, se analizó si las giberelinas también alteran la asociación del complejo CSN con DDA1. Para ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación tipo TAP a partir de cultivos celulares de *Arabidopsis* transformados con la construcción DDA1-Gsrhino en presencia o no de GAs. Se observó que CSN5 está menos asociado con DDA1-Gsrhino tras el tratamiento con GAs (figura 37C), siendo este efecto el opuesto al observado en presencia de ABA.

Por último, quisimos comprobar si este efecto modulador de las giberelinas se hace evidente en la regulación de la estabilidad de las dianas del complejo. Para ello, se comprobó si los niveles de GAs afectan al grado de ubiquitinación de PYL8. Con este fin, se purificaron proteínas conjugadas con ubiquitina a partir de líneas oe3HA-PYL8, después de un tratamiento con ABA y con GAs, y se comparó con los niveles de modificación en diferentes controles. Como se puede observar en la figura 37D, se pueden detectar menos bandas de 3HA-PYL8 poliubiquitinado tras el tratamiento con ABA comparado con el control sin tratar. Sin embargo, al añadir además GAs, somos capaces de detectar más poliubiquitinación de PYL8, indicando que la presencia de giberelinas contribuye a la estabilización del complejo CRL4-CDD, revirtiendo el efecto inactivador del ABA.

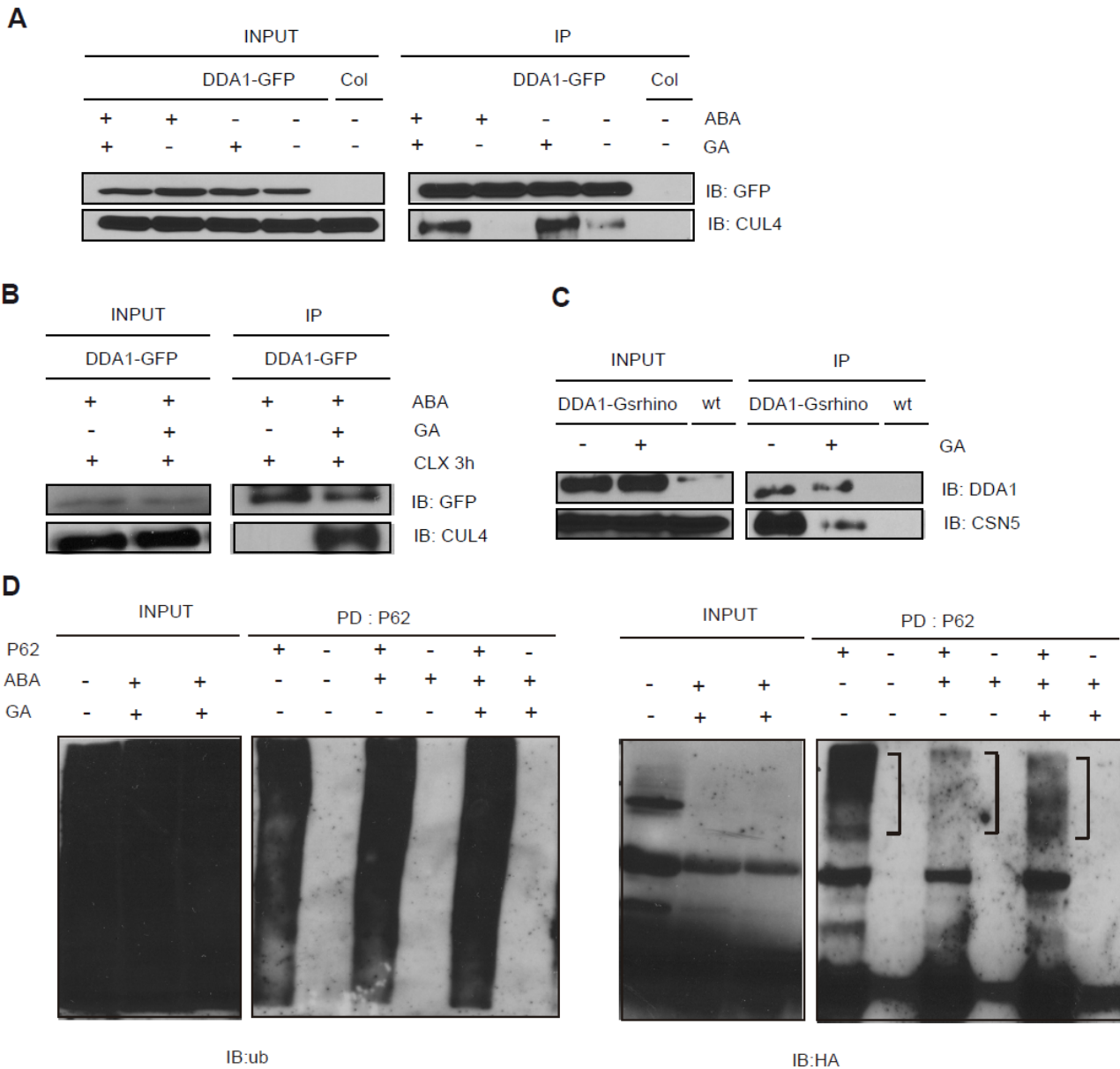


Figura 37: (A y B) El tratamiento con giberelinas incrementa la estabilidad del complejo CRL4-CDD. (A) La inmunoprecipitación de las fusiones DDA1-GFP se realizó a partir de un extracto total de proteínas de plántulas oeDDA1-GFP y Col de siete días, tratadas con MG132, y en presencia (+) o ausencia (-) de 50 μ M de ABA o 50 μ M de giberelinas (GAs). Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-GFP y anti-CUL4 para detectar DDA1-GFP y CUL4, respectivamente. (B) Ensayos de coinmunoprecipitación usando extractos proteicos de plántulas oeDDA1-GFP de 7 días tratadas con MG132, CLX (50 μ M) y ABA (50 μ M) durante 1 hora, tras lo cual se añadió 50 μ M de giberelinas (GA) (+) o su correspondiente control (-) y se incubó 3 horas más. Los análisis de western blot se llevaron a cabo como en (A). (C) CSN5 se asocia con DDA1 en menor medida tras el tratamiento con GAs. Inmunoprecipitación tipo TAP de las fusiones DDA1-Gsrhino a partir de extractos totales de suspensiones celulares de 3 días tratadas (+) o no (-) durante 2 horas con 50 μ M de GAs. Una muestra del extracto total de proteínas (input) y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados mediante western blot (IB) con los anticuerpos anti-DDA1 y anti-CSN5, para detectar DDA1-Gsrhino y la subunidad del signalosoma CSN5, respectivamente. (D) Los niveles de poliubiquitinación de 3HA-PYL8 se incrementan tras el tratamiento con ABA y GA. Se realizó la purificación del total de proteínas ubiquitinadas a partir de extractos de proteína total de plántulas oe3HA-PYL8/*pyl8-1* tratadas MG132 y con (+) o sin (-) 50 μ M de ABA durante 1 hora, seguido de un tratamiento de tres horas con (+) o sin (-) 50 μ M de GAs. Para la purificación, los extractos proteicos fueron incubados con resina p62, o resina de agarosa sin afinidad por la ubiquitina como control negativo. Se usó anticuerpo anti-ubiquitina para detectar el total de proteínas ubiquitinadas. El anticuerpo anti-HA se utilizó para detectar 3HA-PYL8 y sus isoformas poliubiquitinadas [$Ub_{(n)}$ -3HA-PYL8, indicadas con corchete].

Al inicio de este estudio, el complejo CDD había sido caracterizado y se conocía su participación en la degradación de diversas proteínas diana (como por ejemplo HY5 o DDB2 en *Arabidopsis*)^{32,86}, sin estar totalmente claro como desempeñaba su función. La asociación de DDA1 con complejos CDD en plantas había sido sugerida previamente⁷⁴, sin embargo, no existían datos experimentales que lo corroboraran. En este estudio, hemos demostrado mediante experimentos tipo TAP, que DDA1 es un componente del complejo CDD en *Arabidopsis*. Así, hemos sido capaces de detectar todos los componentes del complejo CDD (DDB1a, DDB1b, DET1, COP10) en las fracciones purificadas de DDA1. Además, al igual que su homólogo en humanos, la asociación entre DDA1 de *Arabidopsis* y el resto del complejo ocurre a través de la interacción física entre ésta y el dominio BPA de DDB1^{33,174}.

La caracterización bioquímica y funcional de DDA1 detallada en este trabajo, ha permitido arrojar luz sobre el mecanismo de acción de los complejos CDD. Así, DDA1, formando parte de los complejos CDD que se asocian con E3 ligasas CRL4 en *Arabidopsis*, reconoce directamente proteínas para facilitar su ubiquitinación y degradación por el proteosoma. De este modo, el complejo CDD en *Arabidopsis* actúa como un módulo adaptador de sustrato. Por otro lado, algunos de sus componentes (como COP10) favorecen la actividad de enzimas E2^{18,28,33,175}, lo que convierte a este complejo en un tipo único de adaptador de sustrato.

