

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MAP QUINASAS
DEL SUBGRUPO C1 DE PLANTAS

MARÍA DOLORES ORTIZ MASIÀ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan Carbonell Gisbert
- D. Miguel Pérez Amador
- D^a. Pilar Sánchez Testillano
- D^a. M^a Carmen Risueño Almeida
- D^a. Lola Peñarrubia Blasco

Va ser dirigida per:

D^a. María Jesús Marcote Zaragoza
D. Fernando Aniento Company

©Copyright: Servei de Publicacions
María Dolores Ortiz Masià

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6773-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
MAP QUINASAS DEL SUBGRUPO C1
DE PLANTAS**

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Memoria presentada por
M^a Dolores Ortiz Masiá
para optar al grado de Doctora en Farmacia
Valencia, 2007



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA. FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

MARIA JESÚS MARCOTE ZARAGOZA, Investigadora del Programa Ramón y Cajal en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y

FERNANDO ANIENTO COMPANYY, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "**Caracterización funcional de MAP quinasas del subgrupo C1 de plantas**", ha sido realizada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia **Dña. M^a Dolores Ortiz Masiá**, y que, habiendo revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Burjassot, a 12 de Enero de 2007.

Fdo. M^a Jesús Marcote Zaragoza

Fdo. Fernando Aniento Company

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de los siguientes proyectos: “Señalización y desarrollo del fruto: implicación de las MAP quinasas PERKalfa5” del plan nacional I+D (BIO2002-4083-C03-01) y “Análisis de la función de las MAPKs de *Arabidopsis thaliana* PERKalfa5” de la Generalitat Valenciana (Conselleria de Innovación y Competitividad) (CTIDIB/2002/67).

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado durante el periodo de disfrute de una beca V SEGLES de la Universitat de València, durante los años 2002-2006.

a L.A.

Agradecimientos

Hace ya cinco años que empezó mi vida cerca de un laboratorio. En todo este tiempo he tenido la oportunidad de aprender cosas fascinantes y de conocer a muchísima gente dentro y fuera del laboratorio. Y ha llegado el momento de detener mi vida por un instante y agradecer a todas esas personas que han compartido conmigo todo este tiempo.

Quiero expresar mi gratitud a mis directores de tesis. A M^a Jesús por ser mi guía, mi maestra, mi amiga y compañera durante estos cinco años. Y gracias a Fernando por ser un fantástico maestro y haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia. Ha sido un verdadero placer compartir estos cinco años con vosotros.

Gracias también a toda la gente que ha compartido conmigo mi paso por el laboratorio. En mis primeros años: a Ele, por ser una trabajadora feroz, una maestra y una amiga. A Inma, por tu alegría y tu amistad. Eres única. Gracias Ana, Dani y Jose, por nuestras comidas, fiestas y viajes compartidos. Gracias Maria, Rosa, Amparo y Luisa, por los cafés, comidas, cenas, viajes y charlas compartidas. A Guille, mi compi en este viaje, por tus consejos, por nuestras charlas tan beneficiosas y tus ánimos. Ha sido un gustazo tenerte de compi. Y en mis últimos años: a Esther, Vanessa y Amparo, por esos cafes matutinos y comidas compartidas. Al señor Paco, por ponerle una sonrisa a la vida. Y a Emilio, por su compañía y sus ánimos en la recta final de esta tesis.

Gracias a todos los miembros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la sección de Farmacia, por el ambiente tan bueno que siempre se ha respirado en el laboratorio. A Joaquín Timoneda y Teresa Barber por su ayuda y colaboración. Gracias Julio, por tus consejos siempre tan acertados y tu ayuda. A Luís, Pilar, Ernesto y Vicente por vuestra cercanía. Gracias Joana. Gracias Joan por tu ayuda en los pequeños problemas del día a día.

Gracias a Jesús, Fran y Eva del departamento de Fisiología Vegetal, por su ayuda y cercanía.

No me puedo olvidar de mi gran familia del IBMCP, que me ha apoyado tanto durante la construcción de esta tesis. A Juan Carbonell y Miguel Pérez, por su apoyo, colaboración e implicación en este proyecto. A David por sus consejos siempre tan útiles. A Toni y a Miguel Blázquez por sus consejos y por mostrarme siempre su punto de vista.

Y por supuesto millones de gracias a todos los que le dais vida al L12, L13 y L20, por los seminarios y cenas/comidas compartidas y por vuestra cercanía. A Eugenio y Carol por ser el alma del grupo. Gracias Pablo por tu ayuda y colaboración en los microarrays, eres el mejor. Gracias Eavan, Pako, Martín, Leo, Sofía, Eugenio y Carol por las charlas, fiestas y congresos compartidos, en especial por el congreso de Évora el cual no creo que olvide. Gracias Clara, Laura y Cristina Martí por las charlas y cigarrillos compartidos en la escalera. Gracias M^a Ángeles, gracias Cris (Urbez) por vuestra ayuda y cercanía.

A mis cositas, a Xena, a de Miguel, a Tere, a mi prima Ani, a M^a Jo y a mi fiel amiga Amparo, compañeras de mil batallas y mil historias (y las que vendrán!!) por darle color a esta tesis y por estar siempre.

Gracias Azahar, gracias Majio, gracias Ele, gracias Toñi, gracias Encarni, por preocuparos siempre tanto por mí, por las risas compartidas, por nuestras escapadas a Alicante siempre tan deliciosas y singulares, y por ser las mejores marujonas.

Gracias Alfonso, mi niño, por nuestras maravillosas escapadas, por cuidar de mí, por convertir los malos momentos en buenos y por tu amor.

Y sobre todo, gracias a mi familia. A mi hermana Geno, compañera fiel de buenos y malos momentos, por tus consejos y tu ayuda incondicional. A mi hermano Kike, por ser un solete y aguantar pacientemente mis ensayos. A mi abuelita Geno, por su compañía. A mi papi por su confianza en mí. Y a mi mami por ser la mejor mami del mundo y no fallarme nunca.

A todos, muchas gracias.

do

“...y después de tanto ruido, por fin llego el final...”

J. Sabina



Índice de Contenidos

ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN TESIS DOCTORAL	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
1. MAP quinasas en plantas	2
1.1 MAP quinasas: unidades básicas en la transducción de señales	2
1.1.1 Activación de las MAP quinasas	3
1.1.2 Desactivación de las MAP quinasas	8
1.1.3 Dianas de las MAP quinasas	9
1.2 Clasificación y funciones de las MAPKs de plantas	11
2. Respuestas reguladas por MAP quinasas de plantas	17
2.1 MAP quinasas en ciclo celular y desarrollo	18
2.2 MAP quinasas y señalización hormonal	19
2.2.1 Auxinas	19
2.2.2 Ácido Abscísico (ABA)	20
2.2.3 Giberelinas (GAs) y citoquininas	22
2.2.4 Etileno (ET)	22
2.3 MAP quinasas y señalización de estrés	25
2.3.1 Estrés Abiótico	26
2.3.2 Estrés Biótico	29
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Material Biológico	43
1.1 Material Vegetal	43
1.1.1 Condiciones de cultivo de las plantas	44

1.1.2 <i>Tratamientos</i>	48
1.2. Microorganismos	50
1.2.1. <i>Cepas bacterianas</i>	50
1.2.2 <i>Condiciones de cultivo de microorganismos</i>	50
1.2.3 <i>Medio de cultivo</i>	51
2. Aislamiento y Purificación de Ácidos Nucleicos	52
2.1 Aislamiento ADN plasmídico	52
2.1.1 <i>Aislamiento de ADN plasmídico de Escherichia coli</i>	52
2.1.2 <i>Aislamiento de ADN plasmídico de Agrobacterium tumefaciens</i>	53
2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	53
2.3 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	54
2.4 Extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol	54
2.5 Secuenciación	55
2.6 Extracción y Purificación de ARN total de <i>A. thaliana</i> y <i>Pisum sativum</i> L	56
3. Manipulación de Ácidos Nucleicos	57
3.1 Reacciones enzimáticas	57
3.1.1 <i>Digestiones con enzimas de restricción</i>	57
3.1.2 <i>Tratamiento con enzimas modificadores</i>	58
3.2 Vectores plasmídicos	58
3.3 Expresión de <i>PsMAPK2</i> en <i>E. coli</i>	59
3.4 Obtención de diferentes versiones de <i>PsMAPK2</i>	60
3.5 Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que expresan las diferentes versiones de <i>PsMAPK2</i>	61
3.5 Síntesis de ADNc por retrotranscripción (RT)	65
3.6 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos de ADNc	65
4. Transformación de Bacterias	68
4.1 Preparación de células competentes y métodos de transformación	68
4.1.1 <i>Transformación mediante choque térmico</i>	68
4.1.2 <i>Transformación por electroporación</i>	68
4.1.3 <i>Selección de recombinantes</i>	69
5. Transformación de Plantas	70
5.1 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
5.2 Análisis fenotípico y genotípico de las líneas transgénicas	72
6. Extracción e Inmunoprecipitación de Proteínas	74
6.1 Extracción de proteínas	74
6.2 Determinación de la concentración de proteínas	75

6.3 Anticuerpos específicos de MAP quinasas del subgrupo C1 de plantas	75
6.4 Inmunoprecipitación de proteínas	76
7. Ensayo de Actividad MAP quinasa	78
7.1 Sistema no radioactivo MAP Kinase Assay Kit	79
7.1.1 Cálculo de la actividad quinasa	80
7.1.2 Titulación <i>Erk1</i>	81
7.2 Sistema radioactivo ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP)	82
7.2.1 Cálculo actividad quinasa	83
8. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida, SDS-PAGE	85
8.1 Soluciones, tampones utilizados y procedimiento	85
9. Detección de Proteínas: Análisis Western	87
9.1 Soluciones, tampones empleados y procedimiento	87
9.2 Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa	89
9.3 Detección por quimioluminiscencia	90
RESULTADOS	91
1. Caracterización de PsMAPK2, una MAPK de Guisante	93
1.1 Expresión de <i>PsMAPK2</i> en <i>Pisum sativum L</i>	94
1.2 Expresión constitutiva de <i>PsMAPK2</i> en un sistema transgénico heterólogo	95
1.2.1 Obtención de las líneas <i>35S::PsMAPK2-GOF</i>	97
1.2.2 Obtención de las líneas <i>35S::PsMAPK2-LOF</i>	102
1.2.3 Obtención de las líneas <i>35S::PsMAPK2</i>	106
1.2.4 Obtención de las líneas control <i>pCHF3</i>	110
1.2.5 Análisis fenotípico de plantas <i>35S::PsMAPK2-GOF</i> , <i>35S::PsMAPK2-LOF</i> y <i>35S::PsMAPK2</i>	112
1.3 Activación de <i>PsMAPK2</i>	117
1.3.1 Activación por daño mecánico	117
1.3.2 Activación por JA	119
1.3.3 Activación por ABA y H_2O_2	120
2. Caracterización de AtMPK1 y AtMPK2, MAPKs de Arabidopsis	123
2.1 Expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> en <i>A. thaliana</i>	123
2.1.1 Regulación de la expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> por LUZ	125
2.2 Activación de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i>	130
2.2.1 Activación por daño mecánico	130
2.2.2 Activación por JA	136
2.2.3 Activación por ABA y H_2O_2	142

CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	163

Índice de Tablas

Tabla 1.	Funciones biológicas en las que están implicadas las MAP quininas de plantas, indicando a qué subgrupo pertenecen	13
Tabla 2.	Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las MAPKs del subgrupo C1	15
Tabla 3.	Genotipos, ecotipos y procedencia de las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas en este trabajo	44
Tabla 4.	Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	50
Tabla 5.	Plásmidos utilizados en este trabajo	59
Tabla 6.	Cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR	67
Tabla 7.	Antibióticos y sus concentraciones utilizadas	69
Tabla 8.	Anticuerpos utilizados para las inmunoprecipitaciones en este trabajo	77
Tabla 9.	Anticuerpos utilizados en este trabajo y las diluciones empleadas	89
Tabla 10.	Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> T ₂ 35S:: <i>PsMAPK2-GOF</i>	99
Tabla 11.	Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> T ₂ 35S:: <i>PsMAPK2-LOF</i>	104

Tabla 12.	Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> T ₂ 35S::PsMAPK2	107
Tabla 13.	Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> T ₂ pCHF3	111

Índice de Figuras

Figura 1.	Componentes de la cascada de MAP quinasas	6
Figura 2.	Componentes de las cascadas de MAP quinasas de <i>Arabidopsis</i>	7
Figura 3.	Árbol filogenético y estructura de los dominios de las MAPKs de plantas	14
Figura 4.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PsMAPK2 (guisante) (Marcote & Carbonell, 2000), AtMPK1 y AtMPK2 (<i>Arabidopsis</i>) (Mizoguchi <i>et al.</i> , 1994), Ntf3 (tabaco) (Wilson <i>et al.</i> , 1993) y PMEK1 (petunia) (Decroocq-Ferrant <i>et al.</i> , 1995)	16
Figura 5.	Ilustración esquemática de las rutas MAPKs de señalización en división celular y desarrollo	19
Figura 6.	Ilustración esquemática de la posible función de las cascadas MAPKs en la señalización de etileno y auxinas	24
Figura 7.	Puntos de convergencia de rutas de señalización de estrés abióticos y bióticos	26
Figura 8.	Ruta de señalización de <i>Arabidopsis</i> en la que interviene una cascada de MAP quinasas	30
Figura 9.	Modelo de señalización del daño en <i>A. thaliana</i>	34
Figura 10.	Representación esquemática de la interconexión entre diferentes rutas de MAP quinasas	37
Figura 11.	Hoja de <i>Arabidopsis</i> antes del tratamiento de daño (A) y después del tratamiento de daño (B)	48

Figura 12.	Secuencia de nucleótidos del ADNc de <i>PsMAPK2</i> , que incluye la secuencia del epítopo HA adicionado	61
Figura 13.	Esquema de la estructura del T-DNA para los distintos ADNc (<i>PsMAPK2-GOF</i> , <i>PsMAPK2-LOF</i> y <i>PsMAPK2</i>) utilizados para transformar <i>A. thaliana</i>	63
Figura 14.	Esquema del diseño, obtención y construcción de las diferentes versiones mutantes de <i>PsMAPK2</i>	64
Figura 15.	Esquema básico de la medida de actividad proteín quinasa	79
Figura 16.	Esquema del ensayo de actividad MAP quinasa no radioactivo	79
Figura 17.	Titulación Erk1	81
Figura 18.	Esquema del ensayo de actividad MAP quinasa radioactivo	82
Figura 19.	Análisis de los niveles de expresión de <i>PsMAPK2</i> en planta adulta de <i>Pisum sativum</i>	94
Figura 20.	Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del ADNc de <i>PsMAPK2</i> , que incluye el epítopo HA adicionado	96
Figura 21.	El anticuerpo anti- <i>PsMAPK2</i> reconoce a <i>PsMAPK2</i> expresada en <i>E.coli</i> como proteína de fusión GST- <i>PsMAPK2</i>	97
Figura 22.	Expresión de <i>PsMAPK2-GOF</i> en plántulas <i>35S::PsMAPK2-GOF</i>	100
Figura 23.	Análisis de la actividad proteín quinasa de <i>PsMAPK2-GOF</i>	102
Figura 24.	Expresión de <i>PsMAPK2-LOF</i> en plántulas <i>35S::PsMAPK2-LOF</i>	105

Figura 25.	Expresión de PsMAPK2 en plántulas 35S:: <i>PsMAPK2</i>	109
Figura 26.	Análisis de la actividad proteín quinasa de PsMAPK2	110
Figura 27.	Fenotipo de las plantas 35S:: <i>PsMAPK2-GOF</i>	113
Figura 28.	Fenotipo de las plantas 35S:: <i>PsMAPK2-GOF</i> y 35S:: <i>PsMAPK2-LOF</i>	114
Figura 29.	Cruce de una planta 35S:: <i>PsMAPK2-LOF</i> con polen de una línea silvestre	115
Figura 30.	Los jasmonatos no revierten el fenotipo de esterilidad de las plantas 35S:: <i>PsMAPK2-LOF</i>	116
Figura 31.	Activación de PsMAPK2 por daño mecánico	118
Figura 32.	Activación de PsMAPK2 por JA	120
Figura 33.	Activación de PsMAPK2 por ABA y H ₂ O ₂	122
Figura 34.	Expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> en planta adulta de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ecotipo Col)	124
Figura 35.	Expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> en un ciclo de luz/oscuridad	126
Figura 36.	Expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> en condiciones de luz continua	127
Figura 37.	Expresión de <i>AtMPK1</i> y <i>AtMPK2</i> en plántulas etioladas transferidas a luz	128
Figura 38.	Respuesta a la luz de plántulas etioladas de las líneas silvestre y del doble mutante <i>Atmpk1 Atmpk2</i>	130