1. MODO DE ACTUACIÓN DE DDA1.

La actividad bioquímica de DDA1 ha sido motivo de discusión desde su identificación en mamíferos^{33,74,175}. Una de las hipótesis sobre la función de Dda1 proponía un posible papel estructural dentro del complejo CDD/DDD-E2. Sin embargo, Dda1 no parece ser necesario para el mantenimiento de la integridad de estos complejos, ya que el complejo CDD se puede reconstituir *in vitro* en ausencia de Dda1¹⁸. Otra posible función de DDA1 sería como activador de los complejos CRL4, estabilizando la asociación entre DDB1 y un grupo específico de DCAFs. De hecho, mediante ensayos de coimmunoprecipitación se ha demostrado que la proteína endógena de humanos (hDda1) coexiste con Ddb1, Cul4 y varias Dcafs (incluyendo Cop1, Ambra...) en el mismo complejo^{174,175,178}. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que demuestren este papel estabilizador por parte de DDA1.

En este estudio, proponemos una función diferente para DDA1; como receptor de sustrato para ubiquitina ligasas tipo CRL4. Así, hemos identificado la primera diana conocida de DDA1, el receptor de ABA PYL8. A pesar de la redundancia funcional existente entre los receptores PYR/PYL/RCAR, PYL8 desempeña un papel fundamental en el control de la respuesta a ABA en raíces¹⁴⁸. Dado que DDA1 está regulando a PYL8, las plantas que sobreexpresan DDA1 (oeDDA1-GFP) presentan una sensibilidad reducida a la inhibición del crecimiento de la raíz mediada por ABA, como ocurre en el caso de los mutantes *pyl8-1*. Además la sobreexpresión de DDA1 o su pérdida parcial de función (líneas *amiRNA-DDA1*) también altera respuestas a ABA controladas por otros miembros de la familia PYR/PYL/RCAR, como es el caso de la germinación y el

establecimiento de la plántula ¹⁷⁶, lo que sugiere un papel regulador de DDA1 sobre más miembros de esta familia. De acuerdo con ello, hemos encontrado interacción *in vivo* entre DDA1 y otros receptores, como los diméricos PYR1 y PYL2, y los monoméricos PYL4, PYL7, PYL9 y PYL10. La asociación entre DDA1 y PYL5 no fue detectada en ensayos *in vivo* en hojas de *N. benthamiana*. Sin embargo, sí se detectó dicha interacción en experimentos de coimmunoprecipitación empleando complejos purificados a partir de cultivos celulares de *Arabidopsis*, sugiriendo que otros miembros del complejo CDD u otras proteínas asociadas pueden ser imprescindibles para que esta interacción ocurra. La importancia de otros miembros del complejo CDD para que DDA1 cumpla su papel regulador se pone también de manifiesto en el hecho de que líneas mutantes *ddb1a*, *det1-1* o *cop10-4* tengan alterada la respuesta a ABA. De acuerdo con este fenotipo, las plantas *cop10-4* acumulan más proteína PYL8 que las plantas silvestres, tal y como se espera en el caso de pérdida de función de DDA1. Sin embargo, excepto DDA1, ningún miembro del complejo CDD es capaz de interactuar directamente con PYL8 bajo nuestras condiciones experimentales, lo que indica el papel fundamental de DDA1 en el reconocimiento de los receptores de ABA. Estos resultados son consistentes con un modelo en el cual el complejo CDD como un conjunto actúa como módulo adaptador de sustrato, mientras que DDA1 se encarga del reconocimiento específico de las dianas (figura 38).

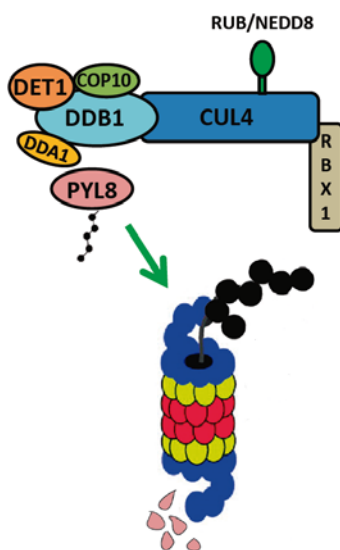


Figura 38: El complejo CDD reconoce y facilita la poliubiquitinación y degradación del receptor de ABA PYL8.

DDA1, como parte del módulo adaptador de sustrato CDD (COP10-DET1-DDB1-DDA1) permite el reconocimiento de los receptores de ABA tipo PYL8, facilitando su poliubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S.

El papel de los complejos E3 en la modulación de las respuestas hormonales ha sido ampliamente estudiado, sin embargo los conocimientos que se tienen sobre la regulación que estos complejos ejercen sobre los mecanismos de percepción y señalización del ABA son limitados. De hecho, la mayoría de las dianas del sistema ubiquitina proteosoma relacionadas con ABA identificadas hasta la fecha corresponden a factores de transcripción que, actúan aguas abajo en la ruta de señalización, regulando la expresión de genes de respuesta a esta hormona. Este es el caso del factor de transcripción tipo B3 ABI3 (reconocido por ABI3-INTERACTING

PROTEIN2¹⁷⁹), de HD-ZIP ATHB6 (regulado por CUL3^{MATH-BTB}⁶⁵), de ABI4¹²⁵, ABF2 (reconocido por ARIA⁶⁸), ABF3¹⁸⁰ y ABI5. Los niveles de este último están regulados por dos E3 ligasas distintas: KEEP ON GOING y CRL4^{DWA1/DWA2}^{70,181,182}. Estas últimas contienen a las proteínas tipo DCAF DWA1 y 2. Nuestros resultados revelan un nuevo papel regulador de los complejos CRL4, que gracias a DDA1, actúan en los estadios iniciales de la ruta de señalización mediada por ABA, controlando la función de los receptores de esta hormona.

Las proteínas DDB1 y CUL4 en *Arabidopsis* presentan localización nuclear, al igual que ocurre en células de mamíferos. Sin embargo, DDB1 también posee localización citoplasmática^{18,20}. De manera similar, durante el estudio de la distribución subcelular de DDA1 en *Arabidopsis* se observó localización tanto nuclear como citoplasmática. Dicha localización es distinta a la observada para el homólogo de DDA1 en mamíferos, que aparece como exclusivamente nuclear¹⁷⁵. Futuros estudios indicarán si DDA1, posiblemente asociada a DDB1, desempeña papeles distintos dependiendo del compartimento celular en que se localiza. Los receptores de ABA PYR/PYL/RCAR son también proteínas con localización nuclear y citoplasmática. Actúan inhibiendo la actividad de las fosfatasa PP2C tras la unión con una molécula de ABA. Se sabe que la inhibición de algunas fosfatasa como FsPP2C1 por parte de PYL5, PYL7 y PYL8 ocurre en el núcleo, con lo cual la localización nuclear de los receptores es fundamental para desencadenar la respuesta de la planta al ABA¹⁸³, y es aquí donde DDA1 desempeña su función de reconocimiento de los receptores PYR/PYL/RCAR para facilitar su degradación. Se ha descrito que existe una regulación a nivel de la expresión génica de los receptores PYR/PYL/RCAR. Por ejemplo, la expresión génica de *PYL8* se inhibe en respuesta a sal, estrés osmótico y ABA, mientras que la expresión de *PYL7* incrementa en respuesta a estos tratamientos¹⁸³. Sin embargo, al inicio de este estudio, no se había descrito ninguna regulación de estos receptores a nivel postraduccional. En este trabajo se ha descrito que *PYL8* se poliubiquitina y degrada a través del proteosoma 26S. Además, hemos determinado cual es el complejo responsable de dicha degradación: CRL4-CDD, que además es capaz de interactuar con otros receptores (al menos 7 más) a través de la subunidad DDA1, lo que apunta a un posible papel regulador sobre otros receptores de esta familia. En un estudio reciente se ha observado como otros receptores (*PYL1* y *PYL4*) son también regulados postraduccionalmente por otra E3 ubiquitina ligasa: la proteína con dominios transmembrana y RING *RSL1*, que se localiza en la membrana plasmática, desde donde promueve la ubiquitinación de estos dos receptores que serían invaginados y degradados en la vacuola a través de la ruta de tráfico endosomal¹⁸⁴. Estos resultados indican que los receptores de ABA están sujetos a una regulación precisa, a nivel transcripcional y postraduccional, donde están implicados distintas actividades E3 ligasa.