Figura 39.	Secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de MAPKs del grupo C	131
Figura 40.	Estudio de la especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 por análisis Western	132
Figura 41.	Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño mecánico	134
Figura 42.	Especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2	135
Figura 43.	Cinética de activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño mecánico	136
Figura 44.	Activación de AtMPK1 por JA	138
Figura 45.	Activación de AtMPK2 por JA.	139
Figura 46.	Análisis mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>AtLOX2</i> , <i>AtAOS</i> y <i>AtVSP2</i> tras el tratamiento de daño	140
Figura 47.	Activación por daño de AtMPK1 y AtMPK2 en <i>coi1</i>	141
Figura 48.	Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por ABA	143
Figura 49.	Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por H ₂ O ₂	144

Abreviaturas

aa: aminoácido	MAPKKK (o MAP3K o MEKK): MAPKK quinasa
ABA: ácido abscísico	MeJA: metil jasmónico
ACS: 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa	MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico
ADNc: ADN complementario	MOPS: ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
Amp: ampicilina	MKP: MAPK fosfatasa
APS: persulfato de amonio	MS: medio de Murashige y Skoog
ARNi: ARN interferente	Ms: <i>Medicago sativa</i>
At: <i>Arabidopsis thaliana</i>	Nt: <i>Nicotiana tabacum</i>
Avr: genes de patógenos virulentos	N-terminal: amino-terminal
CaMV 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	OGAs: oligosacáridos
Col: Columbia	Os: <i>Oryza sativa</i>
Col E1 ori: origen de replicación en <i>E. coli</i>	PAS: proteína A sefarosa
C-terminal: carboxi-terminal	PBM: proteína básica de mielina
DMSO: dimetilsulfóxido	pPBM: proteína básica de mielina fosforilada
DTT: ditioneol	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
DSP: dual specificity MAPK phosphatase	Ph: <i>Petunia hybrida</i>
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PP2C: proteína fosfatasa del tipo 2C
EGTA: ácido etilen glicol-bis [β-aminoetil eter]-N,N,N',N'-tetraacético	Ps: <i>Pisum sativum</i>
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares	PR: proteína de resistencia
ET: etileno	PTP: fosfotirosina fosfatasa
flg22: elicitador flagelina 22	R: resistencia
FLS2: receptor del tipo LRR	RBCS: terminador de la rubisco
F1 ori: origen de replicación en bacteriófago	ROS: especies reactivas de oxígeno
GAs: giberelinas	RT: retrotranscripción
HR: respuesta de hipersensibilidad	RTKs: receptores tipo tirosina quinasa
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactósido	SAR: resistencia sistémica adquirida
JA: ácido jasmónico	SA: ácido salicílico
Kan: kanamicina	SDS: dodecil sulfato sódico
kDa: kilodalton	Spe: espectinomina
Kb: kilobase	TA: temperatura ambiente
Lac Z: región N-terminal del gen de la β-galactosidasa	TBE: tampón borato-EDTA
LB: medio Luria-Bertani	TBS: tampón tris salino
MAPK: MAP quinasa	TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM
MAPKK (o MAP2K o MEK): MAPK quinasa	TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
	Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
	U.A.: unidades arbitrarias
	WB: análisis Western

Resumen Tesis Doctoral

En plantas, la señalización a través de las cascadas de MAP quinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares que incluyen la división y diferenciación celular, así como respuestas a estrés de origen abiótico o biótico (Mishra *et al.*, 2006).

Las MAP quinasas de plantas pueden ser clasificadas, en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos, en cuatro grupos (A-D). Las MAP quinasas de cada grupo se han clasificado a su vez en dos subgrupos (1 y 2). Se dispone de muy poca información acerca de los miembros del subgrupo C1 (Nakagami *et al.*, 2005). Dentro de este grupo se encuentran *Ntf3* de tabaco, *PhMEK1* de petunia y *PsMAPK2* de guisante. Se han descrito cambios en los niveles de ARNm de *Ntf3* durante el desarrollo del polen (Wilson *et al.*, 1993) y de *PhMEK1* durante el desarrollo del ovario (Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995). En *Arabidopsis*, el subgrupo C1 está constituido por dos genes de MAP quinasas: *AtMPK1* (*At1g10210*) y *AtMPK2* (*At1g59580*). La función de estos genes no se conoce, aunque hay algún dato que indica una posible relación entre esos genes y respuestas de estrés. Se ha descrito que los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* aumentan ligeramente tras un tratamiento de salinidad (Mizoguchi *et al.*, 1996), y que disminuyen a las 24 horas tras un tratamiento a baja temperatura (Vogel *et al.*, 2005). Además, resultados obtenidos mediante análisis de micromatrices indican que la expresión de *AtMPK1* es mayor en plántulas crecidas en oscuridad que en plántulas crecidas en presencia de luz (Ma *et al.*, 2005). El análisis de los datos de expresión depositados en bases de datos de acceso público indican que los niveles de expresión de estos genes son muy bajos y que no hay cambios relevantes tras las diferentes condiciones ensayadas (Zimmermann *et al.*, 2004; *Arabidopsis*

Functional Genomics Consortium (AFGC) Microarrays databases). No hay ningún dato sobre la regulación de la actividad quinasa de las MAP quinasas del subgrupo C1.

La presente Tesis aborda el estudio de la función de *PsMAPK2* (guisante), *AtMPK1* y *AtMPK2* (*Arabidopsis*), genes que codifican MAP quinasas del subgrupo C1. Para emprender dicho estudio, en este trabajo se han realizado diferentes aproximaciones: 1- Se ha analizado la expresión de estas MAPKs en distintos órganos de la planta; 2- Se han obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan distintas versiones mutantes de *PsMAPK2*; 3- Se ha analizado la actividad quinasa de estas MAPKs en respuesta a distintas señales de estrés.

Según resultados obtenidos por RT-PCR, *PsMAPK2* se expresa en todos los órganos de guisante y principalmente en anteras. Por otro lado la expresión de las distintas versiones de *PsMAPK2* en *Arabidopsis* da lugar a un fenotipo de esterilidad masculina, debido a que no se produce la dehiscencia de las anteras y la posterior liberación del polen. Estos resultados sugieren una posible función de *PsMAPK2* en el desarrollo de las anteras.

AtMPK1 y *AtMPK2* se expresan en todos los órganos de *Arabidopsis*. Además, el análisis de la expresión de ambas MAPKs en plántulas indica que la luz disminuye su expresión tanto en plántulas crecidas con ciclos de luz/oscuridad como en plántulas etioladas cuando se transfieren a la luz. El estudio de la respuesta a la luz de plántulas etioladas del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* revela que estas plántulas presentan una inhibición de la desetiolización con respecto a la línea silvestre, sugiriendo la participación de *AtMPK1* y *AtMPK2* en el proceso de desetiolización.

Por último, en la presente Tesis se ha demostrado por primera vez la regulación de la actividad de *PsMAPK2* y *AtMPK1/2* en respuesta a una señal. Se ha detectado un aumento en la actividad quinasa de *PsMAPK2* y *AtMPK1/2* en respuesta al daño mecánico y al ácido jasmónico. Además,

otras moléculas señalizadoras de estrés como el ácido abscísico y el peróxido de hidrógeno también regulan la actividad quinasa de PsMAPK2 y AtMPK1/2.



Introducción

1. MAP Quinasas en plantas

- 1.1 MAP quinasas: unidades básicas en la transducción de señales
 - 1.1.1 Activación de las MAP quinasas
 - 1.1.2 Desactivación de las MAP quinasas
 - 1.1.3 Dianas de las MAP quinasas
- 1.2 Clasificación y funciones de las MAP quinasas de plantas

2. Respuestas reguladas por MAP quinasas de plantas

- 2.1 MAP quinasas en ciclo celular y desarrollo
 - 2.2 MAP quinasas y señalización hormonal
 - 2.2.1 Auxinas
 - 2.2.2 Ácido Abscísico
 - 2.2.3 Giberelinas y citoquininas
 - 2.2.4 Etileno
 - 2.3 MAP quinasas y señalización de estrés
 - 2.3.1 Estrés Abiótico
 - 2.3.1.1 Ozono y estrés oxidativo
 - 2.3.1.2 Salinidad y bajas temperaturas
 - 2.3.2 Estrés Biótico
 - 2.3.2.1 Elicitores
 - 2.3.2.2 R-Avr
 - 2.3.2.3 Daño
 - 2.4 Interconexión entre rutas de MAP quinasas de plantas
-

Apartado 1

MAP quinasas en plantas

1.1 MAP quinasas: unidades básicas en la transducción de señales

1.1.1 Activación de las MAP quinasas

1.1.2 Desactivación de las MAP quinasas

1.1.3 Dianas de las MAP quinasas

1.2 Clasificación y funciones de las MAP quinasas de plantas

1.1 MAP quinasas: unidades básicas en la transducción de señales

Las plantas, como seres inmóviles, constantemente responden y se adaptan a los cambios que se producen en el ambiente que les rodea y pueden así crecer y desarrollarse normalmente. Son capaces de percibir los cambios que se producen en el ambiente y transmiten de forma específica esta información a la maquinaria genética del núcleo, para regular la respuesta. Distintos grupos de investigación han identificado y caracterizado diversas moléculas de señalización de plantas y se ha puesto de manifiesto que la modificación post-traducciona de proteínas juega un papel central en las diferentes cascadas de señalización. En particular, la fosforilación/desfosforilación de proteínas por proteínas quinasas/fosfatasa está implicada en la mayoría de las rutas de señalización (Clark *et al.*, 2001; Hardie, 1999; Luan, 2003).

En plantas se han identificado y clasificado distintos tipos de proteínas quinasas. Una de las categorías más importantes es la de las MAP quinasas (o MAPK, siglas correspondientes al término inglés *mitogen-activated protein kinase*), que se encuentran distribuidas tanto en el núcleo

como en el citoplasma de la célula y participan en distintas rutas de transducción de señales (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

La transducción de señales mediante MAP quinasas tiene lugar a través de una cascada lineal, formada generalmente por tres quinasas que se activan unas a otras de forma consecutiva mediante reacciones de fosforilación. El último componente de la serie son las MAP quinasas (MAPK), que son fosforiladas y activadas por una MAP quinasa quinasa (MAPK quinasa, MAPKK, MEK o MAP2K), la cual ha sido a su vez activada por una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKK quinasa, MAPKKK, MEKK o MAP3K) (Raman & Cobb, 2003). En todos los eucariotas, la señalización a través de las cascadas de MAP quinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares, incluyendo la división y diferenciación celular así como la respuesta a distintos tipo de estrés. En plantas, las MAP quinasas se encuentran representadas por familias multigénicas y se organizan dentro de complejas rutas de señalización. La señalización para la división celular y la repuesta a estrés en plantas se encuentra mediada por MAP quinasas y, de igual modo, las auxinas, el ácido abscísico y posiblemente el etileno y las citoquininas también utilizan rutas de MAP quinasas. Gran parte del estrés de origen biótico (patógenos y elicitores derivados de patógenos), incluido el daño, y de origen abiótico (salinidad, bajas temperaturas, drogas y oxidación) pueden inducir en las plantas respuestas de defensa a través de rutas de MAP quinasas (Mishra *et al.*, 2006).

1.1.1 Activación de las MAP quinasas

En las cascadas de MAPKs, las MAP3Ks forman generalmente el primer componente del sistema de fosforilaciones y activan a las MAP2Ks por fosforilación de dos residuos de serina/treonina en el motivo conservado S/T-X₅-S/T (donde X es cualquier aminoácido) (Ahn *et al.*, 1993; Alessi *et*

al., 1994). Las MAP3Ks tienen en su secuencia de aminoácidos distintos motivos que les confieren selectividad para ser activadas en respuesta a determinados estímulos. La activación de las MAP3Ks puede ocurrir directamente por interacción con el receptor (y/o fosforilación) o a través de otras proteínas que actúan como puente entre el receptor y las MAP3Ks. En algunos casos están implicadas proteínas quinasas conocidas como MAP3K quinasas (MAP4Ks) (Dan *et al.*, 2001).

La activación de las MAPKs se produce por fosforilación de los residuos de treonina y tirosina (Thr-X-Tyr; X es cualquier aminoácido) localizados en el dominio de activación (T-loop) por una MAP2K, una proteína quinasa de doble especificidad (Matsuda *et al.*, 1992; Payne *et al.*, 1991). Las MAPKs fosforilan residuos de serina/treonina de una proteína diana y son heterogéneas en cuanto a sus sustratos, ya que fosforilan una gran variedad de sustratos, incluyendo factores de transcripción, proteínas quinasas y proteínas del citoesqueleto.

Así pues, las células reciben distintos estímulos del entorno de tal forma que el sistema de fosforilaciones de MAPKs actúa como sistema de transducción de señales y traslada la información desde los receptores, que reciben el estímulo, hasta la diana efectora que generará una respuesta ante ese determinado estímulo, controlando así funciones celulares de vital importancia (**Fig. 1**) (Pearson *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado, las rutas de MAPKs están formadas por varios componentes, por lo que es importante entender cómo una determinada señal es transmitida hasta una diana concreta. La especificidad de la señal es una de las características más importantes de las rutas de MAP quinasas, y viene determinada por los dominios de unión presentes en algunos componentes de los módulos MAPKs o a través de las llamadas proteínas de andamiaje (del inglés “*scaffold*”) (Morrison & Davis, 2003). Las MAP quinasas de una ruta en particular pueden unirse mediante los dominios de unión o mediante las proteínas de andamiaje,

formando complejos enzimáticos conocidos como “signalosomas” (Chang & Karin, 2001; Whitmarsh & Davis, 1998;). Un ejemplo es la ruta de *Hog 1* en levadura, donde la especificidad entre la MAPK y su quinasa activadora se debe a señales de andamiaje que se encuentran en el extremo N-terminal de la MAPKK (Bardwell *et al.*, 2001; Sharrocks *et al.*, 2000). Las proteínas de andamiaje implicadas en cascadas de MAPKs se han estudiado sobre todo en levadura. Recientemente se han identificado en eucariotas superiores y se tienen evidencias de que pueden estar implicadas en controlar la localización de las MAP quinasas activas dentro de la célula, así como la duración de su activación (Dard & Peter, 2006).

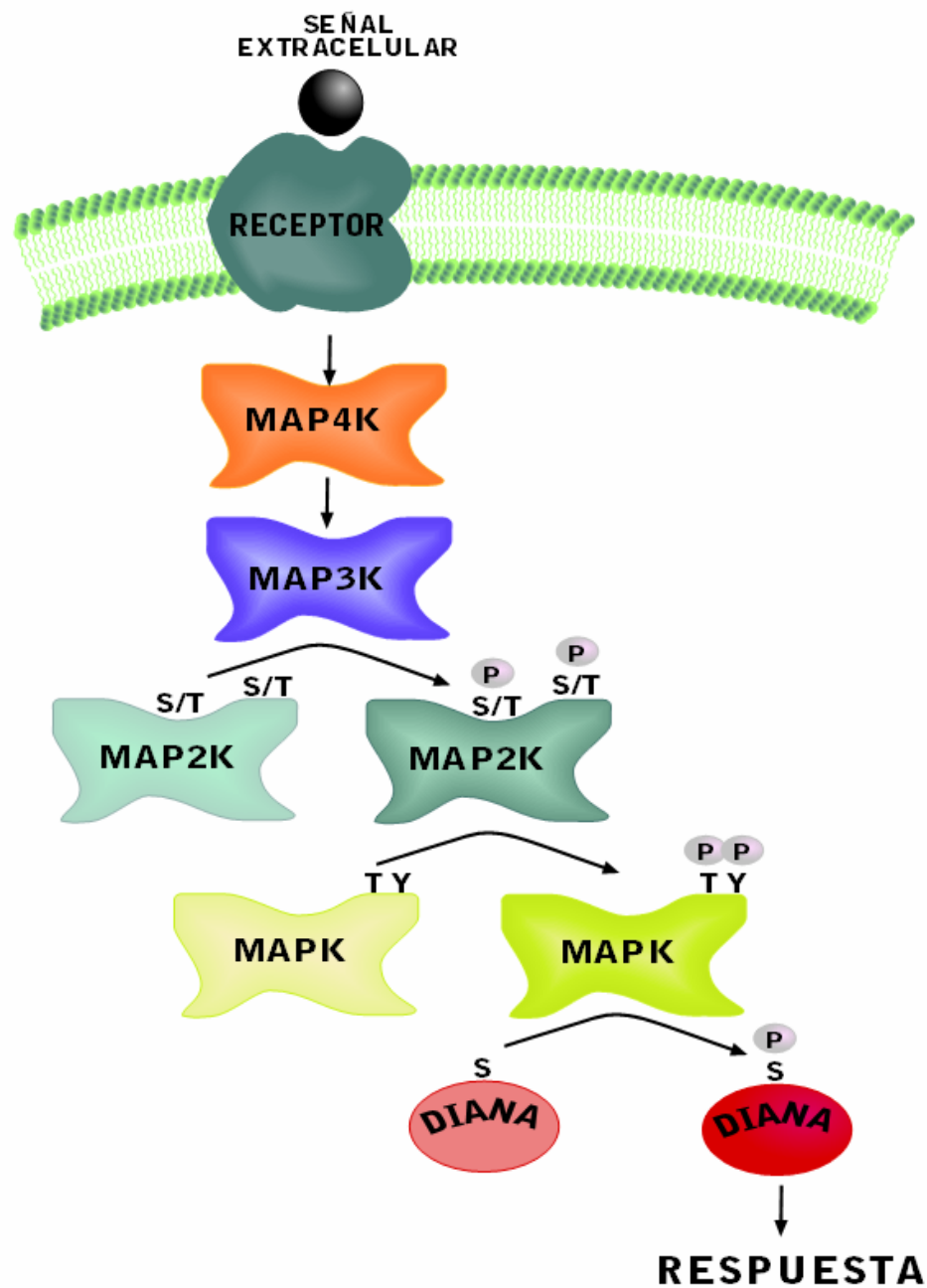


Figura 1. Componentes de la cascada de MAP quinasas

El genoma de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sólo contiene 6 MAPKs, 4 MAP2K, 5 MAP3K y 5 MAP4Ks, mientras que el genoma humano contiene 14 MAPKs, 8 MAP2Ks, 12 MAP3Ks y 31 MAP4Ks

(Champion *et al.*, 2004). En el análisis del genoma de *Arabidopsis* se han identificado 20 MAPK, 10 MAP2Ks, 60-80 MAP3Ks y 10 MAP4Ks (Clark *et al.*, 2001; Ichimura, 2002) (**Fig. 2**). El número de MAP2Ks en el genoma de *Arabidopsis* es sólo la mitad del número de MAPKs, por lo que probablemente las MAP2Ks activan a múltiples MAPKs. Por ello, las interconexiones entre las rutas de transducción de señales de MAPKs pueden ser más abundantes a este nivel en las cascadas de MAPKs de plantas (Ichimura, 2002). Las MAP2Ks de plantas poseen como sitio de fosforilación el motivo S/T-X₅-S/T (donde X es un aminoácido cualquiera) y como posible dominio de unión a MAPKs el motivo K/R-K/R-K/R-X1-6-L-X-L/V/I. Se han caracterizado algunas MAP2Ks de *Arabidopsis*, como por ejemplo AtMKK1 y AtMKK2 (Dai *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006).