2. CONTROL POR ABA DE LA ACTIVIDAD DE DDA1.

Es importante señalar el papel antagónico que desempeñan DDA1 y el ABA en la regulación de la estabilidad del receptor *PYL8*. Así, el ABA promueve la estabilización del receptor, mientras que DDA1 induce su degradación. Dado que la señalización por ABA se desencadena a través de su unión directa a los receptores

PYR/PYL/RCAR, la protección mediada por ABA de estos receptores ha de servir para asegurar y reforzar la percepción de dicha hormona, particularmente durante los estadios iniciales de la señalización. Sin embargo, durante estadios más avanzados, la sensibilidad a ABA debe verse atenuada, para evitar los efectos negativos de una respuesta continua a la hormona (reducción del crecimiento, cierre estomático...). De hecho, se ha demostrado que la expresión génica de *PYL8* se reduce a las 3 horas de la aplicación exógena de ABA¹⁸³. De acuerdo con esta idea, hemos comprobado cómo los niveles de mRNA de *3HA-PYL8* se ven reducidos en semilla tras 24 horas de tratamiento con ABA (ver figura 27C). También concluimos que la degradación de los receptores de ABA mediada por DDA1 contribuye a esta desensibilización de la respuesta cuando las condiciones de estrés remiten y los niveles endógenos de ABA disminuyen en la célula, ya que, como se observa en las figuras 26A y 26B, la degradación de PYL8 ocurre fundamentalmente en ausencia de la hormona. Este mecanismo regulador de la respuesta al ABA dependiente de DDA1 también opera durante la germinación, haciéndose patente en la mayor acumulación de la proteína PYL8 en semillas tratadas con la hormona. Tras la imbibición de las semillas los niveles de ABA disminuyen para permitir la germinación¹²⁰. En este punto y según nuestro modelo, DDA1 estaría activo, como parte de los complejos CRL4-CDD, y facilitaría la degradación rápida de los receptores de ABA. De hecho, los niveles de expresión del gen *DDA1* se incrementan notablemente durante el desarrollo del embrión y maduración de la semilla (figura 19), quizá para alcanzar niveles elevados de proteína disponible antes de la imbibición. Cabe destacar que la expresión de *DDA1* también es mayor en otros órganos y tejidos con elevado grado de división celular, como inflorescencias, polen y óvulos (figura 19), lo que apunta a su posible papel durante el desarrollo de los gametos y del embrión. De acuerdo con esta posible función, en la búsqueda de interactores de DDA1 mediante ensayos de doble híbrido en levaduras, identificamos proteínas implicadas en el control de la progresión del ciclo celular (datos no mostrados). La relación entre DDA1 y estos procesos será objeto de futuras investigaciones.

En este estudio, además, se arroja luz sobre el mecanismo por el cual el ABA protege a PYL8 de la degradación. Así, observamos que dicho mecanismo no implica la disrupción de la interacción entre PYL8 y DDA1, pero conlleva una reducción en los niveles de poliubiquitinación del receptor y, por tanto, de su degradación.

Se ha descrito como otras hormonas vegetales se unen directamente o indirectamente a complejos E3 ligasas, activando el reconocimiento de reguladores negativos de la señalización hormonal e iniciando así la cascada de señalización. Por ejemplo, en la ruta de señalización por auxinas, TIR1 y ASK1, como parte del el complejo receptor SCF^{TIR1} E3 ligasa, sufren un cambio conformacional al unirse la hormona, lo que estimula la interacción con proteínas Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA), para su posterior ubiquitinación y degradación³⁴⁻³⁶. En la ruta de señalización del ácido jasmónico, COI1 une específicamente JA-Ile, y esta unión incrementa la degradación de los represores transcripcionales JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)^{40,41}. En el caso de la señalización inducida por giberelinas, éstas se pueden unir directamente a GID1, induciendo la formación de un complejo con las F-box SLEEPY1 (SLY1) y SLEEPY2/SNEEZY (SLY2/SNE), lo que determina la ubiquitinación de los represores DELLA mediada por el complejo SCF^{SLY}⁵⁴. En todos estos casos, la percepción

de la hormona provoca la activación de los complejos E3 ligasa, promoviendo la degradación de represores hormonales. En la ruta de señalización por etileno, sin embargo, la situación es la opuesta: en ausencia de etileno, las F-box EBF1 y EBF2 controlan la ubiquitinación y degradación del regulador central de la ruta EIN3, inhibiendo la respuesta a etileno. La unión de una molécula de etileno al receptor de etileno inactiva los complejos SCF^{EBF1/EBF2}, lo que provoca la consecuente estabilización de EIN3 que deriva en la inducción de la respuesta a etileno a nivel transcripcional^{45,46,50}. A día de hoy se desconoce como ocurre esta inactivación de los complejos SCF^{EBF1/EBF2}, aunque se sabe que los niveles del transcrito están negativamente regulados en respuesta a la hormona¹⁸⁵, y que EIN3 es susceptible de fosforilación, lo que provocaría la estabilización de la proteína⁵¹. En el caso de la señalización desencadenada por la hormona ABA, los receptores no son complejos E3 ligasas, y aunque se unen directamente a la hormona y están sujetos a cambios conformacionales, la transmisión de la señal no depende de la degradación dependiente del proteosoma, como se ha descrito en los casos anteriores. Sin embargo, existe una regulación de la estabilidad del receptor PYL8 a nivel postraduccional que depende de DDA1 y que se activa en ausencia de ABA, lo que indica que, como en el caso de la señalización por etileno, la presencia de la molécula señal inactiva la actividad E3 ligasa del complejo.

2.1. EL ABA MODULA EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS CRL4-CDD

En este trabajo hemos caracterizado el mecanismo por el cual el ABA ejerce su efecto protector sobre el receptor PYL8. Así, mediante ensayos de coimmunoprecipitación, observamos que la capacidad de asociación entre los componentes del complejo CDD (incluyendo DDA1) y CUL4 se ve reducida en presencia de la hormona. Mediante ensayos de filtración en gel mediante columnas de FPLC, también pudimos determinar la existencia de cambios generales en la composición de los complejos que contienen a DDA1 y CUL4 tras el tratamiento con ABA. Por lo tanto, el complejo CRL4-CDD se desestabiliza tras el tratamiento con ABA, lo que impediría la poliubiquitinación y consecuente degradación de los receptores de ABA.

En un estudio realizado por Olma et al. (2009)¹⁷⁵ en el que tratan de identificar nuevos interactores del complejo CSN en mamíferos, se identificó a la proteína Dda1 asociada a estos complejos, y se determinó que Dda1 puede actuar como regulador positivo de algunos complejos CRL4. El complejo CSN (o signalosoma COP9), altamente conservado en eucariotas, está formado por 8 subunidades (CSN1-8). Entre ellas, CSN5 se encarga de escindir la molécula NEDD8/RUB de las culinas, en un proceso conocido como denedilación¹⁰⁴. Los complejos CRL sufren un ciclo de activación/inactivación transitoria que depende del ensamblaje/desensamblaje de las culinas-Rbx1 (subcomplejo central) con los diferentes módulos adaptadores de sustrato (el adaptador más los receptores de sustrato). Este ciclo está regulado por los procesos de nedilación/denedilación de las culinas. La nedilación activa los módulos CRL, mientras que la denedilación produce el desensamblaje de los complejos CRL, favoreciendo la asociación del subcomplejo culina-Rbx1 con CAND1. Como ya se ha indicado anteriormente, el complejo CSN actúa principalmente denedilando las culinas, desempeñando un papel crucial en el mantenimiento de estos ciclos¹⁸⁶.

Este proceso es muy dinámico, y hace que el subcomplejo culina-Rbx1 esté disponible para diferentes módulos adaptadores. Así, este ciclo promueve la disociación de combinaciones E3 ligasas que ya han desarrollado su actividad, para permitir la formación de nuevos complejos con otros adaptadores de sustrato, con el fin de adaptar a la célula a necesidades cambiantes ¹⁸⁷. La denedilación dependiente de CSN también puede servir como mecanismo para impedir la auto-degradación de la maquinaria de ubiquitinación celular, ya que los complejos CRLs nedilados son altamente activos, y pueden autoubiquitinar a sus propios componentes ¹⁸⁸.

A pesar de que recientemente se han caracterizado los mecanismos que permiten los ciclos de activación/inactivación de los complejos CRL en base a su estado de nedilación, todavía se desconoce cómo se coordina el ensamblaje/desensamblaje de estos complejos. Algunos trabajos apuntan a que la abundancia de los adaptadores de sustrato y su unión a las dianas promueven el ensamblaje del módulo adaptador-diana con el subcomplejo culina-Rbx1 correspondiente, y la activación de este último por nedilación. Este es el caso que se ha descrito para algunas proteínas F-box. Por ejemplo, la disponibilidad de la F-box Skp2 y su unión al sustrato p27, facilita el ensamblaje de la ubiquitina ligasa SCF^{Skp2} y su activación mediante la nedilación de CUL1 ¹¹⁶. Además de la disponibilidad de sustrato, parece que, en otros casos, existen “señales” que promueven la activación vía nedilación de complejos CRL inactivos. En base a nuestros resultados, proponemos que el ABA podría actuar como “señal” para la inactivación de los complejos que degradan a los receptores de ABA, aumentando la actividad denedilasa de los complejos CSN sobre CRL4-CDD y facilitando el desensamblaje de los mismos. Un caso similar al nuestro ha sido estudiado por Fischer et al. (2011) ⁸⁵ para complejos CRL4: el complejo CSN inhibe la actividad de CRL4^{DDB2} solo en ausencia del daño en el DNA inducido por luz ultravioleta, y como resultado, CRL4^{DDB2} es activo cuando DDB2 está unido a DNA dañado, pero inactivo en ausencia de daño en el DNA.

Los complejos CSN no solo regulan la actividad de los complejos CRL vía denedilación. En un estudio realizado en células animales, se observó que la unión de los complejos CSN a las culinas bloquea sitios de unión de los módulos adaptadores de sustrato, produciendo una inhibición de la actividad de los complejos CRL por bloqueo físico y no por denedilación ¹⁰⁵. Este mecanismo independiente de la actividad enzimática de CSN se ha descrito también para complejos CRL4 ⁸⁵. Sin embargo este no parece ser el caso en la regulación de los complejos CRL4-CDD. Así, mediante experimentos de coinmunoprecipitación en presencia del inhibidor de la nedilación MLN4924 ¹⁰² observamos que DDA1 se asocia principalmente a complejos CRL4 en los cuales CUL4 está mayoritariamente nedilada (figura 34B).

Se ha descrito que, de las 8 subunidades que conforman el complejo CSN, la subunidad CSN5 podría actuar de manera independiente al resto del complejo, participando en importantes procesos biológicos, tales como la salida del núcleo de los reguladores celulares p27 o p53 en mamíferos, para su posterior degradación ¹⁸⁹. Sin embargo, los complejos que contienen a DDA1 en *Arabidopsis*, no solo se asocian con la subunidad CSN5, sino también con otras subunidades como CSN3 (tal y como se ha visto en experimentos de coinmunoprecipitación) y CSN1 (que aparece en los experimentos TAP). También se ha visto que DDA1

interacciona directamente con otras subunidades como CSN3 y CSN8, en experimentos de doble híbrido en levaduras (datos no mostrados).

El hecho de que DDA1 interaccione con subunidades del CSN y que este regule a los complejos CRL4, nos llevó a analizar si el ABA es capaz de alterar dicha interacción potencialmente reguladora. Mediante ensayos de inmunoprecipitación tipo TAP pudimos detectar como la asociación entre DDA1 y la subunidad CSN5 incrementa levemente (pero de manera significativa) tras el tratamiento con ABA (figura 33C). Estos datos sugieren que el ABA facilita de alguna manera la interacción entre ambos complejos, para incrementar la actividad de CSN sobre CRL4-CDD, aunque no podemos descartar que el ABA favorezca la asociación de CAND1 con CUL4, desplazando así al complejo CDD y a CSN (figura 39).

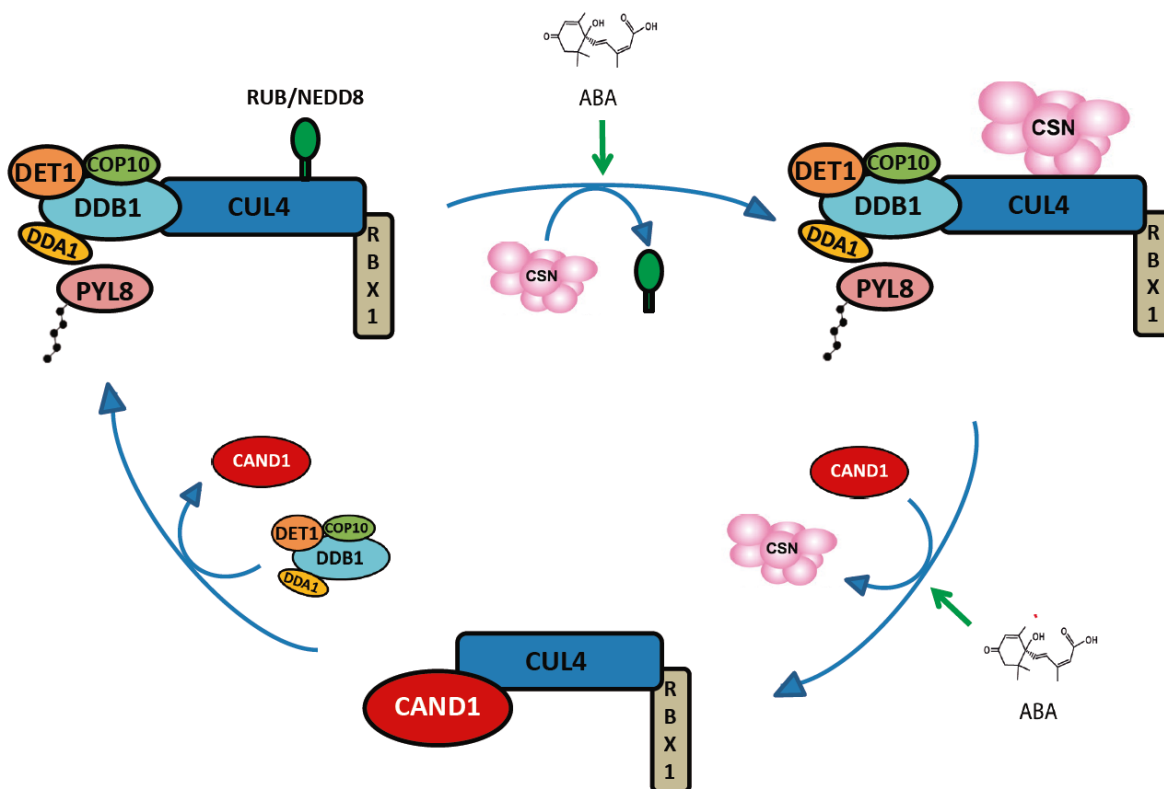


Figura 39: Modelo propuesto de acción del ABA en la regulación de los complejos CRL4-CDD por NEDD8/RUB y CAND1.

La actividad de CRL4-CDD estaría regulada por un complejo ciclo que implica modificaciones covalentes y uniones no covalentes. Los complejos CRL4 alcanzan su máxima actividad cuando la subunidad culina está conjugada con NEDD8/RUB, ya que está disponible para la unión con el módulo CDD, que a través de DDA1 reconoce a PYL8, facilitando su poliubiquitinación y degradación. El complejo CSN puede unirse a la culina, escindiendo NEDD8/RUB gracias a la actividad denedilasa de su subunidad CSN5. La CUL4 denedilada es susceptible de unirse con CAND1, que ocupa tanto el sitio de nedilación de la culina como el sitio unión de los

adaptadores de sustrato, compitiendo por la unión con el complejo CDD, cuya actividad se verá reducida. Una vez que la culina vuelve a nedilarse, podrá unirse un nuevo módulo adaptador de sustrato. En este trabajo se ha propuesto que el ABA estaría promoviendo la inactivación de los complejos CRL4-CDD: incrementando la actividad de los complejos CSN, haciéndolos más accesibles a la unión con la CUL4 o aumentando la afinidad por la proteína CAND1.

En este punto, es necesario destacar que el mecanismo regulador del ensamblaje de complejos CRL4 dependiente de ABA descrito en este estudio solo afectaría a su asociación con los complejos CDD, y no a la unión con otros módulos adaptadores de sustrato; i.e COP1, cuya regulación concreta dependerá de otros factores del desarrollo o ambientales (luz, fotoperiodo, etc,...) no relacionados con la presencia de la hormona.

3. CONTROL POR GIBERELINAS DE LA ACTIVIDAD DE COMPLEJOS CRL4-CDD.

Según el modelo propuesto (figura 40), existe un reconocimiento de los receptores de ABA mediado por DDA1 que contribuye al control de los niveles de receptor, y por tanto de la transmisión de la señal hormonal. Sin embargo, cuando los niveles de ABA son elevados, se produce el desensamblaje del complejo CRL4-CDD (inactivo) aunque la interacción entre DDA1 y el receptor de ABA se siga produciendo. Es cuando los niveles de ABA disminuyen, cuando se promueve el ensamblaje del complejo CRL4-CDD, y consecuentemente la degradación de los receptores. Este proceso contribuye a la desensibilización de la respuesta cuando las condiciones de estrés remiten y los niveles endógenos de ABA disminuyen en la célula. Se sabe que tras la imbibición de las semillas los niveles de ABA disminuyen para permitir la germinación ¹²⁰, en este punto DDA1 facilitaría la degradación rápida de los receptores de ABA. También se sabe que durante esta etapa, se sintetizan GAs que promueven la emergencia radicular, indicando que los niveles de GAs y el control del balance hormonal son determinantes para la germinación de las semillas ¹⁹⁵. Existe una interacción entre ambas rutas, que implica una regulación génica precisa, para modular el desarrollo del embrión, el crecimiento de la plántula y la respuesta a señales medioambientales. Así, por ejemplo, los mutantes defectivos en la síntesis de ABA *aba2-2* sintetizan más giberelinas y germinan mejor ¹⁹⁶. Por otra parte, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5) afecta a la germinación de las semillas incrementando la expresión de las DELLA y regulando el metabolismo de ABA y GAs ¹⁹⁷. La proteína MFT (MOTHER OF FT AND TFL1) promueve la germinación de las semillas a través de una regulación negativa de la respuesta a ABA inducida por GAs ¹⁹⁸.

En este trabajo se ha encontrado una prueba más del papel antagónico de estas dos hormonas en el control de la germinación y del crecimiento y desarrollo de la planta en respuesta a señales ambientales. Lo novedoso de este hallazgo es que la regulación en este caso no sucede a nivel transcripcional, sino a nivel postraducciona, implicando un control del ensamblaje de complejos proteicos E3 ligasa. Así, hemos observado que, de modo contrario al ABA que promueve el desensamblaje del complejo CRL4-CDD y por tanto su

inactivación, las GAs estabilizan dicho complejo, incrementando la poliubiquitinación y consecuente degradación del receptor PYL8. Este mecanismo estaría relacionado también con una regulación de la actividad de los complejos CSN a través de la reducción de la interacción DDA1-CSN5.