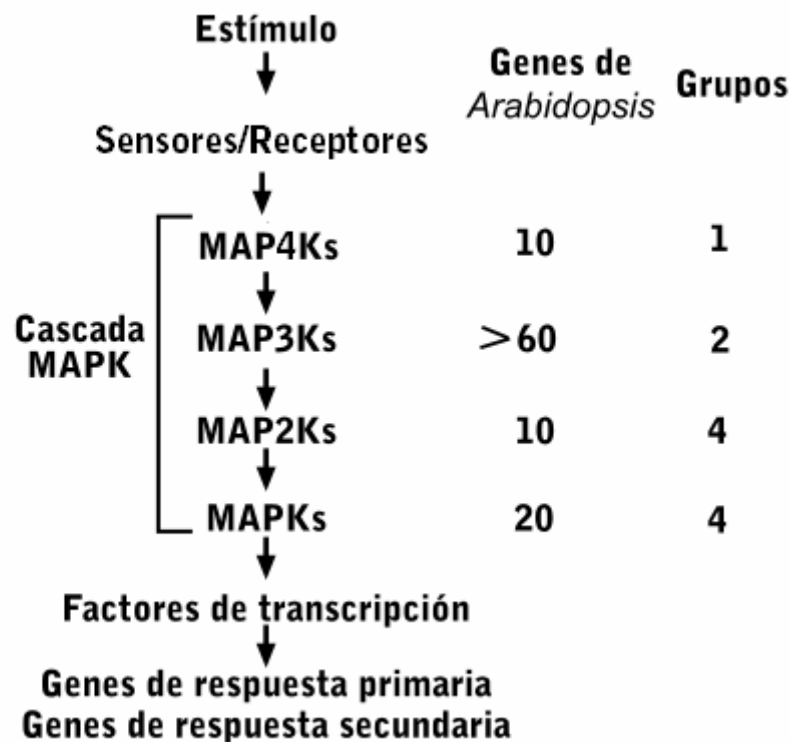


Figura 2. Componentes de las cascadas de MAP quinasas de *Arabidopsis*

En la gran familia de MAP3Ks identificada en el genoma de *Arabidopsis* pueden distinguirse dos grupos en base a la similitud de su secuencia de aminoácidos con las MAP3Ks de mamíferos: las proteínas quinasas similares a MEKK, y las proteínas quinasas similares a Raf (Ichimura, 2002). En *Arabidopsis* se han caracterizado algunos homólogos de MAP3Ks del tipo MEKK, como por ejemplo ANP1, ANP2, ANP3 (Kovtun *et al.*, 2000) y YDA (Lukowitz *et al.*, 2004) de *Arabidopsis*; y del tipo Raf, como por ejemplo EDR1 y CTR1 de *Arabidopsis* (Frye *et al.*, 2001; Kieber *et al.*, 1993).

Análisis realizados con el sistema de doble híbrido de levadura y la expresión transitoria de componentes de cascadas de MAP quinasas en *Arabidopsis*, tabaco y *Medicago* han sugerido que componentes de una ruta de MAPKs pueden funcionar con combinaciones diferentes y tener funciones distintas según el contexto biológico. Recientemente, análisis genéticos han demostrado que, dependiendo del estímulo, una MAP2K puede interactuar con diferentes MAPKs (Cardinale *et al.*, 2002). Además, las MAP3Ks pueden asociarse con diferentes MAP2Ks y funcionar en diferentes rutas. Por ejemplo, AtMEKK1 de *Arabidopsis* funciona con AtMKK4 y AtMKK5 en defensa de patógenos (Asai *et al.*, 2002), pero también puede activar a AtMKK2 durante el estrés abiótico (Teige *et al.*, 2004).

1.1.2 Desactivación de las MAP quinasas

La desactivación de las MAP quinasas implica la desfosforilación de los residuos de treonina y tirosina del motivo T-X-Y de su dominio de activación. A igual que la activación, la desactivación de las MAP quinasas está también estrechamente regulada y está catalizada por fosfatasas. Éstas tienen diferente especificidad y localización subcelular. Se han

descrito fosfatasas que desactivan MAPKs, y son conocidas como MAPK fosfatasas, entre las que se encuentran las familias de fosfatasas DSP (del inglés *dual specificity phosphatases*), PP2C (del inglés *protein phosphatase 2C*), y PTP (del inglés *protein tyrosine phosphatase*) (Gupta *et al.*, 1998; Meskiene *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). En plantas se han aislado varias fosfatasas que son capaces de desactivar MAP quinasas. En *Arabidopsis*, AtDsPTP1, un miembro de la familia de fosfatasas DSP, inactiva *in vitro* a AtMPK4 (Gupta *et al.*, 1998). En el análisis del genoma de *Arabidopsis* se han identificado 11 DSPs. La fosfatasa ABI1 (del inglés *ABA insensitive 1*) está implicada en la ruta de señalización de ABA y se cree que desfosforila un miembro de la cascada de MAPKs (Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.* 1994). AtMKP1 es una fosfatasa reguladora de la ruta de MAPKs que responde a agentes que dañan el ADN (Ulm *et al.*, 2001). Se ha descrito que AtMKP1 posee mayor afinidad por AtMPK6 que por AtMPK3 y AtMPK4 (Ulm *et al.*, 2002).

1.1.3 Dianas de las MAP quinasas

En animales y levaduras, la activación de las cascadas de MAPKs se produce a través de proteínas G acopladas a receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) o histidina quinasa del sistema de dos componentes. En respuesta al estímulo, los receptores producen la activación de proteínas G, como Ras o Rho1, estimulando el intercambio de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) en estas GTPasas. La proteína G activada puede interactuar con varios efectores como la proteína PI3-quinasa, la proteína quinasa C o una MAP3K como Raf (App *et al.*, 1991). Por ejemplo, se ha descrito que la afinidad de Ras por Raf-1 se incrementa 1000 veces cuando Ras se encuentra en su forma unida a GTP, si se compara con la forma unida a GDP. Una vez formado el

complejo Ras-Raf se inicia la activación de la cascada MAPK.

El sitio consenso de fosforilación de las MAP quininas es un residuo de serina o treonina seguido por una prolina en la posición P+1. A menudo una prolina aparece en la posición P-2 (PXS/TP, siendo X cualquier aminoácido). En animales se han descrito numerosos sustratos de MAPKs, y son tanto proteínas citosólicas como nucleares. Entre los sustratos citosólicos se encuentran la fosfolipasa A2 (Lin *et al.*, 1993) y proteínas del citoesqueleto (Shiina *et al.*, 1992), mientras que entre los sustratos nucleares se encuentran una gran variedad de factores de transcripción como Jun (Pulverer *et al.*, 1991) y Myc (Seth *et al.*, 1992). Hay MAP quininas fosfatasa que son sustratos de las MAP quininas que desactivan (Camps *et al.*, 1998). Las MAPKs que fosforilan sustratos nucleares pueden ser traslocadas al núcleo en su forma activa (Chang & Karin, 2001) o bien, como ocurre con ERK3, se encuentran de forma constitutiva en el núcleo (Cheng *et al.*, 1996) donde fosforilan factores de transcripción/componentes de la maquinaria de transcripción o participan en la regulación de la expresión de otras proteínas quininas (ver Sopory & Munshi, 1998).

La información acerca de los sustratos de las MAPKs de plantas es escasa. Recientemente, se han identificado posibles sustratos de AtMPK3 y AtMPK6 (las cuales son activadas por estrés de tipo ambiental) mediante micromatrices de proteínas (Feilner *et al.*, 2005). Con esta técnica se han identificado 48 posibles sustratos para AtMPK3 y 39 para AtMPK6. Entre los sustratos se encuentran factores de transcripción, reguladores de la transcripción, receptores, e histonas. Recientemente se ha identificado el enzima ACS6 (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa 6) como sustrato *in vivo* de AtMPK6 (Liu & Zhang, 2004), donde ACS6 forma parte de la ruta biosintética del etileno. La fosforilación de ACS6 por AtMPK6 estabiliza la proteína *in vivo*, lo cual permite incrementar la actividad celular de ACS6. Por otro lado, la proteína MKS1 (del inglés *MAP kinase substrate*

1), regulador de respuestas de defensa en plantas, es fosforilado y activado por AtMPK4 (Andreasson *et al.*, 2005).

1.2 Clasificación y funciones de las MAPKs de plantas

En plantas se han identificado una gran variedad de MAPKs. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 20 MAPKs, sugiriendo que las cascadas de MAPKs en plantas presentan una elevada complejidad. Comparando con las secuencias de aminoácidos de las MAPKs de animales, todas las secuencias de las MAPKs de plantas presentan una elevada homología con las de la subfamilia ERK (del inglés *extracellular signal-regulated kinase*) de mamíferos.

En base a la similitud de la secuencia de aminoácidos, las MAPKs de plantas pueden ser divididas en cuatro grupos (A-D)(Ichimura, 2002)(**Fig. 3**).

La comparación del motivo de activación conservado TXY de la secuencia de aminoácidos, responsable de la activación por MAP2Ks, claramente clasifica las MAPKs en dos subgrupos: los que contienen el motivo de aminoácidos TEY (subgrupo TEY) y los que tienen el motivo TDY (subgrupo TDY). Las MAPKs de los grupos A-C tienen el motivo TEY, mientras que sólo las del grupo D tienen el motivo TDY (Ichimura, 2002). Un hecho que distingue a las MAPKs del grupo TDY es que presentan en su extremo carboxi-terminal secuencias de aminoácidos adicionales.

Las cascadas de MAPKs intervienen en el desarrollo, la proliferación celular, la respuesta a estrés y la defensa frente a patógenos. Se activan por un amplio espectro de señales, entre las que se encuentran hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET) o el ácido salicílico (SA), así como especies reactivas de oxígeno (ROS) y diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (Nakagami *et al.*, 2005). Recientemente se han

aportado evidencias de que las cascadas de MAPKs regulan la biosíntesis de hormonas como el etileno (Kim *et al.*, 2003). En la **Tabla 1** se detallan los procesos en los que intervienen las MAPKs de los distintos grupos.

Dentro de cada grupo, el elevado grado de similitud entre las secuencias parece ser reflejo de la conservación funcional entre las distintas especies de plantas (Jonak *et al.*, 1999). Las MAPKs más estudiadas son las del grupo A, y su función se relaciona con la respuesta ambiental y hormonal. En este grupo se encuentran AtMPK3 y AtMPK6 de *Arabidopsis*, MsSIMK de alfalfa y NtWIPK de tabaco. El grupo B, en cuyo estudio se ha profundizado menos, se relaciona con la respuesta al estrés biótico y abiótico (Nakagami *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2000) y con la división celular (Bogre *et al.*, 1999; Calderini *et al.*, 1998). Se conoce muy poco sobre los miembros de los grupos C y D, aunque algún miembro de estas subfamilias ha sido caracterizado en arroz, pero hasta el momento no se conoce nada de sus ortólogos en *Arabidopsis* (Cvetkovska *et al.*, 2005).

Tabla 1. Funciones biológicas en las que están implicadas las MAP quinasas de plantas, indicando a qué subgrupo pertenecen (Nakagami *et al.*, 2005)

MAPK	Subgrupo	Función Biológica
AtMPK3	A1	estrés oxidativo, salinidad, señalización elicitor bacteriano, señalización ABA
MsSAMK	A1	tolerancia a metales pesados, bajas temperaturas, sequía, daño mecánico, señalización elicitor fúngico.
NtWIPK	A1	estrés hipoosmótico, resistencia a daño, señalización elicitor bacteriano, fúngica y viral, respuesta a hipersensibilidad, muerte celular.
NbWIPK	A1	detonante de la señalización a infección fúngica y bacteriana
LeMPK3	A1	señalización elicitor fúngico y bacteriano, estrés mecánico, resistencia a daño, UV-B
PcMPK3	A1	señalización elicitor fúngico y bacteriano
OsMAPK5/ OsMSRMK2/ OsMAP1/OsBIMK 1	A1	tolerancia a metales pesados, bajas temperaturas, calor, sequía, salinidad, UV-C, señalización de sacarosa, ácido jasmónico, ácido salicílico, etileno, ABA, resistencia a patógenos, tolerancia estrés abiótico
AtMPK6	A2	resistencia a daño mecánico, bajas temperaturas, sequía, salinidad, estrés oxidativo, señalización elicitor bacteriano y fúngico, resistencia a patógenos, señalización del etileno
MsSIMK	A2	resistencia a metales pesados, bajas temperaturas, sequía, estrés hiperosmótico, resistencia a daño, señalización elicitor fúngico, señalización del etileno, crecimiento radicular
NtSIPK	A2	estrés hiperosmótico e hipoosmótico, resistencia a daño mecánico, señalización elicitor bacteriano, fúngico y viral, resistencia a patógenos, señalización del ácido salicílico, etileno, muerte celular, respuesta hipersensible, germinación del polen
NbSIPK	A2	señalización elicitor bacteriano y fúngico
LeMPK1	A2	señalización elicitor, UV-B
LeMPK2	A2	señalización elicitor, UV-B
PcMPK6	A2	tolerancia a metales pesados, estrés oxidativo, señalización elicitor fúngico y bacteriano
AtMPK4	B1	resistencia a bajas temperaturas, sequía, daño, estrés hiperosmótico, resistencia a patógenos
MsMMK2	B1	tolerancia a metales pesados, señalización elicitor fúngico
MsMMK3	B2	tolerancia a metales pesados, señalización elicitor fúngico, estrés oxidativo, citocinesis, señalización del etileno, muerte celular
NtNTF6/NtNRK1	B2	respuesta a hipersensibilidad, señalización elicitor fúngico y bacteriano, citocinesis, muerte celular
OsMAPK4/ OsMSRMK3	C2	resistencia a metales pesados, bajas temperaturas, sequía, salinidad, resistencia a daño, estrés oxidativo, eliminación de azúcares, sacarosa, señalización del ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico, ABA, chitosan
OsBWMK1	D1	resistencia a patógenos, señalización elicitor fúngico, estrés oxidativo, muerte celular
OsWJUMK1	D1	tolerancia a metales pesados, bajas temperaturas, estrés oxidativo