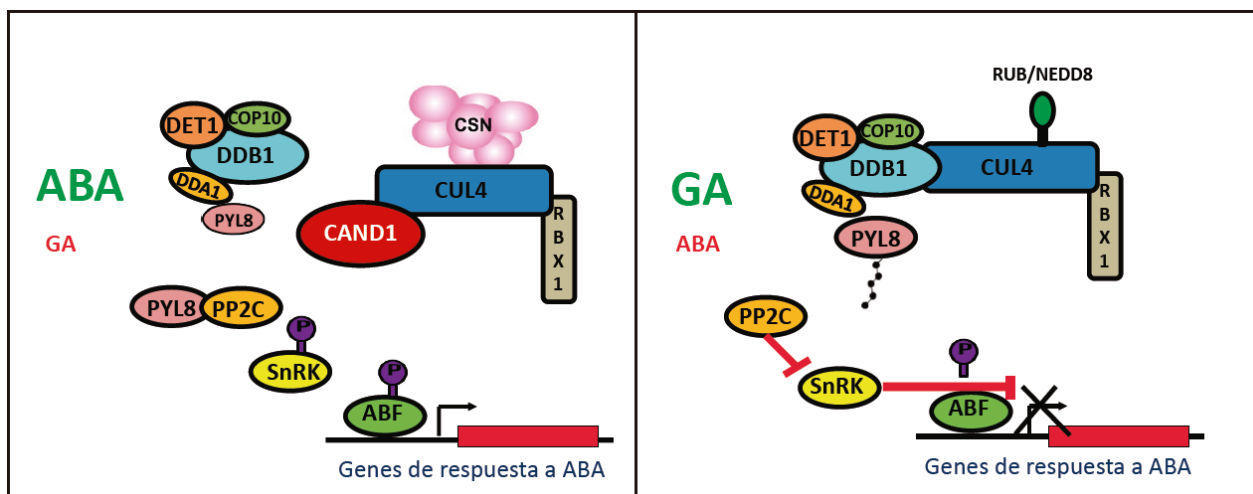


Figura 40: Modelo para el papel de DDA1 en la desensibilización de la respuesta a ABA.

DDA1, como parte del complejo CDD, es capaz de reconocer al receptor de ABA PYL8. Cuando los niveles endógenos de ABA son altos, el complejo CSN permite la denedilación de CUL4, promoviendo la asociación con CAND1, y el desplazamiento del complejo CDD, inhibiendo por tanto su actividad (panel izquierdo). Cuando los niveles de ABA disminuyen en la célula (lo cual va asociado en semillas a un incremento en los niveles de GA³), CUL4 aparece principalmente nedilada (activa), permitiendo la formación del complejo CUL4-CDD, promoviendo así la rápida ubiquitinación y degradación del receptor de ABA PYL8. Las PP2Cs, tras la degradación de los PYL/PYL/RCAR, quedarán libres y actuarán bloqueando las respuestas al ABA (panel derecho).

El mecanismo de desensamblaje mediado por CSN y controlado por ABA y GA propuesto en este estudio podría estar relacionado con procesos que afectan a la conformación del complejo. Así, es posible que tanto cambios conformacionales en los receptores PYR/PYL/RCAR unidos a ABA^{199,200} como la formación de complejos PP2C-ABA-PYL-CDD provoquen el desplazamiento del subcomplejo CUL4-RBX1, haciéndolo más accesible a CSN para la denedilación de CUL4 y, de este modo promoviendo el desensamblaje de CUL4-CDD. Otra posibilidad implicaría cambios en el nivel de fosforilación/defosforilación de DDA1 o de alguno de los componentes del módulo CDD. Así, se ha visto que en células animales, DDA1 se fosforila *in vivo*. Sin embargo, las dos formas (fosforilada y defosforilada) son capaces de asociarse con complejos CUL4^{DCAF}¹⁷⁵. En *Arabidopsis* no se ha detectado ninguna isoforma fosforilada/defosforilada de DDA1. Sin embargo es posible determinar varios sitios susceptibles de fosforilación en la secuencia de AtDDA1, utilizando la herramienta de predicción de sitios de fosforilación NetPhos 2.0. Así, en *Arabidopsis*, la fosforilación de DDA1 o de otro miembro del complejo CDD, podría afectar al ensamblaje global del complejo. Futuros estudios bioquímicos y moleculares nos ayudarán a caracterizar y entender con mayor detalle las bases moleculares de la regulación de la actividad de complejos CUL4-CDD mediada por ABA y GA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El estudio a nivel bioquímico y molecular de los complejos CDD, la búsqueda de interactores de estos complejos y la caracterización funcional de la proteína DDA1, nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. DDA1 de *Arabidopsis* forma parte de los complejos que contienen a DET1, COP10 y DDB1 (complejos CDD). DDA1 interactúa directamente con el dominio BPA de DDB1, pero no con el resto de proteínas del complejo CDD. DDA1 es capaz de asociarse con CUL4, otras proteínas tipo DCAF y proteínas del complejo CSN.
2. DDA1 es una proteína altamente conservada en plantas vasculares.
3. DDA1 de *Arabidopsis* se expresa en tejidos y órganos reproductivos con elevado grado de división celular, siendo esta expresión mayor en semillas y durante el desarrollo del embrión. DDA1 de *Arabidopsis* posee localización nuclear y citoplasmática.
4. DDA1 interactúa directamente con numerosos miembros de la familia de receptores de ABA PYR/PYL/RCAR.
5. DDA1, como parte del complejo CDD, facilita la poliubiquitinación y degradación vía proteosoma del receptor de ABA PYL8, tanto en plántulas como en semillas, actuando así como un regulador negativo de la señalización por ABA.
6. El ABA limita la poliubiquitinación de PYL8, pero no impide la interacción entre PYL8 y DDA1.
7. El ABA provoca el desensamblaje de los complejos CRL4-CDD.
8. DDA1 se asocia al complejo CSN, y dicha asociación es modulada por la presencia de ABA y giberelinas.
9. Las giberelinas favorecen el ensamblaje de los complejos CRL4-CDD, y la poliubiquitinación de PYL8.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Hershko, A. & Ciechanover, A. Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annual review of biochemistry* **51**, 335-364, doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.002003 (1982).
- 2 Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. & Rose, I. A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 1783-1786 (1980).
- 3 Vierstra, R. D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 385-397, doi:10.1038/nrm2688 (2009).
- 4 Raasi, S. & Wolf, D. H. Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Seminars in cell & developmental biology* **18**, 780-791, doi:10.1016/j.semcdb.2007.09.008 (2007).
- 5 Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* **67**, 425-479, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425 (1998).
- 6 Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* **78**, 399-434, doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809 (2009).
- 7 Choi, C. M., Gray, W. M., Mooney, S. & Hellmann, H. Composition, roles, and regulation of cullin-based ubiquitin e3 ligases. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **12**, e0175, doi:10.1199/tab.0175 (2014).
- 8 Zheng, N. *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-709, doi:10.1038/416703a (2002).
- 9 Risseuw, E. P. *et al.* Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **34**, 753-767 (2003).
- 10 Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S. H., Durski, A. M. & Vierstra, R. D. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11519-11524, doi:10.1073/pnas.162339999 (2002).
- 11 Hua, Z., Zou, C., Shiu, S. H. & Vierstra, R. D. Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift. *PloS one* **6**, e16219, doi:10.1371/journal.pone.0016219 (2011).
- 12 Figueroa, P. *et al.* Arabidopsis has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *The Plant cell* **17**, 1180-1195, doi:10.1105/tpc.105.031989 (2005).
- 13 Gingerich, D. J. *et al.* Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 18810-18821, doi:10.1074/jbc.M413247200 (2005).
- 14 Zhang, Z. *et al.* Recombinant expression, reconstitution and structure of human anaphase-promoting complex (APC/C). *The Biochemical journal* **449**, 365-371, doi:10.1042/BJ20121374 (2013).
- 15 Huang, J. *et al.* High-throughput screening for inhibitors of the e3 ubiquitin ligase APC. *Methods in enzymology* **399**, 740-754, doi:10.1016/S0076-6879(05)99049-6 (2005).
- 16 Biedermann, S. & Hellmann, H. WD40 and CUL4-based E3 ligases: lubricating all aspects of life. *Trends in plant science* **16**, 38-46, doi:10.1016/j.tplants.2010.09.007 (2011).
- 17 Bernhardt, A. *et al.* CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **47**, 591-603, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02810.x (2006).
- 18 Chen, H. *et al.* Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *The Plant cell* **18**, 1991-2004, doi:10.1105/tpc.106.043224 (2006).