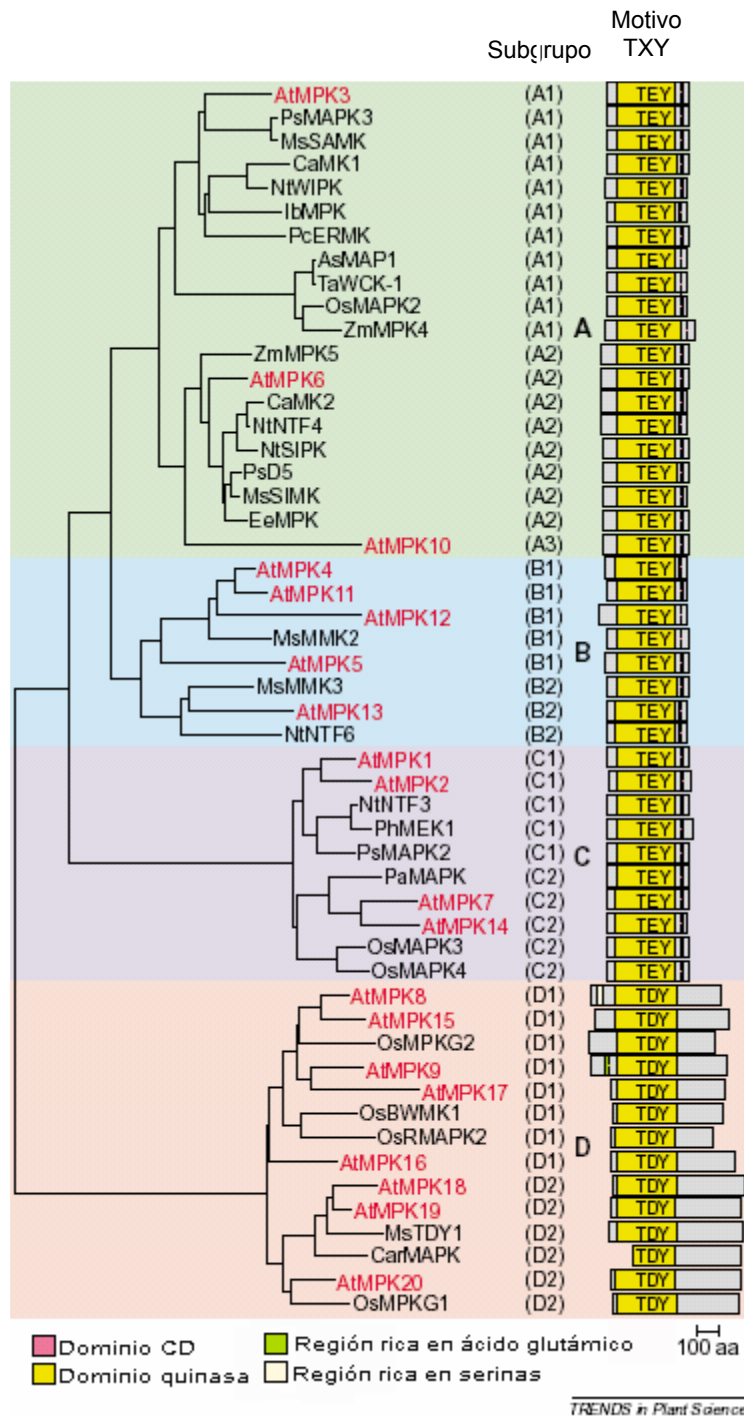


Figura 3. Árbol filogenético y estructura de los dominios de las MAPKs de plantas (adaptado de Ichimura, 2002). Las MAPKs de *Arabidopsis* se muestran en rojo. La organización de los motivos y dominios funcionales, incluido el motivo de fosforilación (TXY) de cada MAPK, se muestra en los dibujos de la derecha. Para identificar las especies de origen de cada MAPK, se ha antepuesto al nombre de la proteína un acrónimo: As, *Avena sativa*; At, *Arabidopsis thaliana*; Ca, *Capsicum annuum*; Car, *Cicer arietinum*; Ee, *Eurphorbia esula*; Ib, *Ipomoea batatas*; Ms, *Medicago sativa*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Pa, *Prunus armeniaca*; Pc, *Petroselinum crispum*; Ph, *Petunia hybrida*; Ps, *Pisum sativum*; Ta, *Triticum aestivum*; Zm, *Zea mays*.

La mayoría de las MAPKs de plantas aisladas, y la actividad MAPK detectada ante distintos estímulos, como distintos tipos de estrés y hormonas, pertenece a MAPKs de los grupos A y B (**Tabla 1**). Por el contrario, se sabe relativamente poco acerca de la función de los miembros del grupo C. Dentro del subgrupo C1 de MAPKs de plantas se encuentran AtMPK1 y AtMPK2 (*Arabidopsis*), Ntf3 (tabaco), PhMEK1 (petunia) y PsMAPK2 (guisante) (**Fig. 3**) (Ichimura, 2002). *PhMEK1*, se expresa en órganos vegetativos y se acumula preferentemente en los órganos reproductivos femeninos de *Petunia hybrida* antes de la fertilización (Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995). Por otro lado, en tabaco se ha descrito que *Ntf3* se expresa en todos los órganos ensayados, como corola, ovario, hoja, tallo así como en polen, en diferentes estadíos de desarrollo (Wilson *et al.*, 1993). En *Arabidopsis*, se ha descrito que los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* aumentan ligeramente tras un tratamiento de salinidad (Mizoguchi *et al.*, 1996) y que disminuyen a las 24 h tras un tratamiento a bajas temperaturas (Vogel *et al.*, 2005). Resultados obtenidos mediante análisis de micromatrices indican además que la expresión de *AtMPK1* es mayor en plántulas crecidas en oscuridad que en plántulas crecidas en presencia de luz (Ma *et al.*, 2005).

En la **Figura 4**, se muestra la secuencia de aminoácidos de las MAP quinasas del subgrupo C1 y en la **Tabla 2** el porcentaje de identidad entre estas

Secuencia A	MAPK	Secuencia B	MAPK	% Identidad
1	PsMAPK2	2	AtMPK1	84
1	PsMAPK2	3	AtMPK2	84
1	PsMAPK2	4	Ntf3	88
1	PsMAPK2	5	PhMEK1	87
2	AtMPK1	3	AtMPK2	87
2	AtMPK1	4	Ntf3	85
2	AtMPK1	5	PhMEK1	84
3	AtMPK2	4	Ntf3	85
3	AtMPK2	5	PhMEK1	83
4	Ntf3	5	PhMEK1	95

secuencias.

```

PsMAPK2  MATPVEPPNGIRADGKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGIVCSSVNRETNEKVAI 60
AtMPK1    MATLVDPPNGIRNEGKHYFSMWQTLFEIDTKYMPIKPIGRGAYGVVCSSVNSDTNEKVAI 60
AtMPK2    MATPVDPPNGIRNQGKHYFSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSSVNRESNERVAI 60
Ntf3      MATPVEPPNGIRTPGKHYYSMWQSLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGIVCSSVNRETNEKVAI 60
PhMEK1    MATPVEPPNGIRTPGKHYYSMWQSLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGIVCSSVNRETNEKVAI 60
          *** *:***** :*****:*****:*****:*****:*****:***** :*:***

PsMAPK2    KKIQNAFENRVDALRTLRELKLLRHLHENVIALKDIMMPVHRTSFKDVYLVVYELMDTD 120
AtMPK1     KKIHNVYENRIDALRTLRELKLLRHLRENVIALKDVMMPIHKMSFKDVYLVVYELMDTD 120
AtMPK2     KKIHNVFENRIDALRTLRELKLLRHLRENVVALKDVMMANHKRSFKDVYLVVYELMDTD 120
Ntf3       KKINNAFENRIDALRTLRELKLLRHLRENVIALKDVMMPIHRRSFKDVYLVVYELMDTD 120
PhMEK1     KKINNAFENRIDALRTLRELKLLRHLRENVIALKDVMMPIQRRSFKDVYLVVYELMDTD 120
          *** *:*****:*****:*****:*****:*****:*** :*:***:*** :*:*****:*****

PsMAPK2    HQIIKSSQTLSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLNANCDLKICDFGLA 180
AtMPK1     HQIIKSSQVLSNDHCQYFLFQLLRGLKYIHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLA 180
AtMPK2     HQIIKSSQVLSNDHCQYFLFQLLRGLKYIHSANILHRDLKPGNLLVNANCDLKICDFGLA 180
Ntf3       HQIIKSSQTLSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLNANCDLKICDFGLA 180
PhMEK1     HQIIKSSQTLSNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLNANCDLKICDFGLA 180
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
          • •

PsMAPK2    RTNCSKNQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYGTSIDVSVGCIFAELLRGKPIFPGSECL 240
AtMPK1     RASNTKGQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYGTSIDVSVGCIFAELLRGKPIFQGSECL 240
AtMPK2     RTSNTKGQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYGTSIDVSVGCIFAELLRGKPVPFGSECL 240
Ntf3       RTSSGKDQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYGTSIDVSVGCIFAELLRGKPVPFGSECL 240
PhMEK1     RTSSGKDQFMTEYVVTRWYRAPELLLCCDNYGTSIDVSVGCIFADVLRKPVPFGSECL 240
          *: : * :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PsMAPK2    NQLKLIINILGSQREEDIEFIDNPKAKRYIKSLPYSPGTPFSRLYPAHPLAIDLLKML 300
AtMPK1     NQLKLIVNILGSQREEDLEFIDNPKAKRYIRSLPYSPGMSLSRLYPAHVLAIDLLQKML 300
AtMPK2     NQIKLIINILGSQREEDLEFIDNPKAKRYIESLPYSPGISFSRLYPAHVLAIDLLQKML 300
Ntf3       NQLKLIINILGSQREEDIEFIDNPKAKRYIKSLPYSPGTPFSRLYPAHPLAIDLLQRML 300
PhMEK1     NQLKLIINILGSQREEDIEFIDNPKAKRYIKSLPYSPGTPFSRLYPAHPLAIDLLQRML 300
          ***:***:*****:*****:*****:***:*****:*****:*****:*****:***

PsMAPK2    VFDPTKRISVTEALQHPFMASLYDPNCDPPAIIPIDLDIDED--LGEEMIRELMWREMVH 358
AtMPK1     VFDPSKRISVSEALQHPYMAPLYDPNAPPAQVPIDLDVDED--LREEMIREMMWNEMLH 358
AtMPK2     VLDPSKRISVTEALQHPYMAPLYDPSANPPAQVPIDLDVDEDEDLGAEMIRELMWKEMIH 360
Ntf3       VFDPSKRISVIEALQHPYMSPLYDPNTDPPAQVPINLDIDED--LGEETIREMMWSEILE 358
PhMEK1     VFDPSKRISVMEALQHPYMSPLYDPNTDPPAQVPINLDIDED--LVEETIREMMWEILH 358
          *:***:***** :*****:*** :*** :***:***:*** * * ***:** *:..

PsMAPK2    YHPGSAMGNAELSS----- 372
AtMPK1     YHPQASTLN-----TEL----- 370
AtMPK2     YHPEAATINNNEVSEF----- 376
Ntf3       YHPEAATAAMEVVL----- 372
PhMEK1     YHPEAAVALLWKLFYELLLVPSRHRP 384

*** : :

```

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PsMAPK2 (guisante) (Marcote & Carbonell, 2000), AtMPK1 y AtMPK2 (*Arabidopsis*) (Mizoguchi *et al.*, 1994), Ntf3 (tabaco) (Wilson *et al.*, 1993) y PhMEK1 (petunia) (Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995). Los colores de los aminoácidos hacen referencia a la naturaleza de su cadena lateral. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos. Los círculos cerrados muestran los residuos de aminoácidos (Thr¹⁹¹-Glu-Tyr¹⁹³) correspondientes a los sitios de fosforilación que participan en la activación de las MAPKs (Gartner *et al.*, 1992). Los alineamientos se realizaron mediante el programa ClustalW disponible en la página web <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Apartado 2

Respuestas reguladas por MAP quinasas de plantas

2.1 MAP quinasas en ciclo celular y desarrollo

2.2 MAP quinasas y señalización hormonal

2.2.1 Auxinas

2.2.2 Ácido Abscísico

2.2.3 Giberelinas y citoquininas

2.2.4 Etileno

2.3 MAP quinasas y señalización de estrés

2.3.1 Estrés Abiótico

2.3.1.1 Ozono y estrés oxidativo

2.3.1.2 Salinidad y bajas temperaturas

2.3.2 Estrés Biótico

2.3.2.1 Elicitores

2.3.2.2 R-Avr

2.3.2.3 Daño

2.4 Interconexión entre rutas de MAP quinasas de planta

En las células vegetales, las cascadas de MAP quinasas transfieren información desde los sensores hasta donde tiene lugar la respuesta celular. El análisis del genoma de *Arabidopsis* muestra, sorprendentemente, un elevado número de genes que codifican algún componente de la ruta de MAPKs, sugiriendo que estas rutas son las principales vías de transducción de señales en plantas. Investigaciones recientes han confirmado que las MAPKs de plantas participan principalmente en el desarrollo, proliferación celular, fisiología hormonal y señalización de estrés biótico y abiótico.

Los primeros módulos completos de MAPKs identificados pertenecen a la señalización de estrés biótico y abiótico, así como a la citocinesis.

2.1 MAP quinasas en ciclo celular y desarrollo

Como en otros eucariotas, las MAPKs de plantas participan en la división celular y algunas MAPKs se inducen transitoriamente durante la mitosis (Bogre *et al.*, 1999; Calderini *et al.*, 1998).

La citocinesis es el último paso del ciclo celular, gracias a la cual las dos células hijas se convierten en dos entidades independientes. Estudios recientes han puesto en evidencia la implicación de las cascadas de MAPKs en la citocinesis. NPK1, una MAP3K, participa en la regulación de la citocinesis de tabaco. NPK1 se localiza en el fragmoplasto durante la citocinesis, y la expresión de la versión negativa de NPK1 produce defectos durante la división celular (Nishihama *et al.*, 2001). Recientemente, se han identificado en tabaco todos los componentes del módulo de MAP quinasas implicadas en citocinesis (**Fig. 5**) (Soyano & Machida, 2003). Este módulo también está implicado en la respuesta a patógenos (Jin *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004b). Los genes *ANP1*, *ANP2* y *ANP3* de *Arabidopsis* son ortólogos de NPK1 (Nishihama *et al.*, 1997). Estudios con mutantes de inserción de las tres MAP3Ks evidencian que la familia de MAP3Ks, ANP, regula positivamente la división celular y el crecimiento (Krysan *et al.*, 2002).

En relación con programas de desarrollo en plantas, se ha descrito que YDA (una MAP3K) posee un papel central en el desarrollo inicial de embriones en *Arabidopsis*. Mutantes que tienen disminuida la función de esta MAP3K, tienen suprimida la elongación del cigoto y las células de la línea basal son incorporadas eventualmente en el embrión, en lugar de diferenciar el suspensor extraembrionario. Por otro lado, alelos de ganancia de función de YDA producen un crecimiento exagerado del suspensor e inhiben el desarrollo embrionario. Estos resultados indican que YDA forma parte de una cascada de MAPKs y actúa como un conmutador molecular en la diferenciación extraembrionaria (Lukowitz *et al.*, 2004). Además, YDA

participa en el control de la identidad celular en la epidermis y tiene un papel central en la formación de los estomas (Bergmann *et al.*, 2004).

Se ha demostrado también la implicación de MAP quinasas en programas de desarrollo tales como la maduración y la embriogénesis del polen (Coronado *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2004; Seguí-Simarro *et al.*, 2005; Voronin *et al.*, 2004).

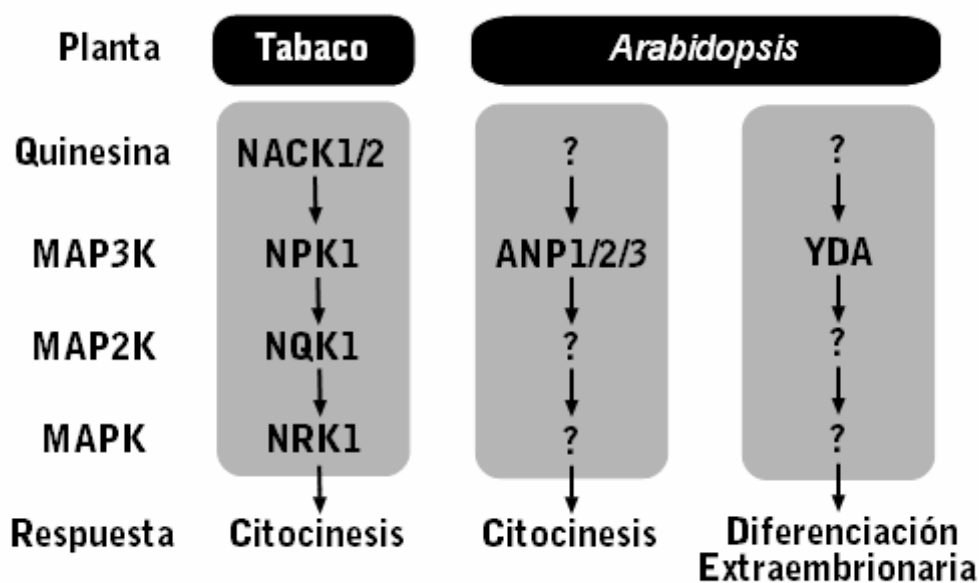


Figura 5. Ilustración esquemática de las rutas MAPKs de señalización en división celular y desarrollo (adaptado de Zhang *et al.*, 2006). Las flechas indican activación.

2.2 MAP quinasas y señalización hormonal

2.2.1 Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales esenciales, que regulan diversos procesos, como la división y expansión celular, embriogénesis, formación de meristemos, modelado de raíz y hojas, tropismos y reproducción.

La función de las MAPKs en la señalización de las auxinas no está clara y hay bastante controversia en la literatura. Mizoguchi y colaboradores, utilizando células de tabaco, sugirieron que las auxinas podían funcionar como activadores de MAPKs (Mizoguchi *et al.*, 1994). Por otro lado, Kovtun y colaboradores demostraron que NPK1 regulaba negativamente la transducción de señales de auxinas (Novikova *et al.*, 2000). La sobreexpresión de NPK1 y ANP1 en protoplastos de maíz y *Arabidopsis* bloquea de forma específica la expresión de genes inducidos por auxinas en la activación de la señalización de estrés oxidativo (Kovtun *et al.*, 1998; Kovtun *et al.*, 2000)(Fig. 6).

Tena y Renaudin demostraron que las auxinas, a bajas concentraciones, no activaban quinasas con actividad PBM en células de tabaco, pero sí a elevadas concentraciones, probablemente por acidificación del citosol (Tena & Renaudin, 1998). Sin embargo, Mockaitis y Howell demostraron que bajas concentraciones de auxinas (2 μ M) producían la activación rápida y transitoria de una MAP quinasa en la raíz de *Arabidopsis*, pero esta quinasa no mediaba la expresión de genes inducibles por auxinas (Mockaitis & Howell, 2000). Todo ello indica que las rutas de MAPKs participan tanto positiva como negativamente en la señalización de auxinas.

2.2.2 Ácido Abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) es un inhibidor del crecimiento que parece tener un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como la dormición de las semillas, abscisión de hojas y frutos y la tolerancia al estrés abiótico, en particular al estrés hídrico.

Una diana importante de la acción del ABA es la regulación de la apertura de los estomas. Relacionado con esto, se ha descrito que el ABA

induce una actividad MAP quinasa en protoplastos de células guarda de los estomas de *Vicia faba* (Mori & Muto, 1997).

Por otra parte, en arroz se ha demostrado que los niveles de ARNm, proteína y actividad de la MAP quinasa OsMAPK5 (subgrupo A1) aumentan en las hojas tras el tratamiento con el ABA. Estos resultados son de gran interés ya que esta MAP quinasa parece regular positivamente la tolerancia al estrés abiótico y negativamente la resistencia a enfermedad (Xiong & Yang, 2003).

Recientemente se ha demostrado que dos MAPKs de 42 y 46 kDa de *Arabidopsis* se activan por el ABA, tanto en plántulas silvestres como en el mutante hipersensible al ABA, *hly1*. En *hly1*, ambas MAPKs se activan a menores concentraciones del ABA que en la línea silvestre. Mediante un ensayo con anticuerpos específicos se identificó a la MAPK de 42 kDa como AtMPK3 (subgrupo A1). El factor de transcripción ABI5 (siglas correspondientes al término inglés *abscisic acid insensitive 5*), tiene un papel muy importante en la inhibición del crecimiento postgerminativo controlado por el ABA. Sorprendentemente, las MAPKs activadas por el ABA y la transcripción de *ABI5* poseen cinéticas de activación por el ABA muy similares, sugiriendo que ABI5 es un posible sustrato de las MAPKs de 42 y 46 kDa. Por otro lado, al utilizar un inhibidor de MAP2Ks, PD98059, se observó una disminución en la sensibilidad al ABA en las semillas de plantas silvestres. Además, el inhibidor era capaz de recuperar el fenotipo de hipersensibilidad al ABA que mostraba el mutante *hly1*. Estos resultados sugieren que las cascadas de MAPKs participan en la transducción de señales del ABA que inhiben el crecimiento postgerminativo. Sin embargo, falta por determinar si ABI5 es un sustrato directo de las MAPKs y si la señalización por MAPKs es suficiente para que ABI5 inhiba el crecimiento (Lu *et al.*, 2002).

Es interesante resaltar que uno de los principales componentes de la señalización del ABA es una proteína fosfatasa, ABI1. Se postula que ABI1

podría desfosforilar a una MAPK que estaría implicada en la ruta de señalización del ABA (Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994).

2.2.3 Giberelinas (GAs) y citoquininas

Las giberelinas (GAs) son reguladores endógenos del crecimiento en plantas, que están implicadas en la regulación de la tuberización, germinación de semillas y el crecimiento de las hojas por expansión y del tallo por elongación (Kende & Zeevaart, 1997; Thornton *et al.*, 1999; Vreugdenhil & Sergeeva L.L., 1999). En un gran número de especies, las GAs regulan también el tiempo de floración y son necesarias para el desarrollo de la flor y del fruto (Hooley, 1994; Blazquez *et al.*, 2002). En células de aleurona de *Avena sativa*, el ácido giberélico regula negativamente la transcripción de la MAP quinasa *AsMAP1* (Hill *et al.*, 1995; Huttly & Phillips, 1995). Marcote y colaboradores obtuvieron resultados que sugieren que las giberelinas y citoquininas (hormonas que también participan en el crecimiento) regulan los niveles de ARNm de *PsMAPK3* (subgrupo A1) en ovarios tras la inducción del desarrollo del fruto (Marcote & Carbonell, 2000). No se tienen más evidencias de la implicación de las MAP quinasas en la transducción de citoquininas. Sin embargo se ha sugerido la participación de una cascada de MAP quinasas en la señalización de estas hormonas, ya que receptores histidina quinasas están implicados en la percepción de citoquininas (D'Agostino & Kieber, 1999).

2.2.4 Etileno (ET)

A diferencia de otras hormonas vegetales, el ET es una hormona gaseosa. Participa en múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo: estimula la dominancia, el crecimiento de brotes y raíces y la diferenciación

(triple respuesta). Además, participa en la regulación de la respuesta a estrés de origen biótico y abiótico (Abeles *et al.*, 1992). La biosíntesis del ET en planta se incrementa por diversos tipos de estrés (Abeles *et al.*, 1992). El aislamiento de CTR1 (una MAP3Ks del tipo Raf) como regulador negativo de la señalización del ET sugirió la implicación de las cascadas de MAPKs en la ruta de señalización de esta hormona (Kieber *et al.*, 1993). El mutante *ctr1* aislado en *Arabidopsis* presenta de forma constitutiva la triple respuesta en ausencia del ET. Se ha postulado que en ausencia del ET, ETR1 y ETR2 (proteínas de membrana que poseen dominios similares al sistema de dos componentes de procariontes (Chen *et al.*, 2002)) se encuentran en su forma activa y de forma constitutiva activan a CTR1 (Kieber *et al.*, 1993). También se ha descrito que el ET activa una MAP quinasa de 47 kDa en *Arabidopsis* (Novikova *et al.*, 2000). Por otro lado, Ouaked y colaboradores encontraron que el precursor del ET, ACC, inducía la actividad quinasa de MsSIMK (subgrupo A2) y MsMMK3 (subgrupo B2) de *Medicago*, y de AtMPK6 de *Arabidopsis*, y que esta activación era mediada por MsSIMKK (Ouaked *et al.*, 2003). Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan MsSIMKK tienen activada de forma constitutiva AtMPK6 (subgrupo A2) e inducidos los genes de respuesta a ET. Estos resultados sugerían que la ruta SIMKK-MPK6 participa de forma positiva en la señalización del ET y que, por tanto, CTR1 es un regulador negativo de la ruta de AtMPK6.

Sin embargo, hay reservas acerca de este estudio. En primer lugar, la regulación negativa no es usual: normalmente las MAP3Ks son reguladores positivos de los módulos de MAPKs. CTR1 es un regulador negativo de la señal de transducción del ET, y es inactivado por ET (Huang *et al.*, 2003; Kieber *et al.*, 1993). Por el contrario, MsSIMKK y AtMPK6 son activadas por ET (Ouaked *et al.*, 2003). Todo ello sugiere una cascada del tipo MAP3K → MAP2K → MAPK. En segundo lugar, Liu y Zhang, presentaron evidencias de que AtMPK6 no participa en la transducción de señales de ET (Liu &

Zhang, 2004). Ensayos bioquímicos demostraron que el tratamiento con ACC no activaba a AtMPK6 en plantas silvestres, ni en mutantes de *Arabidopsis* que tenían alterada la señalización del ET. No se detectaron tampoco incrementos en la actividad de AtMPK6 en el mutante *ctr1*, sugiriendo que AtMPK6 no funcionaba por debajo de CTR1 en la ruta de señalización del etileno. Además, Liu y Zhang demostraron que la activación de AtMPK6 induce la biosíntesis del ET y que la cascada AtMKK4/5 y AtMPK6 participa en la producción del ET por estrés (Fig. 6). Estos autores además demostraron que ACS2/6, enzimas de la ruta de biosíntesis del ET, son sustratos de AtMPK6 (Fig. 6) (Liu & Zhang, 2004). La fosforilación de ACS2 y ACS6 da lugar a la estabilización y activación del enzima ACS, lo que produce un aumento de la síntesis del ET. En este trabajo se identifica el primer sustrato de una MAP quinasa de plantas (*in vivo*). En tabaco, también se ha demostrado la implicación de la ruta de NtMEK2-NtSIPK en la inducción de la biosíntesis del ET en respuesta al daño e infección vírica. NtSIPK es la MAP quinasa ortóloga de AtMPK6 de *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2003).

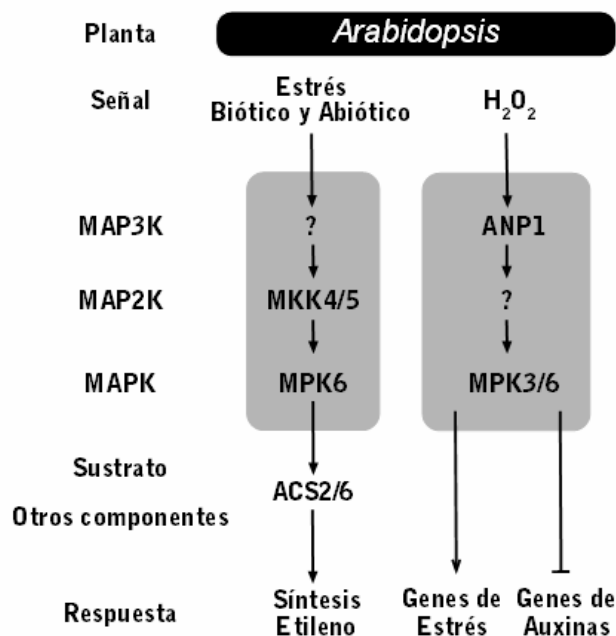


Figura 6. Ilustración esquemática de la posible función de las cascadas MAPKs en la señalización del etileno y las auxinas (adaptado de Zhang *et al.*, 2006). Las flechas indican activación. La línea indica dirección y la barra denota inhibición.

2.3 MAP quininas y señalización de estrés

Las plantas se encuentran ancladas al suelo a través de la raíz y, debido a la falta de movilidad, se tienen que enfrentar a numerosos tipos de estrés biótico y abiótico. Para sobrevivir bajo estas condiciones, las plantas han desarrollado mecanismos para percibir señales externas y generar respuestas óptimas a las condiciones ambientales. Fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el ET y el ABA son moléculas endógenas de bajo peso molecular que regulan en las plantas respuestas de protección frente a estrés biótico y abiótico, mediante interacciones sinérgicas y antagónicas (Bostock, 2005; Lorenzo & Solano, 2005; Mauch-Mani & Mauch, 2005). Además, se ha propuesto que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es uno de los procesos clave en la distribución de las respuestas a estrés biótico y abiótico (Mandaokar *et al.*, 2006; Torres & Dangl, 2005).

Como se ha mencionado, la señalización hormonal gobierna las respuestas bióticas y abióticas. El ABA es una fitohormona que se ha relacionado con las respuestas a estrés abiótico como sequía, bajas temperaturas y estrés osmótico. Por el contrario, las fitohormonas SA, JA y ET poseen un papel central en la señalización del estrés biótico, como por ejemplo la infección por patógenos.

En los últimos años, y tal y como se deduce de la **Tabla 1**, se ha establecido firmemente el papel central que juegan las MAPKs de plantas en la regulación de mecanismos de defensa. Varias rutas de MAPKs son activadas por más de un tipo de estrés biótico y abiótico, sugiriendo que las cascadas de MAPKs actúan como puntos de convergencia en la señalización del estrés (**Fig. 7**).

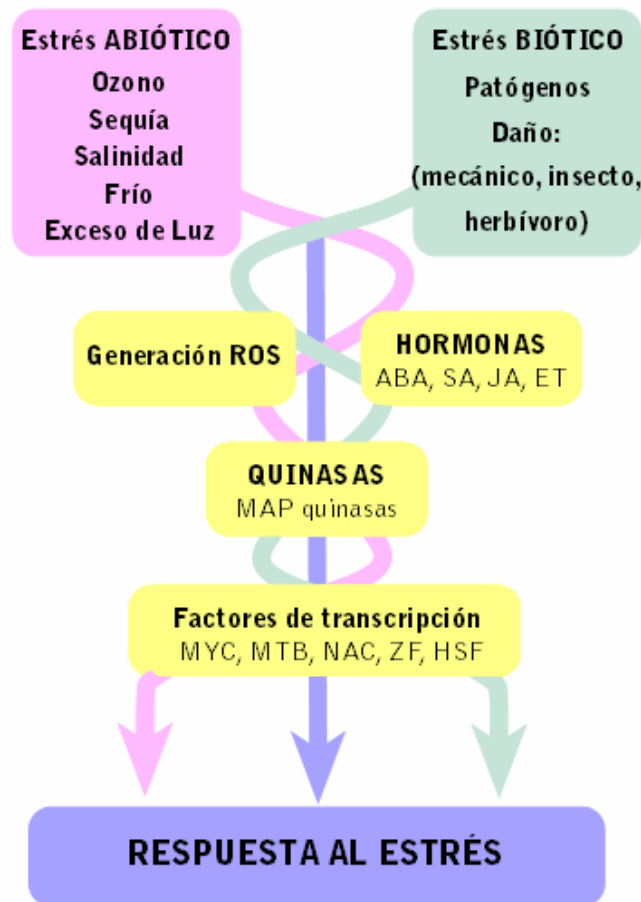


Figura 7. Puntos de convergencia de rutas de señalización de estrés abiótico y biótico. Figura modificada de Fujita *et al.*, 2006.

2.3.1 Estrés Abiótico

La capacidad de percibir cambios en las condiciones ambientales es esencial para que las plantas se aclimaten a dichos cambios. Las plantas son capaces de percibir el estrés ambiental como la salinidad, las bajas temperaturas, el calor, la luz UV o el ozono y producen respuestas de aclimatación frente a dicho estrés. La adaptación de las plantas al estrés del tipo abiótico puede ser dependiente o independiente del ABA. Por otro lado, la producción de ROS es una respuesta común a todos estos tipos de estrés ya que alteran el equilibrio redox de la planta (Pitzschke & Hirt,

2006). Como consecuencia, se producen cambios en la expresión génica en las plantas.

2.3.1.1 Ozono y estrés oxidativo

La aplicación de ozono dispara el programa de muerte celular, que es análogo al programa de defensa biótico. Este programa incluye la respuesta de hipersensibilidad (HR, del inglés *hypersensitive response*) y la síntesis de proteínas de respuesta (PR, del inglés *protein response*)(Overmyer *et al.*, 2000). El tratamiento de *Arabidopsis* con ozono produce la activación y translocación nuclear de AtMPK3 y AtMPK6 (Ahlfors *et al.*, 2004). Además, las líneas ARN interferentes (ARNi) de ambas MAPKs son hipersensibles al ozono (Miles *et al.*, 2005). Por otro lado, las líneas *AtMPK6*-ARNi presentan una fuerte y prolongada activación de AtMPK3 y, recíprocamente, AtMPK6 se encuentra activada en las líneas *AtMPK3*-ARNi (Miles *et al.*, 2005). Sin embargo, AtMPK3 y AtMPK6 no parecen tener funciones redundantes ya que AtMPK3, y no AtMPK6, es regulada a nivel de la transcripción y de la traducción (Ahlfors *et al.*, 2004).

Los ortólogos de AtMPK3 y AtMPK6 en tabaco, NtWIPK (subgrupo A1) y NtSIPK (subgrupo A2), son también activadas por ozono y óxido nítrico (Kumar & Klessig, 2000; Samuel *et al.*, 2000). Sin embargo, paradójicamente, tanto la sobreexpresión como la supresión de NtSIPK dan lugar a plantas hipersensibles al tratamiento con ozono (Samuel & Ellis, 2002). La actividad de NtSIPK y NtWIPK se superponen pero no son completamente intercambiables; la actividad de NtWIPK normalmente es acompañada de la activación de NtSIPK, pero en algunos tipos de estrés oxidativo, se activa NtSIPK preferentemente, sin afectar a la actividad de NtWIPK (Kumar & Klessig, 2000).