- 19 Bernhardt, A., Mooney, S. & Hellmann, H. Arabidopsis DDB1a and DDB1b are critical for embryo development. *Planta* **232**, 555-566, doi:10.1007/s00425-010-1195-9 (2010).
- 20 Molinier, J., Lechner, E., Dumbliauskas, E. & Genschik, P. Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS genetics* **4**, e1000093, doi:10.1371/journal.pgen.1000093 (2008).
- 21 Schroeder, D. F. *et al.* De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis. *Current biology : CB* **12**, 1462-1472 (2002).
- 22 Angers, S. *et al.* Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**, 590-593, doi:10.1038/nature05175 (2006).
- 23 Li, T., Chen, X., Garbutt, K. C., Zhou, P. & Zheng, N. Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell* **124**, 105-117, doi:10.1016/j.cell.2005.10.033 (2006).
- 24 Li, T., Robert, E. I., van Breugel, P. C., Strubin, M. & Zheng, N. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nature structural & molecular biology* **17**, 105-111, doi:10.1038/nsmb.1719 (2010).
- 25 Lee, J. H. *et al.* Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *The Plant cell* **20**, 152-167, doi:10.1105/tpc.107.055418 (2008).
- 26 Lee, J. & Zhou, P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Molecular cell* **26**, 775-780, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.001 (2007).
- 27 Castells, E. *et al.* det1-1-induced UV-C hyposensitivity through UVR3 and PHR1 photolyase gene over-expression. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **63**, 392-404, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04249.x (2010).
- 28 Yanagawa, Y. *et al.* Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & development* **18**, 2172-2181, doi:10.1101/gad.1229504 (2004).
- 29 Kang, M. Y. *et al.* Negative regulatory roles of DE-ETIOLATED1 in flowering time in Arabidopsis. *Scientific reports* **5**, 9728, doi:10.1038/srep09728 (2015).
- 30 Lau, O. S. & Deng, X. W. Effect of Arabidopsis COP10 ubiquitin E2 enhancement activity across E2 families and functional conservation among its canonical homologues. *The Biochemical journal* **418**, 683-690, doi:10.1042/BJ20081943 (2009).
- 31 Hardtke, C. S. & Deng, X. W. The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant physiology* **124**, 1548-1557 (2000).
- 32 Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. & Deng, X. W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**, 462-466, doi:10.1038/35013076 (2000).
- 33 Pick, E. *et al.* Mammalian DET1 regulates Cul4A activity and forms stable complexes with E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Molecular and cellular biology* **27**, 4708-4719, doi:10.1128/MCB.02432-06 (2007).
- 34 Calderon Villalobos, L. I. *et al.* A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature chemical biology* **8**, 477-485, doi:10.1038/nchembio.926 (2012).
- 35 Ruegger, M. *et al.* The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes & development* **12**, 198-207 (1998).
- 36 Tan, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645, doi:10.1038/nature05731 (2007).

- 37 Maraschin Fdos, S., Memelink, J. & Offringa, R. Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**, 100-109, doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03854.x (2009).
- 38 Lee, D. J., Park, J. W., Lee, H. W. & Kim, J. Genome-wide analysis of the auxin-responsive transcriptome downstream of *iaa1* and its expression analysis reveal the diversity and complexity of auxin-regulated gene expression. *Journal of experimental botany* **60**, 3935-3957, doi:10.1093/jxb/erp230 (2009).
- 39 Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N. & Turner, J. G. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant cell* **6**, 751-759, doi:10.1105/tpc.6.5.751 (1994).
- 40 Pauwels, L. & Goossens, A. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant cell* **23**, 3089-3100, doi:10.1105/tpc.111.089300 (2011).
- 41 Yan, J. *et al.* The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant cell* **21**, 2220-2236, doi:10.1105/tpc.109.065730 (2009).
- 42 Qi, T. *et al.* The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* **23**, 1795-1814, doi:10.1105/tpc.111.083261 (2011).
- 43 Song, S. *et al.* The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PLoS genetics* **9**, e1003653, doi:10.1371/journal.pgen.1003653 (2013).
- 44 Kim, H. J., Chiang, Y. H., Kieber, J. J. & Schaller, G. E. SCF(KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10028-10033, doi:10.1073/pnas.1300403110 (2013).
- 45 Guo, H. & Ecker, J. R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-677 (2003).
- 46 Potuschak, T. *et al.* EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679-689 (2003).
- 47 Qiao, H., Chang, K. N., Yazaki, J. & Ecker, J. R. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes & development* **23**, 512-521, doi:10.1101/gad.1765709 (2009).
- 48 Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. & Ecker, J. R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & development* **12**, 3703-3714 (1998).
- 49 Chen, Y. F. *et al.* Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **282**, 24752-24758, doi:10.1074/jbc.M704419200 (2007).
- 50 Binder, B. M. *et al.* The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *The Plant cell* **19**, 509-523, doi:10.1105/tpc.106.048140 (2007).
- 51 Yoo, S. D., Cho, Y. H., Tena, G., Xiong, Y. & Sheen, J. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**, 789-795, doi:10.1038/nature06543 (2008).
- 52 Wen, X. *et al.* Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell research* **22**, 1613-1616, doi:10.1038/cr.2012.145 (2012).
- 53 Griffiths, J. *et al.* Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant cell* **18**, 3399-3414, doi:10.1105/tpc.106.047415 (2006).

- 54 Ariizumi, T. & Steber, C. M. Mutations in the F-box gene SNEEZY result in decreased Arabidopsis GA signaling. *Plant signaling & behavior* **6**, 831-833 (2011).
- 55 Zhang, Y. *et al.* F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in Arabidopsis. *Plant physiology* **148**, 2121-2133, doi:10.1104/pp.108.126912 (2008).
- 56 Koops, P. *et al.* EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in Arabidopsis thaliana. *Journal of experimental botany* **62**, 5547-5560, doi:10.1093/jxb/err236 (2011).
- 57 Bu, Q. *et al.* Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in Arabidopsis. *Plant physiology* **164**, 424-439, doi:10.1104/pp.113.226837 (2014).
- 58 Thomann, A. *et al.* Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLoS genetics* **5**, e1000328, doi:10.1371/journal.pgen.1000328 (2009).
- 59 Wang, K. L., Yoshida, H., Lurin, C. & Ecker, J. R. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature* **428**, 945-950, doi:10.1038/nature02516 (2004).
- 60 Fu, Z. Q. *et al.* NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**, 228-232, doi:10.1038/nature11162 (2012).
- 61 Pajeroska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K. & Mukhtar, M. S. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in plant science* **18**, 402-411, doi:10.1016/j.tplants.2013.04.004 (2013).
- 62 Boyle, P. *et al.* The BTB/POZ domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *The Plant cell* **21**, 3700-3713, doi:10.1105/tpc.109.069971 (2009).
- 63 Spoel, S. H. *et al.* Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**, 860-872, doi:10.1016/j.cell.2009.03.038 (2009).
- 64 Zhang, L., Du, L., Shen, C., Yang, Y. & Poovaiah, B. W. Regulation of plant immunity through ubiquitin-mediated modulation of Ca(2+) -calmodulin-AtSR1/CAMTA3 signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **78**, 269-281, doi:10.1111/tbj.12473 (2014).
- 65 Lechner, E. *et al.* MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. *Developmental cell* **21**, 1116-1128, doi:10.1016/j.devcel.2011.10.018 (2011).
- 66 Chen, L. *et al.* Arabidopsis BPM proteins function as substrate adaptors to a cullin3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *The Plant cell* **25**, 2253-2264, doi:10.1105/tpc.112.107292 (2013).
- 67 Weber, H. & Hellmann, H. Arabidopsis thaliana BTB/ POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *The FEBS journal* **276**, 6624-6635, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07373.x (2009).
- 68 Kim, S. *et al.* ARIA, an Arabidopsis arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant physiology* **136**, 3639-3648, doi:10.1104/pp.104.049189 (2004).
- 69 Lee, J. H., Terzaghi, W. & Deng, X. W. DWA3, an Arabidopsis DWD protein, acts as a negative regulator in ABA signal transduction. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **180**, 352-357, doi:10.1016/j.plantsci.2010.10.008 (2011).
- 70 Lee, J. H. *et al.* DWA1 and DWA2, two Arabidopsis DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction. *The Plant cell* **22**, 1716-1732, doi:10.1105/tpc.109.073783 (2010).
- 71 Seo, K. I. *et al.* ABD1 is an Arabidopsis DCAF substrate receptor for CUL4-DDB1-based E3 ligases that acts as a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant cell* **26**, 695-711, doi:10.1105/tpc.113.119974 (2014).