Aunque las ROS pueden formarse como productos metabólicos bajo distintas condiciones de estrés abiótico, las células de plantas también

pueden generar ROS tras el ataque de patógenos (Apel & Hirt, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, el H₂O₂ es un activador de las MAP quinasas de *Arabidopsis* AtMPK3 y AtMPK6 (**Fig. 6**) (Kovtun *et al.*, 2000; Yuasa *et al.*, 2001). Se ha descrito que la proteína quinasa OXI1 regula la ruta de AtMPK3/AtMPK6 que se activa por ROS y patógenos (Rentel *et al.*, 2004). En el mutante nulo *oxi1* está comprometida la activación de esta ruta y, además, estas plantas son hipersensibles a la infección por cepas virulentas, aunque no por avirulentas, del hongo *Peronospora parasitica*. Por otra parte, un estudio en el cual *N. benthamiana* era infectada con *Phytophthora infestans* mostró que la ruta de NtMEK2 (MAP2K) puede formar parte de una cascada de amplificación por encima de los genes *rboh* (del inglés *respiratory bursa oxidase orthologue*), los cuales son necesarios para la producción de ROS en respuesta a la infección por hongos (Yoshioka *et al.*, 2003). En correlación con estos estudios, la expresión constitutiva de la forma activa de las MAP2Ks de *Arabidopsis*, AtMKK4 y AtMKK5 (ortólogos de NtMEK2 de tabaco), da lugar a la generación de H₂O₂ y muerte celular (Ren *et al.*, 2002).

2.3.1.2 Salinidad y bajas temperaturas

Se ha descrito que algunas MAPKs son activadas por estrés osmótico, bajas temperaturas, salinidad y sequía (ver revisión Nakagami *et al.*, 2005). El módulo de MAPKs de *Arabidopsis* AtMEKK1-AtMKK2-AtMPK4/AtMPK6 participa en la señalización de bajas temperaturas y salinidad. AtMKK2 es activada por bajas temperaturas y por salinidad, y el mutante nulo *mkk2* es hipersensible a estos tipos de estrés (Teige *et al.*, 2004). AtMEKK1 es inducido transcripcionalmente por salinidad, sequía, bajas temperaturas y daño (Mizoguchi *et al.*, 1996) y puede interactuar con AtMKK1, AtMKK2 y AtMPK4 (Ichimura *et al.*, 1998). AtMEKK1 media la

activación de AtMPK3 y AtMPK6 en respuesta a patógenos a través de AtMKK4 y AtMKK5 (Asai *et al.*, 2002) pero activa a AtMPK4 y AtMPK6 a través de AtMKK2 en respuesta al estrés abiótico (Teige *et al.*, 2004). AtMKK1 se activa por herida, bajas temperaturas y elevada salinidad, y puede fosforilar a AtMPK4, sugiriendo que también participa en estrés abiótico (Matsuoka *et al.*, 2002).

2.3.2 Estrés Biótico

La comunicación a nivel molecular entre plantas y patógenos determina la respuesta de defensa frente a patógenos. El estrés biótico es percibido por las plantas a través del reconocimiento de elicitores derivados del patógeno o a través del daño producido en la pared celular (daño). Las plantas, de forma similar a los animales y a los insectos, tienen mecanismos de inmunidad innata frente a patógenos potenciales. Para prevenir la infección, las plantas, además de poseer mecanismos pasivos (como espinas y cubiertas protectoras), disponen de mecanismos activos. Los mecanismos activos de defensa en plantas están basados en la detección temprana de los organismos invasores y la generación de respuestas rápidas. Las plantas utilizan proteínas de resistencia (R) junto con otros receptores para detectar la presencia o actividad de los patógenos. Las proteínas R reconocen proteínas virulentas que son segregadas por los patógenos, encargadas de la infección de los tejidos (Martin *et al.*, 2003). La detección de estas proteínas u otros elicitores dispara la señalización, dando lugar a las diversas respuestas celulares, que incluyen cambios en el flujo iónico, activación de cascadas que permiten la acumulación de hormonas endógenas, como el SA, el JA y el ET, reprogramación transcripcional, producción de ROS y, a menudo,

muerte celular programada de la zona infectada, conocida como HR (Pedley & Martin, 2005).

El JA, junto con el ET y el SA, son hormonas implicadas en la respuesta a la infección por patógenos que dan lugar a la activación de rutas diferentes o que se entrecruzan parcialmente. Hay genes cuya expresión está regulada por las tres hormonas de la misma forma (Fujita *et al.*, 2006), pero en muchas ocasiones existe una interacción negativa entre las rutas de señalización del JA/ET y el SA, que da lugar a un patrón de expresión de genes antagónico (Glazebrook *et al.*, 2003; Norman-Setterblad *et al.*, 2000).

En los últimos años se ha establecido que las MAPKs poseen un papel central en la defensa frente a patógenos en diversos tipos de plantas. Los primeros trabajos que relacionan las MAP quinzasas con señalización de la defensa se realizaron con las MAP quinzasas de tabaco NtSIPK y NtWIPK. Recientemente, se han identificado en *Arabidopsis* todos los componentes de un módulo de MAP quinzasas implicadas en la señalización por patógenos (**Fig. 8**) (Asai *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005).

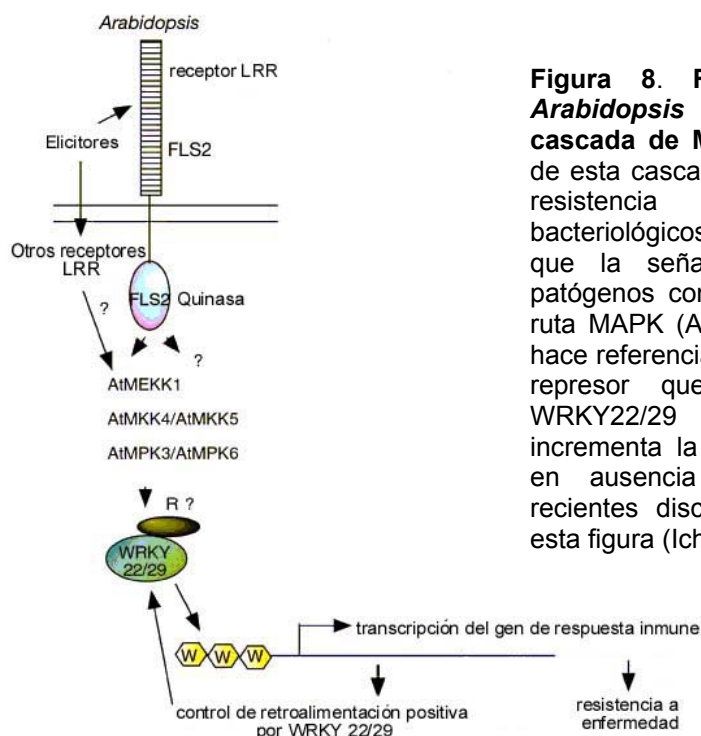


Figura 8. Ruta de señalización de *Arabidopsis* en la que interviene una cascada de MAP quinzasas. La activación de esta cascada de MAP quinzasas confiere resistencia tanto a patógenos bacteriológicos como fúngicos, sugiriendo que la señal producida por diferentes patógenos converge dentro de una misma ruta MAPK (Asai *et al.*, 2002). El factor R, hace referencia a la existencia de un posible represor que regule la actividad de WRKY22/29 ya que su sobreexpresión incrementa la resistencia a la enfermedad en ausencia de elicitores. Resultados recientes discrepan de los mostrados en esta figura (Ichimura *et al.*, 2006).

2.3.2.1 Elicitores

Los elicitores son compuestos muy activos y únicos, producidos por un patógeno invasor que es reconocido por la planta. Existen varios tipos de elicitores que disparan las defensas en las plantas.

En general, MAPKs del grupo A de distintas especies de plantas, han sido implicadas en la respuesta de la planta a distintos elicitores. En *Arabidopsis* se han identificado todos los miembros de la ruta MAP quinasa que se activa tras el receptor FLS2 (receptor del tipo LRR, del inglés *leucine-rich-repeat*), que reconoce al elicitor flagelina22 (flg22) de la bacteria *flagella* (Asai *et al.*, 2002). El tratamiento de protoplastos de *Arabidopsis* con flg22 da lugar a la activación de una cascada de MAP quininas formada por AtMEKK1, AtMKK4/5 y AtMPK3/6 (Asai *et al.*, 2002). Finalmente, tiene lugar la activación de factores de transcripción de la familia WRKY. La activación de esta cascada confiere resistencia frente a bacterias y hongos, sugiriendo que la señalización iniciada por distintos patógenos converge dentro de una misma cascada de MAPKs (**Fig. 8**). Sin embargo, resultados recientes discrepan con estos resultados. Ichimura y colaboradores (Ichimura *et al.*, 2006) han demostrado que no se requiere AtMEKK1 para la activación por flg22 de AtMPK3/6. En cambio, AtMEKK1 es esencial para la activación de AtMPK4.

AtMPK4 (subgrupo B1), que funciona como un regulador negativo de las respuestas de defensa frente a patógenos, ha sido identificado como un regulador negativo de la resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés *systemic acquired resistance*) (Petersen *et al.*, 2000). AtMPK4 es un regulador negativo de la acumulación de SA, pero un regulador positivo del JA. Se ha descrito un mutante de inserción de T-DNA de AtMPK4 que presenta de forma constitutiva un fenotipo de SAR que incluye elevados niveles de SA, tiene incrementada la resistencia a patógenos, la expresión constitutiva de genes *R* y reducción en la expresión de genes inducidos por JA. El activador de esta vía es EDR1 (del inglés *enhanced disease*

resistance), una MAP3K del tipo CTR1, que también actúa como regulador negativo de SAR (Frye *et al.*, 2001). Recientemente se ha identificado MKS1 (del inglés *MAP kinase substrate 1*) como sustrato de AtMPK4. MKS1 actúa de nexo entre esta MAP quinasa y factores de transcripción WRKY, como WRKY25 y WRKY23. La sobreexpresión de MKS1 es suficiente para activar la resistencia dependiente del SA, pero no interfiere con la inducción de los genes de defensa por el JA (Andreasson *et al.*, 2005). Recientemente se ha descrito que *AtMPK4* tiene una función esencial en la represión de SAR y en la inducción de genes de defensa del ET/JA a través de EDS1 y PAD4 (Brodersen *et al.*, 2006).

Es interesante señalar que la MAP quinasa de arroz OsMAPK5 (subgrupo A1) parece regular de forma inversa la resistencia a patógenos y la tolerancia al estrés abiótico (Xiong & Yang, 2003).

2.3.2.2 R-Avr

En plantas existe un tipo de resistencia resultante de la interacción entre el producto de los genes de patógenos avirulentos (*Avr*) y el gen complementario que codifica una proteína del tipo *R*. Los genes *Avr* son responsables de la patogénesis. Los patógenos que poseen genes *Avr* son avirulentos en plantas que poseen su correspondiente gen *R*, mientras que son virulentos en una raza, cepa o determinadas especies de plantas, que no poseen el gen *R* complementario.

En plantas, los productos de los genes *R* actúan como receptores de los productos de los genes *Avr* (Parker & Coleman, 1997), y esta interacción produce una explosión oxidativa, que da lugar a la formación de ROS y a la activación de las rutas de MAPKs.

Las MAPKs de tabaco, NtSIPK (subgrupo A2) y NtWIPK (subgrupo A1) (ortólogos de AtMPK6 y AtMPK3 respectivamente, en *Arabidopsis*), son las únicas MAPKs hasta la fecha, que son activadas por elicitores y por la

interacción *R-Avr* (Romeis *et al.*, 1999; Zhang & Klessig, 1998). Las plantas de tabaco que expresan *Cf-9*, un gen del tipo *R*, presentan incrementos de la actividad de NtSIPK y NtWIPK, cuando son tratadas con *Avr9*, proteína de hongo avirulenta (Romeis *et al.*, 1999).

2.3.2.3 Daño

En las plantas, una vez que la herida o daño ocurre, no existe posibilidad de movilizar células especializadas para cicatrizar la herida como sucede en mamíferos, ya que las células de plantas están encapsuladas dentro de rígidas paredes celulares. Así las plantas han evolucionado hacia la capacidad de hacer que sus células sean competentes para la activación de respuestas de defensa que incluyen, en gran medida, la activación transcripcional de genes específicos. Estas respuestas activadas por el daño están dirigidas a cicatrizar el tejido dañado y a activar los mecanismos de defensa que prevengan de un daño mayor.

En *Arabidopsis thaliana*, se ha sugerido que el daño mecánico activa al menos dos rutas de señalización dependientes de JA y una dependiente de oligosacáridos (OGAs) (**Fig. 9**) (Devoto *et al.*, 2005; Ellis & Turner, 2002; León *et al.*, 2001; McConn *et al.*, 1997; Reymond *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 1999).

Cuando se produce una herida en una hoja se liberan oligosacáridos y los niveles de el JA aumentan. Estas son las señales primarias que van a activar una serie de genes de respuesta al daño. Algunas de las respuestas JA-dependientes requieren del gen *COI1* (Benedetti *et al.*, 1995; Feys *et al.*, 1994). *COI1* codifica una proteína F-Box (Xie *et al.*, 1998) que forma parte integral de un complejo SCF tipo E3 ubiquitin ligasa que etiqueta represores de la señalización de JA para que sean degradados en el proteosoma (Devoto *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2002). La ruta del JA dependiente de *COI1*

induce la expresión de genes tales como *VSP*, *JR1* y *JR2* (**Fig. 9**). Aunque el aumento de los niveles del JA es mayor en el tejido dañado que en el sistémico, la inducción de la expresión de los genes dependientes del JA es mayor en el tejido sistémico. Hay evidencias que indican que esto es debido a la síntesis de etileno que se produce tras el daño (probablemente inducida por OGAs) que inhibe la señalización del JA en los tejidos dañados (Rojo *et al.*, 1999). La ruta de JA independiente de COI1 no ha sido caracterizada. Sin embargo, resultados obtenidos en análisis de micromatrices han revelado que numerosos genes son regulados por el JA independientemente de COI1 en la respuesta al daño (Devoto *et al.*, 2005). La ruta OGA-dependiente da lugar a la inducción de genes tales como *WR* y *CK* y se activa de forma independiente de JA y ET (**Fig. 9**).

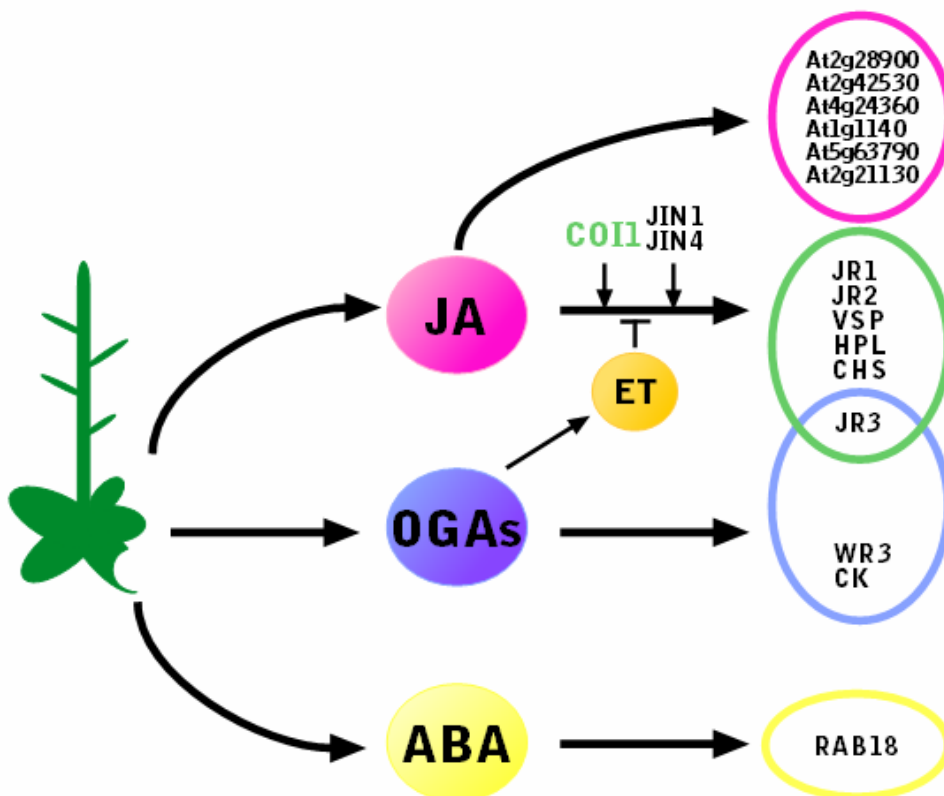


Figura 9. Modelo de señalización del daño en *A. thaliana*. Figura modificada de Rojo *et al.*, 1999.

Además del JA, su precursor OPDA (Stintzi *et al.*, 2001) y el ET, el ácido abscísico (ABA) interviene en la respuesta a herida. Se ha propuesto que el ABA está implicado en la respuesta a la deshidratación que ocurre en el lugar de la herida (León *et al.*, 2001). En la respuesta al daño también están implicadas especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chang *et al.*, 2004), segundos mensajeros (como el calcio/calmodulina) y la fosforilación de proteínas (León *et al.*, 1998).

Las MAPKs también transducen señales en respuesta al daño mecánico o herida producida por patógenos. Shibata y colaboradores describieron que el corte de las hojas, en varias especies de plantas, produce la activación transitoria de una MAPK de 46 kDa. Vieron además que la actividad quinasa era independiente de la síntesis de proteínas (Shibata *et al.*, 1995).

En tabaco, Seo y colaboradores comprobaron que las plantas de tabaco que sobreexpresaban la forma activa de NtWIPK (subgrupo A1) tenían inducidos genes de respuesta a patógenos como *PR-1* y *PR-2*, presentaban elevados niveles de JA, y tenían aumentada las respuestas inducidas por daño (Seo *et al.*, 1999). Se especuló que NtWIPK activaba a los genes del tipo *PR* mediante la regulación de la síntesis del JA (Bergmann *et al.*, 2004) y que el JA suprimía la síntesis del SA dando lugar al aumento de las respuestas inducidas por daño.

Hay dos MAP quinasas de *Arabidopsis* que han sido relacionadas con la respuesta al daño mecánico: AtMPK4 (subgrupo B1) y AtMPK6 (subgrupo A2). La actividad de ambas MAP quinasas aumenta rápidamente y de forma transitoria a los pocos minutos del daño mecánico (Ichimura *et al.*, 2000). En relación con otros componentes del módulo de MAP quinasas, se ha descrito que los niveles del ARNm de AtMEKK1 (MAP3K) se inducen por daño (Mizoguchi *et al.*, 1997) y que AtMKK1 (MAP2K) se activa por daño (Matsuoka *et al.*, 2002).

2.4 Interconexión entre rutas de MAP quinasas de plantas

Como se ha detallado en anteriores apartados, las MAP quinasas juegan un papel central en la transducción de diferentes tipos de señales. La complejidad de la transducción aumenta cuando el activador de la ruta de MAPKs es a su vez regulado por diversas respuestas. Uno de los mejores ejemplos lo aportan las fitohormonas, las cuales participan en los programas de desarrollo de la planta, así como en las respuestas de la planta a una gran variedad de señales extracelulares. Generalmente, en la regulación de un determinado evento fisiológico participa más de una hormona. Por ello, es evidente que las rutas de MAPKs de plantas participan a distintos niveles en la respuesta de la planta a estímulos hormonales y ambientales. Así pues, las distintas rutas de MAP quinasas no se pueden representar como rutas paralelas e independientes, sino que son rutas que se solapan y entrecruzan. La **Figura 10** muestra una representación esquemática de la probable interconexión entre las distintas rutas de señalización en las que participan MAP quinasas.

Diferentes estímulos pueden activar una misma MAP quinasa y además varias MAPKs pueden ser activadas por el mismo estímulo. La complejidad aumenta por el hecho de que cada componente del módulo de MAP quinasas (MAPK-MAP2K-MAP3K) es un miembro multigénico, permitiendo la redundancia de función entre miembros de una misma familia (**Fig. 10**).

En conclusión, se puede decir que las cascadas de MAP quinasas de plantas no son rutas lineales, sino complejas redes que son necesarias en algunas funciones fisiológicas fundamentales, como señalización de estrés, respuesta hormonal, regulación del ciclo celular y mecanismos de defensa.

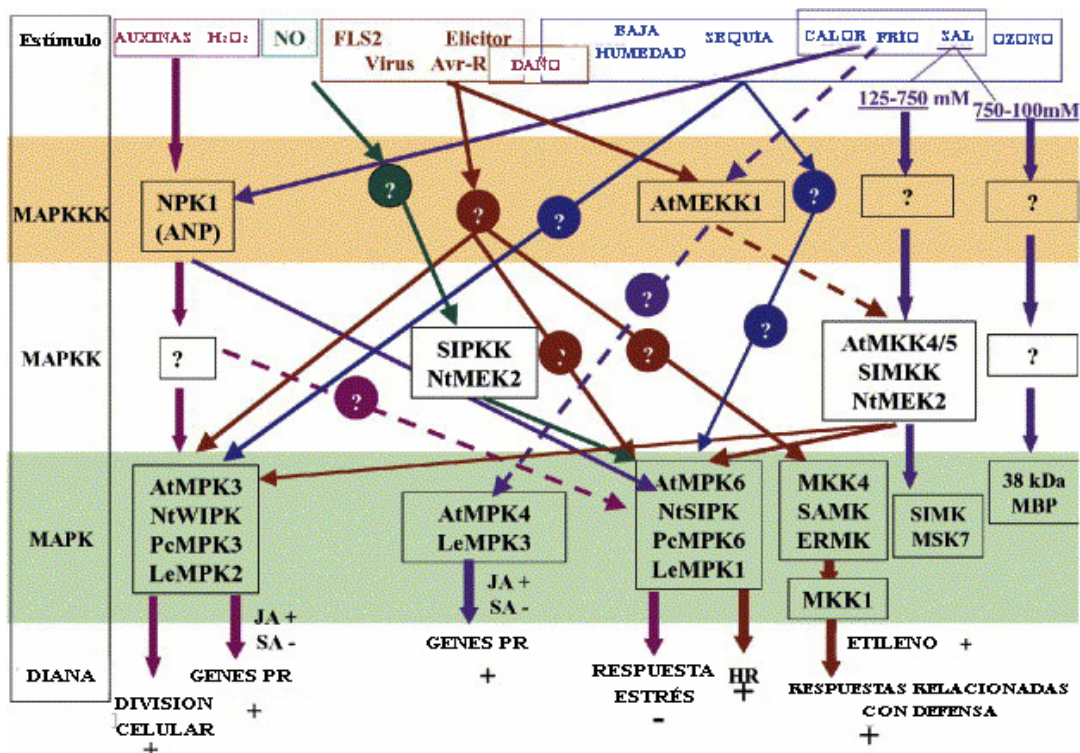


Figura 10. Representación esquemática de la interconexión entre diferentes rutas de MAP quinasas. El esquema general de la ruta de transducción se muestra a la izquierda. Se muestran los homólogos de *Arabidopsis* (*At*), tabaco (*Nt*), perejil (*Pc*), y tomate (*Le*). El signo de interrogación '?' indica no identificado. FLS2 es el receptor del péptido de la flagelina, flg22. JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; PR, respuesta a patógenos; HR, respuesta de hipersensibilidad; +, inducción; -, represión. Figura adaptada de Mishra *et al.*, 2006.

Objetivos

A pesar del gran número de genes de MAP quinasas de plantas identificados, la mayoría de las MAPKs caracterizadas hasta el momento pertenecen a los grupos A y B. Entre las MAPKs menos caracterizadas se encuentran las MAPKs del subgrupo C1. Dentro de este subgrupo se encuentran *Ntf3* de tabaco, *PhMEK1* de petunia y *AtMPK1* y *AtMPK2* de *Arabidopsis*.

En nuestro laboratorio se ha aislado un ADNc que codifica una MAPK de guisante perteneciente al subgrupo C1 (*PsMAPK2*). Además, se han identificado mutantes de inserción de T-DNA de *AtMPK1* y *AtMPK2* y se ha obtenido el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*.

El objetivo general de la presente Tesis fue el estudio de la función de las MAP quinasas del subgrupo C1 *PsMAPK2* (guisante), *AtMPK1* y *AtMPK2* (*Arabidopsis*).

En particular se abordaron los siguientes objetivos:

1. Analizar la expresión de *PsMAPK2* y de *AtMPK1* y *AtMPK2* en distintos órganos de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.
2. Realizar una aproximación genética molecular dirigida a la obtención de plantas transgénicas que expresen *PsMAPK2*. Ante la imposibilidad de transformar plantas de guisante, en este proyecto se ha utilizado como sistema experimental *Arabidopsis*. Además, se planteó manipular las rutas de señalización de las MAPKs del subgrupo C1 expresando versiones mutantes de *PsMAPK2* de ganancia y pérdida de función.

3. Evaluar el efecto de la herida y de distintas moléculas señalizadoras de estrés sobre la actividad quinasa de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2.

Material y Métodos

1. Material Biológico

1.1 Material Vegetal

1.1.1 Condiciones de cultivo de las plantas

1.1.1.1 Cultivo de *A. thaliana* en macetas

1.1.1.2 Cultivo de *A. thaliana* en cajas Petri

1.1.1.3 Cultivo de *P. sativum* en macetas

1.1.2 Tratamientos

1.1.2.1 Tratamiento de Daño mecánico o herida

1.1.2.2 Tratamiento con Ácido Jasmónico

1.1.2.3 Tratamiento con Ácido Abscísico

1.1.2.4 Tratamiento con Peróxido de Hidrógeno

1.2 Microorganismos

1.2.1 Cepas bacterianas

1.2.2 Condiciones de cultivo de microorganismos

1.2.3 Medio de cultivo

2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

2.1 Aislamiento de ADN plasmídico

2.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico de *E.coli*

2.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*

2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

2.3 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

2.4 Extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol

2.5 Secuenciación

2.6 Extracción y Purificación de ARN total de *A. thaliana*

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1 Reacciones enzimáticas

3.1.1 Digestiones con enzimas de restricción

3.1.2 Tratamiento con enzimas modificadores

3.1.2.1 Reacciones de ligación

3.2 Vectores plasmídicos

3.3 Diseño de las construcciones de las diferentes versiones de PsMAPK2

3.4 Construcción de las diferentes versiones de PsMAPK2

3.5 Síntesis de ADNc por retrotranscripción (RT)

3.6 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4. Transformación de bacterias

4.1 Preparación de células competentes y métodos de transformación

4.1.1 Transformación mediante choque térmico

4.1.2 Transformación mediante electroporación

4.1.3 Selección de recombinantes

5. Transformación de plantas

5.1 Transformación de *A. thaliana*

5.2 Análisis fenotípico y genotípico de las líneas transgénicas

6. Extracción e inmunoprecipitación de proteínas

6.1 Extracción de proteínas

6.2 Determinación de la concentración de proteínas

6.3 Anticuerpos específicos de MAP quinasas del subgrupo C1 de plantas

6.4 Inmunoprecipitación de proteínas

7. Ensayo de actividad MAP quinasa

7.1 Sistema no radioactivo MAP Kinase Assay Kit

7.1.1 Titulación Erk1

7.2 Sistema radioactivo ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$)

7.2.1 Cálculo actividad específica

8. Electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE

8.1 Soluciones, tampones utilizados y procedimiento

9. Detección de proteínas: análisis WESTERN

9.1 Soluciones, tampones empleados y procedimiento

9.2 Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa

9.3 Detección por quimioluminiscencia

Apartado 1

Material Biológico

1.1 Material Vegetal

1.1.1 Condiciones de cultivo de las plantas

1.1.1.1 Cultivo de *A. thaliana* en macetas

1.1.1.2 Cultivo de *A. thaliana* en cajas Petri

1.1.1.3 Cultivo de *P. sativum* en macetas

1.1.2 Tratamientos

1.1.2.1 Tratamiento de Daño mecánico o herida

1.1.2.2 Tratamiento con Ácido Jasmónico

1.1.2.3 Tratamiento con Ácido Abscísico

1.1.2.4 Tratamiento con Peróxido de Hidrógeno

1.2 Microorganismos

1.2.1 Cepas bacterianas

1.2.2 Condiciones de cultivo de microorganismos

1.2.3 Medio de cultivo

1.1 Material Vegetal

En la **Tabla 3** se muestra las distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

Las plantas de guisante utilizadas en este trabajo son *Pisum sativum* cv. Alaska.

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas para la extracción de proteínas y ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Tabla 3. Genotipos y ecotipos de las plantas *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

Genotipo	Ecotipo
Col(0)	Columbia(Col)
<i>coi1-1</i>	Col
<i>Atmpk1</i>	Col
<i>Atmpk2</i>	Col
<i>Atmpk1 Atmpk2</i>	Col

Los mutantes de inserción de T-DNA de MAPKs del subgrupo C1 de *Arabidopsis Atmpk1* y *Atmpk2* proceden de la colección SIGnAL (Salk Institute Genome Analysis Laboratory, número SALK_063847 y SALK_019507, respectivamente) y han sido caracterizados en nuestro laboratorio (F. Calatayud, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2005). El doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* fue obtenido en nuestro laboratorio a partir del cruce de los mutantes de inserción de T-DNA simples mencionados arriba (E. Barberá, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2006).

1.1.1 Condiciones de cultivo de las plantas

1.1.1.1 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en macetas

Las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en cámaras bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura se mantuvo constante a 21°C y la iluminación procedía de tubos fluorescentes que proporcionaban luz blanca fría, con una intensidad de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ (Sylvania Standard F58W/133-T8). Habitualmente, las plantas se cultivaron

bajo condiciones de fotoperiodo inductivo, que eran de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL).

Las semillas de los distintos genotipos se resuspendieron en agua destilada y se mantuvieron en oscuridad, a 4°C, durante tres días, a fin de sincronizar la germinación.

Se sembraron las semillas en macetas de plástico de 6 ó 15 cm de diámetro, para realizar la caracterización fenotípica o la transformación de *Arabidopsis*, respectivamente, en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (2:1:1). Las macetas se colocaron en bandejas y se regaron una vez por semana por inmersión con agua destilada conteniendo el fertilizante comercial Algoflasth, en una dilución 1:250. Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad alta durante la germinación y para evitar contaminaciones de semillas procedentes de otras plantas próximas. Cuando aparecía el primer par de hojas se agujereaba el plástico en distintos puntos de la bandeja, y el número y tamaño de los agujeros se fue aumentando progresivamente hasta que, al cabo de dos o tres días se eliminó por completo el plástico. Habitualmente se cultivó una planta por maceta para la caracterización fenotípica y la realización de los distintos tratamientos, y 6 plantas por maceta para la transformación.

1.1.1.2 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en cajas Petri

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en cajas Petri, se realizó en cabinas con temperatura constante de 21°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). El medio MS de crecimiento contenía sales MS 2.2 g/l (Duchefa), sacarosa 10 g/l, MES 0.1 g/l pH 5.9, fitoagar 0.6% (Pronadisa).

Las semillas se esterilizaron por inmersión, durante 3 min, en una solución de etanol 70% (v/v) y Tritón X-100 0.05% (v/v), y durante 1 min, en

etanol 95% (v/v); inmediatamente después se lavó con agua Milli-Q estéril, en la campana de flujo laminar, antes de la siembra.

Para la selección de transformantes primarios, las semillas esterilizadas se sembraron en cajas Petri de 9 cm de diámetro (30 mg de semillas, que equivale a unas 1500, en cada caja) que contenían medio de selección con kanamicina [sales MS 2.2 g/l (Duchefa), sacarosa 10 g/l, MES 0.1 g/l pH 5.9, fitoagar 0.6% (Pronadisa), kanamicina 50 mg/l]. Las cajas con las semillas se almacenaron durante tres días a 4°C en oscuridad, tras lo cual se trasladaron a una cabina de cultivo. Después de 7-10 días desde la siembra los transformantes que eran claramente identificables por su color verde y raíz elongada, se trasplantaron, con ayuda de unas pinzas, desde las cajas de medio de selección, a alveolos de plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm con turba:perlita:vermiculita, donde se cultivaron en cabinas con temperatura constante y fotoperiodo de día largo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. Para el análisis de segregación de las líneas transgénicas, las semillas, tras su esterilización, se sembraron individualmente, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, en cajas Petri de 9 cm de diámetro (40 semillas/placa) que contenían medio de selección con kanamicina.

Para la selección de las plantas *coi1-1* homocigotas para la mutación, se sembraron semillas segregantes en placas Petri que contenían medio de crecimiento MS suplementado con JA 20 µM (Duchefa). Después de 8 días desde la siembra eran seleccionadas aquellas plántulas que tenían un crecimiento normal de la raíz, y se transfirieron a macetas, para que continuara su crecimiento (Feys *et al.*, 1994).

Para estudiar la respuesta a la luz del doble mutante de inserción de T-DNA *Atmpk1 Atmpk2*, las semillas tras su esterilización, se sembraron individualmente, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, en cajas Petri conteniendo medio MS (40 semillas/placa). Se almacenaron 4 días en oscuridad a 4°C y después se incubaron en las cabinas de cultivo en

presencia de luz durante 6 horas para inducir la germinación. A continuación las placas se incubaron en oscuridad durante 4 días en las mismas cabinas y para ello se cubrieron con varias capas de papel aluminio dentro de una caja de cartón. Una vez finalizado el periodo de tiempo de cultivo en oscuridad se transfirieron a la luz bajo las condiciones de fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

1.1.1.3 Cultivo de *Pisum sativum* L. en macetas

Las plantas de guisante se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían vermiculita, en una cabina de invernadero. La temperatura oscilaba de acuerdo con las condiciones ambientales, no sobrepasando los 24 °C durante el día y no bajando de 18°C durante la noche, con la ayuda de un sistema de frío y otro de calefacción. La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400W [Philips HDK/400 HPI (R)N], para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). El riego utilizado consistió en solución Hoagland nº 1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966), aportada mediante un sistema de riego por goteo automatizado durante 2 min, cuatro veces al día.