- 72 Farras, R. *et al.* SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *The EMBO journal* **20**, 2742-2756, doi:10.1093/emboj/20.11.2742 (2001).
- 73 Jang, I. C., Yang, S. W., Yang, J. Y. & Chua, N. H. Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes & development* **21**, 2100-2111, doi:10.1101/gad.1568207 (2007).
- 74 Chen, H. *et al.* Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *The Plant cell* **22**, 108-123, doi:10.1105/tpc.109.065490 (2010).
- 75 Jang, S. *et al.* Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO journal* **27**, 1277-1288, doi:10.1038/emboj.2008.68 (2008).
- 76 Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X. & Lin, C. Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis. *Current biology : CB* **21**, 841-847, doi:10.1016/j.cub.2011.03.048 (2011).
- 77 Yu, J. W. *et al.* COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular cell* **32**, 617-630, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.026 (2008).
- 78 Huang, X., Yang, P., Ouyang, X., Chen, L. & Deng, X. W. Photoactivated UVR8-COP1 module determines photomorphogenic UV-B signaling output in Arabidopsis. *PLoS genetics* **10**, e1004218, doi:10.1371/journal.pgen.1004218 (2014).
- 79 Wu, D. *et al.* Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* **484**, 214-219, doi:10.1038/nature10931 (2012).
- 80 Feng, W. & Michaels, S. D. Dual roles for FY in the regulation of FLC. *Plant signaling & behavior* **6**, 703-705 (2011).
- 81 Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A. & Genschik, P. MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3430-3435, doi:10.1073/pnas.1018242108 (2011).
- 82 Dumbliauskas, E. *et al.* The Arabidopsis CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *The EMBO journal* **30**, 731-743, doi:10.1038/emboj.2010.359 (2011).
- 83 Huang, X., Ouyang, X. & Deng, X. W. Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling. *Current opinion in plant biology* **21**, 96-103, doi:10.1016/j.pbi.2014.07.003 (2014).
- 84 Scrima, A. *et al.* Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* **135**, 1213-1223, doi:10.1016/j.cell.2008.10.045 (2008).
- 85 Fischer, E. S. *et al.* The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* **147**, 1024-1039, doi:10.1016/j.cell.2011.10.035 (2011).
- 86 Castells, E. *et al.* The conserved factor DE-ETIOLATED 1 cooperates with CUL4-DDB1DDB2 to maintain genome integrity upon UV stress. *The EMBO journal* **30**, 1162-1172, doi:10.1038/emboj.2011.20 (2011).
- 87 Zhang, C. *et al.* Arabidopsis cockayne syndrome A-like proteins 1A and 1B form a complex with CULLIN4 and damage DNA binding protein 1A and regulate the response to UV irradiation. *The Plant cell* **22**, 2353-2369, doi:10.1105/tpc.110.073973 (2010).
- 88 Duda, D. M. *et al.* Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**, 995-1006, doi:10.1016/j.cell.2008.07.022 (2008).
- 89 Saha, A. & Deshaies, R. J. Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Molecular cell* **32**, 21-31, doi:10.1016/j.molcel.2008.08.021 (2008).
- 90 Rao-Naik, C. *et al.* The rub family of ubiquitin-like proteins. Crystal structure of Arabidopsis rub1 and expression of multiple rubs in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **273**, 34976-34982 (1998).

- 91 Bostick, M., Lochhead, S. R., Honda, A., Palmer, S. & Callis, J. Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in Arabidopsis. *The Plant cell* **16**, 2418-2432, doi:10.1105/tpc.104.024943 (2004).
- 92 del Pozo, J. C. *et al.* AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *The Plant cell* **14**, 421-433 (2002).
- 93 Pozo, J. C., Timpote, C., Tan, S., Callis, J. & Estelle, M. The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science* **280**, 1760-1763 (1998).
- 94 del Pozo, J. C. & Estelle, M. The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 15342-15347 (1999).
- 95 Scott, D. C. *et al.* A dual E3 mechanism for Rub1 ligation to Cdc53. *Molecular cell* **39**, 784-796, doi:10.1016/j.molcel.2010.08.030 (2010).
- 96 Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. & Estelle, M. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276, doi:10.1038/35104500 (2001).
- 97 Leyser, H. M. *et al.* Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**, 161-164, doi:10.1038/364161a0 (1993).
- 98 Lincoln, C., Britton, J. H. & Estelle, M. Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *The Plant cell* **2**, 1071-1080, doi:10.1105/tpc.2.11.1071 (1990).
- 99 Schwechheimer, C., Serino, G. & Deng, X. W. Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *The Plant cell* **14**, 2553-2563 (2002).
- 100 Timpote, C., Lincoln, C., Pickett, F. B., Turner, J. & Estelle, M. The AXR1 and AUX1 genes of Arabidopsis function in separate auxin-response pathways. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **8**, 561-569 (1995).
- 101 Tiryaki, I. & Staswick, P. E. An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant axr1. *Plant physiology* **130**, 887-894, doi:10.1104/pp.005272 (2002).
- 102 Soucy, T. A. *et al.* An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458**, 732-736, doi:10.1038/nature07884 (2009).
- 103 Chamovitz, D. A. *et al.* The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**, 115-121 (1996).
- 104 Wei, N., Chamovitz, D. A. & Deng, X. W. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**, 117-124 (1994).
- 105 Enchev, R. I. *et al.* Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell reports* **2**, 616-627, doi:10.1016/j.celrep.2012.08.019 (2012).
- 106 Dohmann, E. M., Kuhnle, C. & Schwechheimer, C. Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. *The Plant cell* **17**, 1967-1978, doi:10.1105/tpc.105.032870 (2005).
- 107 Schwechheimer, C. *et al.* Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**, 1379-1382, doi:10.1126/science.1059776 (2001).
- 108 Feng, S. *et al.* The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *The Plant cell* **15**, 1083-1094 (2003).
- 109 Dohmann, E. M., Nill, C. & Schwechheimer, C. DELLA proteins restrain germination and elongation growth in Arabidopsis thaliana COP9 signalosome mutants. *European journal of cell biology* **89**, 163-168, doi:10.1016/j.ejcb.2009.12.001 (2010).

- 110 Dohmann, E. M. *et al.* The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* **135**, 2013-2022, doi:10.1242/dev.020743 (2008).
- 111 Wang, X. *et al.* The COP9 signalosome interacts with SCF UFO and participates in Arabidopsis flower development. *The Plant cell* **15**, 1071-1082 (2003).
- 112 Wu, J. T., Lin, H. C., Hu, Y. C. & Chien, C. T. Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nature cell biology* **7**, 1014-1020, doi:10.1038/ncb1301 (2005).
- 113 Zheng, J. *et al.* CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Molecular cell* **10**, 1519-1526 (2002).
- 114 Goldenberg, S. J. *et al.* Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell* **119**, 517-528, doi:10.1016/j.cell.2004.10.019 (2004).
- 115 Feng, S. *et al.* Arabidopsis CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein Degradation. *The Plant cell* **16**, 1870-1882, doi:10.1105/tpc.021949 (2004).
- 116 Bornstein, G., Ganoth, D. & Hershko, A. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11515-11520, doi:10.1073/pnas.0603921103 (2006).
- 117 Emberley, E. D., Mosadeghi, R. & Deshaies, R. J. Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylated SCF by a noncatalytic mechanism. *The Journal of biological chemistry* **287**, 29679-29689, doi:10.1074/jbc.M112.352484 (2012).
- 118 Liu, W. *et al.* Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21429-21434, doi:10.1074/jbc.M000961200 (2000).
- 119 von Arnim, A. G. & Deng, X. W. Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* **79**, 1035-1045 (1994).
- 120 Finkelstein, R. Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **11**, e0166, doi:10.1199/tab.0166 (2013).
- 121 Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E. & Grill, E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **52**, 167-174, doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03234.x (2007).
- 122 Antoni, R., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A. & Rodriguez, P. L. News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Current opinion in plant biology* **14**, 547-553, doi:10.1016/j.pbi.2011.06.004 (2011).
- 123 Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A. & Grill, E. ABA perception and signalling. *Trends in plant science* **15**, 395-401, doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006 (2010).
- 124 Gollack, D., Li, C., Mohan, H. & Probst, N. Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions. *Plant cell reports* **32**, 1007-1016, doi:10.1007/s00299-013-1409-2 (2013).
- 125 Finkelstein, R., Lynch, T., Reeves, W., Petitfils, M. & Mostachetti, M. Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally. *Journal of experimental botany* **62**, 3971-3979, doi:10.1093/jxb/err093 (2011).
- 126 Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K. & Bhattarai, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences* **32**, 501-510 (2007).
- 127 Mohapatra, S. S., Poole, R. J. & Dhindsa, R. S. Abscisic Acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant physiology* **87**, 468-473 (1988).

- 128 Leung, J. & Giraudat, J. Abscisic Acid Signal Transduction. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**, 199-222, doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.199 (1998).
- 129 Ali-Rachedi, S. *et al.* Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**, 479-488, doi:10.1007/s00425-004-1251-4 (2004).
- 130 Jacobsen, J. V., Pearce, D. W., Poole, A. T., Pharis, R. P. & Mander, L. N. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol Plant* **115**, 428-441 (2002).
- 131 Satler, S. O. & Kende, H. Ethylene and the growth of rice seedlings. *Plant physiology* **79**, 194-198 (1985).
- 132 Steber, C. M. & McCourt, P. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **125**, 763-769 (2001).
- 133 Davies, J. K., Jensen, E., Junttila, O., Rivier, L. & Crozier, A. Identification of Endogenous Gibberellins from *Salix pentandra*. *Plant physiology* **78**, 473-476 (1985).
- 134 Lovegrove, A. & Hooley, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in plant science* **5**, 102-110 (2000).
- 135 Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K. & Jacobsen, J. V. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *The Plant cell* **7**, 1879-1891 (1995).
- 136 Finkelstein, R. R. & Lynch, T. J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant cell* **12**, 599-609 (2000).
- 137 Suzuki, M. & McCarty, D. R. Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current opinion in plant biology* **11**, 548-553, doi:10.1016/j.pbi.2008.06.015 (2008).
- 138 Weiner, J. J., Peterson, F. C., Volkman, B. F. & Cutler, S. R. Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current opinion in plant biology* **13**, 495-502, doi:10.1016/j.pbi.2010.09.007 (2010).
- 139 Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Tanokura, M. Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in plant science* **18**, 259-266, doi:10.1016/j.tplants.2012.11.002 (2013).
- 140 Deblaere, R. *et al.* Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* **13**, 4777-4788 (1985).
- 141 Koncz, C. S., J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* **204**, 383-396 (1986).
- 142 Woodcock, D. M. *et al.* Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research* **17**, 3469-3478 (1989).
- 143 Menges, M. & Murray, J. A. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **30**, 203-212 (2002).
- 144 Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S. F., Matsui, M. & Deng, X. W. *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes & development* **16**, 554-559, doi:10.1101/gad.964602 (2002).
- 145 Peeper, D. S., van der Eb, A. J. & Zantema, A. The G1/S cell-cycle checkpoint in eukaryotic cells. *Biochimica et biophysica acta* **1198**, 215-230 (1994).
- 146 Fernandez-Arbaizar, A., Regalado, J. J. & Lorenzo, O. Isolation and characterization of novel mutant loci suppressing the ABA hypersensitivity of the *Arabidopsis* coronatine insensitive 1-16 (*coi-16*) mutant during germination and seedling growth. *Plant & cell physiology* **53**, 53-63, doi:10.1093/pcp/pcr174 (2012).

- 147 Saez, A. *et al.* 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 physiology* **141**, 1389-1399, doi:10.1104/pp.106.081018 (2006).
- 148 Antoni, R. *et al.* PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant physiology* **161**, 931-941, doi:10.1104/pp.112.208678 (2013).
- 149 Wei, N. & Deng, X. W. COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *The Plant cell* **4**, 1507-1518, doi:10.1105/tpc.4.12.1507 (1992).
- 150 Saez, A. *et al.* Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **37**, 354-369 (2004).
- 151 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. . *Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.* (1989).
- 152 Nakagawa, T. *et al.* Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* **104**, 34-41, doi:10.1263/jbb.104.34 (2007).
- 153 Kodama, Y. & Hu, C. D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein-protein interaction: how to calculate signal-to-noise ratio. *Methods in cell biology* **113**, 107-121, doi:10.1016/B978-0-12-407239-8.00006-9 (2013).
- 154 Belda-Palazon, B. *et al.* Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS one* **7**, e46907, doi:10.1371/journal.pone.0046907 (2012).
- 155 Van Leene, J. *et al.* An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nature protocols* **10**, 169-187, doi:10.1038/nprot.2014.199 (2015).
- 156 Van Leene, J. *et al.* Isolation of transcription factor complexes from Arabidopsis cell suspension cultures by tandem affinity purification. *Methods in molecular biology* **754**, 195-218, doi:10.1007/978-1-61779-154-3_11 (2011).
- 157 Van Leene, J., Witters, E., Inze, D. & De Jaeger, G. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in plant science* **13**, 517-520, doi:10.1016/j.tplants.2008.08.002 (2008).
- 158 Chassy, B. M. & Flickinger, J. L. Transformation of Lactobacillus casei by electroporation. . *FEMS Microbiology Letters*. **44**, 173-177 (1987).
- 159 Weigel, D. & Glazebrook, J. Arabidopsis: A Laboratory Manual. . *CSHL Press*. (2002).
- 160 Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**, 735-743 (1998).
- 161 Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A. & Hawes, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* **1**, 2019-2025, doi:10.1038/nprot.2006.286 (2006).
- 162 Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **33**, 949-956 (2003).
- 163 Doyle, J. J. & Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. **12.**, 13-15. (1990).
- 164 Onate-Sanchez, L. & Vicente-Carbajosa, J. DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. *BMC research notes* **1**, 93, doi:10.1186/1756-0500-1-93 (2008).

- 165 Duttweiler, H. M. A highly sensitive and non-lethal beta-galactosidase plate assay for yeast. *Trends in genetics : TIG* **12**, 340-341 (1996).
- 166 Hoffman, C. S. & Winston, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272 (1987).
- 167 Sessions, A., Weigel, D. & Yanofsky, M. F. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **20**, 259-263 (1999).
- 168 Kwok, S. F. *et al.* *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations. *The Plant cell* **10**, 1779-1790 (1998).
- 169 Peng, Z., Serino, G. & Deng, X. W. A role of *Arabidopsis* COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* **128**, 4277-4288 (2001).
- 170 Kwok, S. F., Staub, J. M. & Deng, X. W. Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *Journal of molecular biology* **285**, 85-95, doi:10.1006/jmbi.1998.2315 (1999).
- 171 Manzano, C., Abraham, Z., Lopez-Torrejon, G. & Del Pozo, J. C. Identification of ubiquitinated proteins in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* **68**, 145-158, doi:10.1007/s11103-008-9358-9 (2008).
- 172 Wilkinson, C. R. *et al.* Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature cell biology* **3**, 939-943, doi:10.1038/ncb1001-939 (2001).
- 173 Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**, 2104-2105, doi:10.1093/bioinformatics/bti263 (2005).
- 174 Jin, J., Arias, E. E., Chen, J., Harper, J. W. & Walter, J. C. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Molecular cell* **23**, 709-721, doi:10.1016/j.molcel.2006.08.010 (2006).
- 175 Olma, M. H. *et al.* An interaction network of the mammalian COP9 signalosome identifies Dda1 as a core subunit of multiple Cul4-based E3 ligases. *Journal of cell science* **122**, 1035-1044, doi:10.1242/jcs.043539 (2009).
- 176 Gonzalez-Guzman, M. *et al.* *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant cell* **24**, 2483-2496, doi:10.1105/tpc.112.098574 (2012).
- 177 Seo, M. & Koshiba, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in plant science* **7**, 41-48 (2002).
- 178 Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**, 68-76, doi:10.1038/nature09204 (2010).
- 179 Zhang, X., Garreton, V. & Chua, N. H. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes & development* **19**, 1532-1543, doi:10.1101/gad.1318705 (2005).
- 180 Sirichandra, C. *et al.* The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS one* **5**, e13935, doi:10.1371/journal.pone.0013935 (2010).
- 181 Liu, H. & Stone, S. L. Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *The Plant cell* **22**, 2630-2641, doi:10.1105/tpc.110.076075 (2010).
- 182 Stone, S. L., Williams, L. A., Farmer, L. M., Vierstra, R. D. & Callis, J. KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *The Plant cell* **18**, 3415-3428, doi:10.1105/tpc.106.046532 (2006).

- 183 Saavedra, X. *et al.* The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant physiology* **152**, 133-150, doi:10.1104/pp.109.146381 (2010).
- 184 Bueso, E. *et al.* The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **80**, 1057-1071, doi:10.1111/tpj.12708 (2014).
- 185 Potuschak, T. *et al.* The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant cell* **18**, 3047-3057, doi:10.1105/tpc.106.046508 (2006).
- 186 Wei, N. & Deng, X. W. The COP9 signalosome. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 261-286, doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449 (2003).
- 187 Wei, N., Serino, G. & Deng, X. W. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends in biochemical sciences* **33**, 592-600, doi:10.1016/j.tibs.2008.09.004 (2008).
- 188 Wu, K. *et al.* DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28882-28891, doi:10.1074/jbc.M302888200 (2003).
- 189 Huang, J. *et al.* Jab1 mediates protein degradation of the Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex. *Journal of molecular biology* **371**, 514-527, doi:10.1016/j.jmb.2007.05.095 (2007).
- 190 Ko, J. H., Yang, S. H. & Han, K. H. Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **47**, 343-355, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02782.x (2006).
- 191 Li, H. *et al.* The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2b acts additively with RHA2a in regulating abscisic acid signaling and drought response. *Plant physiology* **156**, 550-563, doi:10.1104/pp.111.176214 (2011).
- 192 Ryu, M. Y., Cho, S. K. & Kim, W. T. The Arabidopsis C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. *Plant physiology* **154**, 1983-1997, doi:10.1104/pp.110.164749 (2010).
- 193 Zhang, Y. *et al.* SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* **19**, 1912-1929, doi:10.1105/tpc.106.048488 (2007).
- 194 Guo, L., Nezames, C. D., Sheng, L., Deng, X. & Wei, N. Cullin-RING ubiquitin ligase family in plant abiotic stress pathways(F). *Journal of integrative plant biology* **55**, 21-30, doi:10.1111/jipb.12019 (2013).
- 195 Leon-Kloosterziel, K. M., van de Bunt, G. A., Zeevaart, J. A. & Koornneef, M. Arabidopsis mutants with a reduced seed dormancy. *Plant physiology* **110**, 233-240 (1996).
- 196 Seo, M. *et al.* Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **48**, 354-366, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02881.x (2006).
- 197 Oh, E. *et al.* PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *The Plant cell* **19**, 1192-1208, doi:10.1105/tpc.107.050153 (2007).
- 198 Xi, W., Liu, C., Hou, X. & Yu, H. MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**, 1733-1748, doi:10.1105/tpc.109.073072 (2010).
- 199 Melcher, K. *et al.* A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**, 602-608, doi:10.1038/nature08613 (2009).
- 200 Santiago, J. *et al.* The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**, 665-668, doi:10.1038/nature08591 (2009).