Las fotografías de las plantas de *Arabidopsis* crecidas en maceta o *in vitro* se realizaron con una cámara digital (Olympus C-5050ZOOM). Para las fotografías de detalle de alguna parte de la planta se ha utilizado una cámara (Motic modelo MC-2000) acoplada a un microscopio estereoscópico Motic modelo K-700L.

1.1.2 Tratamientos

1.1.2.1 Tratamiento de Daño Mecánico

En el momento de realizar el ensayo de daño mecánico (daño), las plantas tenían 4 semanas de edad y habían sido cultivadas en tierra, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. Se dañó aproximadamente el 50% del área de las hojas de roseta con unas pinzas dentadas de extremo romo (**Fig. 11**). Se dañaron todas las hojas de roseta de la planta. Una vez dañadas, las plantas se devolvieron a la cámara de cultivo. Se recogieron las hojas de roseta a distintos tiempos tras el tratamiento. El tiempo 0 corresponde a hojas de roseta de plantas no dañadas. Las muestras, una vez recogidas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , hasta su utilización.

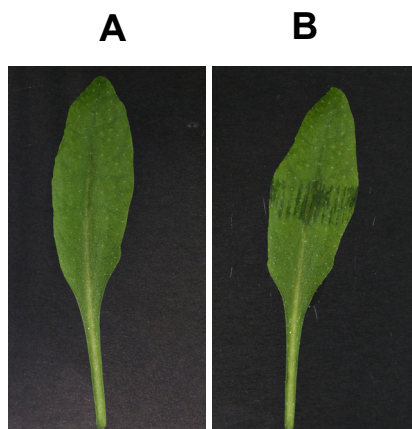


Figura 11. Hoja de *Arabidopsis* antes del tratamiento de daño (A) y después del tratamiento de daño (B).

1.1.2.2 Tratamiento con Ácido Jasmónico (JA)

Para el estudio del efecto del JA sobre la actividad de las MAP quinasas del subgrupo C1 se utilizaron plantas crecidas en tierra que en el momento de realizar el tratamiento con JA tenían 4 semanas de edad. El tratamiento se realizó mediante pulverización de una solución JA $100\ \mu\text{M}$

(Duchefa) (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%) y una solución control (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%). Se recogieron las hojas de roseta a distintos tiempos tras el tratamiento. El tiempo 0 corresponde a hojas de roseta de plantas no tratadas. Las muestras, una vez recogidas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , hasta su utilización.

Para el ensayo de recuperación del fenotipo de esterilidad masculina observado en las plantas *35S::PsMAPK2-GOF* y *35S::PsMAPK2-LOF* se utilizaron plantas de 4 semanas crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos) que fueron tratadas con JA (Duchefa) y MeJA (Aldrich). Los botones florales eran sumergidos en soluciones MeJA 1 mM (en Tween-20 0.05%, DMSO 0.2%) ó JA 0.5 mM (en Tween-20 0.05%, N,N,-dimetilformamida 0.05%) o en una solución control (Tween-20 0.05%, N,N,-dimetilformamida 0.05%).

Las plantas se trataron 2 veces al día durante dos días y se monitorizó la elongación de las silicuas durante 2 semanas.

1.1.2.3 Tratamiento con Ácido Abscísico (ABA)

En el momento de realizar el tratamiento, las plantas tenían 4 semanas de edad y habían sido cultivadas en tierra, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. El tratamiento se realizó mediante pulverización de una solución ABA 100 μM (Aldrich) (etanol 0.05%, en Tween-20 0.01%) y una solución control (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%). Se recogieron las hojas de roseta a distintos tiempos tras el tratamiento. El tiempo 0 corresponde a hojas de roseta de plantas no tratadas. Las muestras, una vez recogidas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , hasta su utilización.

1.1.2.4 Tratamiento con Peróxido de Hidrógeno

En el momento de realizar el tratamiento, las plantas tenían 4 semanas de edad y habían sido cultivadas en tierra, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. El tratamiento se realizó mediante pulverización de una solución de H₂O₂ 5 mM (SIGMA-ALDRICH). Se recogieron las hojas de roseta a distintos tiempos tras el tratamiento. El tiempo 0 corresponde a hojas de roseta de plantas no tratadas. Las muestras, una vez recogidas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C, hasta su utilización.

1.2. Microorganismos

1.2.1. Cepas bacterianas

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas que se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Referencia/origen	Uso
DH5 α (<i>E. coli</i>)	Invitrogen	Transformación de bacterias
C58 MP90 (<i>A. tumefaciens</i>)	Koncz y Schell (1986)	Transformación de plantas
BL21-DE3 (<i>E. coli</i>)	Stratagen	Expresión de <i>PsMAPK2</i> en bacterias

1.2.2 Condiciones de cultivo de microorganismos

Los cultivos líquidos de bacterias, *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37°C y 28°C respectivamente, con agitación de

200 rpm. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en cajas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y de dos a tres días a 28°C, respectivamente.

1.2.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los cultivos bacterianos fue:

- **Medio LB (Luria-Bertani-Medium)**: tripsona 1%, extracto 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0; cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 1.5% de agar (Pronadisa).

Apartado 2

Aislamiento y Purificación de Ácidos Nucleicos

2.1 Aislamiento de ADN plasmídico

2.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico de E.coli

2.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico de A. tumefaciens

2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

2.3 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

2.4 Extracción fenol/cloroformo y precipitación con etanol

2.5 Secuenciación

2.6 Extracción y Purificación de ARN total de A. thaliana

2.1 Aislamiento ADN plasmídico

2.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico de Escherichia coli

Para las preparaciones de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el método de lisis alcalina, tal y como lo describen Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), partiendo de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el correspondiente antibiótico. Las preparaciones de ADN plasmídico a media escala, se realizaron a partir de cultivos crecidos durante una noche en 100 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de ADN plasmídico de los sistemas de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*

Para las preparaciones a pequeña escala de ADN plasmídico de *Agrobacterium* se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 ml, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con 50 µg/ml rifampicina y 100 µg/ml espectinomicina. El sedimento de células resultante de centrifugar el cultivo se resuspendió en 100 µl de solución I y se trató tal y como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Al sobrenadante resultante de la centrifugación a que se somete el lisado obtenido tras añadir la solución III se le añadieron 900 µl de etanol absoluto y se incubaron 30 min a -80°C. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µl de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8).

La pureza de la preparación de ADN obtenida por este procedimiento no era suficientemente alta para realizar el análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1 µl de esta preparación de ADN se utilizaba para transformar *E. coli*. De uno de los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de ese modo se hacía una nueva preparación de ADN plasmídico que se utilizaba para los análisis pertinentes.

2.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

En función del tamaño de los fragmentos de ADN/ARN analizados, la separación mediante electroforesis fue llevada a cabo en geles de agarosa. Para realizar los geles de agarosa se utilizó el tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8), al que se añadió un 5% (v/v) de Bromuro de Etidio 10 mg/ml y un porcentaje variable de agarosa según el

tamaño del fragmento de ADN a analizar (Kb). Las muestras se diluyeron en tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.1%, glicerol 5%), cuya función es colorear la muestra y evitar que se difunda por el gel (Sambrook *et al.*, 1989). La electroforesis se realizó a voltaje constante (80 V) y finalmente las bandas de ADN se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta. Para fotografiar los geles se utilizó la cámara GeneGenius de SYNGENE.

2.3 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Tras separar las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con una cuchilla y el ADN contenido en las mismas se purificó mediante el sistema de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción y purificación de los fragmentos de ADN por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de silicagel, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución del ADN se llevó a cabo en agua estéril.

2.4 Extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol

Los fragmentos de ADN que se deseaba secuenciar fueron extraídos a partir de los geles de agarosa, tal y como se describe en el apartado 2.3 de Material y Métodos, y posteriormente se purificaron mediante el siguiente protocolo.

Se añadió un volumen de agua a la muestra de ADN hasta obtener un volumen final de 100 μ l. Posteriormente se añadió un volumen equivalente de una solución de fenol/cloroformo (en campana de extracción de gases), y se realizó una primera centrifugación de 2 minutos a 13000 rpm y 4°C. Se recogió el sobrenadante (ADN y agua), con precaución de no tocar la interfase. A continuación, se añadieron 6 μ l de NaCl 5 M por cada 100 μ l de sobrenadante recuperado y se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% para producir la precipitación del ADN. Posteriormente, se incubó toda la noche a -20°C. Al día siguiente se realizó una nueva centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación, y se realizó un lavado del precipitado con etanol al 70%. De nuevo, tras otra centrifugación se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente, se secó el precipitado y el ADN se resuspendió en 20 μ l de agua estéril. Las muestras se guardaron a -20°C.

2.5 Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de ADNc (*PsMAPK2*, *PsMAPK2-GOF* y *PsMAPK2-LOF*), la realizó el servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas y se llevó a cabo según el protocolo de secuenciación enzimática desarrollado por Sanger *et al.* (1977), de modo automático en un secuenciador “ABI PRISM 377” (Perkin Elmer). Para ello, el ADN extraído y purificado, se llevó a una concentración de 0,2 μ g/ μ l, y se amplificó con Ampli Taq ADN polimerasa en presencia de ddNTPs, cada uno de ellos marcado con un fluoróforo diferente (Perkin Elmer). Se utilizaron tanto cebadores propios de los vectores plasmídicos como cebadores internos de los fragmentos de ADN objeto de estudio (ver **Tabla 5**). Para los alineamientos de las secuencias se utilizó el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

2.6 Extracción y Purificación de ARN total de *A. thaliana* y *Pisum sativum* L

Para la obtención del ARN total utilizado para las distintas RT-PCRs de *A. thaliana* y *P. sativum* se utilizó el sistema RNeasy (Quiagen) específico para plantas. Las extracciones se llevaron a cabo a partir de 25-100 mg de tejido y todas las muestras fueron tratadas con DNasa, siguiendo las indicaciones del fabricante.

En función de la cantidad de muestra de tejido de la que se partió, se realizaron dos sistemas de homogenización diferentes. Con mayor cantidad de muestra, el tejido se homogenizó por pulverización con nitrógeno líquido en un mortero. Cuando se partió de menor cantidad de tejido, se realizó la pulverización con un émbolo directamente en el interior del tubo, sumergido éste en nitrógeno líquido. La cuantificación del ARN se realizó en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Apartado 3

Manipulación de Ácidos Nucleicos

3.1 Reacciones enzimáticas

3.1.1 Digestiones con enzimas de restricción

3.1.2 Tratamiento con enzimas modificadores

3.1.2.1 Reacciones de ligación

3.2 Vectores plasmídicos

3.3 Diseño de las construcciones de las diferentes versiones de PsMAPK2

3.4 Construcción de las diferentes versiones de PsMAPK2

3.5 Síntesis de ADNc por retrotranscripción (RT)

3.6 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.1 Reacciones enzimáticas

3.1.1 *Digestiones con enzimas de restricción*

Para cada enzima de restricción se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales. Las digestiones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 ml con 5-10 μg ADN, durante al menos 3 h a la temperatura óptima para cada enzima.

3.1.2 Tratamiento con enzimas modificadores

3.1.2.1 Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar gradual entre inserto y vector, que variaba de 3:1 hasta 5:1. La reacción de ligación contenía 50-175 ng de vector (cortado y purificado), la cantidad de inserto (cortado y purificado) necesaria para obtener las proporciones molares mencionadas, el tampón de ligación (MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 66 mM pH 7.5) y 1 unidad de ADN ligasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals), en un volumen total de 15 µl. Las reacciones de ligación se realizaron a 16°C durante 16 h.

3.2 Vectores plasmídicos

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de ADN y de los fines requeridos (**Tabla 5**).

Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pCR[®]2.1, que contiene un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'.

El vector binario pCHF3 (**Tabla 5**) (Hajdukiewicz *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*, 1998) se utilizó para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (ver apartado 4.1.2 de Material y Métodos). Se utilizó para llevar a cabo la expresión constitutiva de *PsMAPK2-LOF*, *PsMAPK2-GOF* y *PsMAPK2* en plantas. La región T-DNA del vector binario pCHF3 está delecionada y contiene únicamente las secuencias RB (right border) y LB (left border), el gen de selección en bacteria, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un sitio de clonación múltiple y el terminador

de la rubisco (RBCS). El vector resultante tiene un tamaño de 10501 Kb aproximadamente. Presenta como sitios de clonaje múltiple *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *Sall*, y *PstI*.

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Enzimas de restricción
pCR [®] 2.1	Kan ^r , Amp ^r , lacZ, Col E1 ori y F1 ori.	<i>HindIII</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i> , <i>BamHI</i> , <i>SpeI</i> , <i>BstXI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>NotI</i> , <i>XhoI</i> , <i>XbaI</i> , <i>ApaI</i>
pCHF3	Spec ^r , Kan ^r , promotor 35S, RBCS	<i>SacI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i> , <i>PstI</i>
pGEX-4T	Ampr, pBR322 ori, Glutathione S-Transferase, lacIq, Ptac	<i>EcoRI</i> , <i>SmaI</i> , <i>Sall</i> , <i>XhoI</i> , <i>NotI</i>

Amp^r: Resistencia a ampicilina.

Kan^r: Resistencia a kanamicina.

Spec^r: Resistencia a espectinomicina.

lacZ: región N-terminal del gen de la β -galactosidasa.

Col E1 ori: origen de replicación en *E.coli*.

F1 ori: origen de replicación en bacteriófago.

RBCS: señal de terminación de la transcripción de la rubisco

3.3 Expresión de PsMAPK2 en E. coli

Para testar la especificidad de los anticuerpos anti-PsMAPK2 se expresó *PsMAPK2* en *E.coli*. Para ello, el fragmento de PCR correspondiente al ADNc de *PsMAPK2* se clonó en el vector pCR[®]2.1 para generar en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente. Posteriormente, utilizando estas enzimas de restricción, el ADNc de *PsMAPK2* se clonó en el vector pGEX-4T (**Tabla 5**) (en pauta de lectura) (MJ Marcote, resultados no publicados). Posteriormente, con esta construcción se transformó *E. coli* BL21 (DE 3) (**Tabla 4**) mediante choque térmico (ver apartado 4.1.1 de Material y Métodos). La expresión y

purificación de la proteína de fusión GST-PsMAPK2 se realizó siguiendo las instrucciones de Ge Healthcare.

3.4 Obtención de diferentes versiones de *PsMAPK2*

Para el estudio de la función de PsMAPK2 se expresaron constitutivamente diferentes versiones mutantes de PsMAPK2 en plantas transgénicas. El ADNc de *PsMAPK2* se aisló rastreando una genoteca de ADNc de ovarios de guisante (MJ Marcote, resultados no publicados). Con el fin de facilitar la detección de la proteína PsMAPK2 en las plantas transgénicas se adicionó en el extremo 5' del ADNc de *PsMAPK2* la secuencia que codifica el péptido YPYDVPDYA, derivado de la hemaglutinina humana del virus de la gripe, HA (Wilson *et al.*, 1984) por PCR (MJ Marcote, resultados no publicados) (**Fig. 12**). A partir de este ADNc, se generó la versión mutante dominante negativa de *PsMAPK2*, denominada *PsMAPK2-LOF* (del inglés *loss-of-function mutation*), y la versión constitutivamente activa *PsMAPK2-GOF* (del inglés *gain-of-function mutation*). La versión *35S::PsMAPK2-GOF* se realizó sustituyendo los nucleótidos que codifican D328 en el ADNc de *PsMAPK2*, por los que codifican N328 (D328N) (**Fig. 12**). La versión *35S::PsMAPK2-LOF* se obtuvo, al sustituir los nucleótidos que codifican K61 en el ADNc de *PsMAPK2*, por los que codifican A61 (K61A) (**Fig. 12**). Para obtener las diferentes versiones se realizó la técnica de mutagénesis dirigida utilizando el kit Quickchange TM Site-Directed Mutagenesis de Stratagene (MJ Marcote, resultados no publicados). Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación (ver apartado 2.5 de Material y Métodos).



Figura 12. Secuencia de nucleótidos del ADNc de *PsMAPK2*, que incluye la secuencia del epítipo HA adicionado. La secuencia que codifica el péptido derivado de la hemaglutinina humana del virus de la gripe, HA, se muestra en naranja. Los nucleótidos cambiados en la versión de pérdida de función se muestra en verde y el de ganancia de función se muestra en azul. *BamHI*, *Sall* y *XbaI* corresponde a los sitios de restricción adicionados.

3.5 Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las diferentes versiones de *PsMAPK2*

Los ADNc de cada una de las versiones de *PsMAPK2* (*PsMAPK2*, *PsMAPK2-GOF* y *PsMAPK2-LOF*) se subclonaron en el sitio *EcoRI* del plásmido pCR[®]2.1 (ver **Tabla 5**) para agregar los sitios de restricción *BamHI* y *Sall* en el ADNc y facilitar su inserción en el vector de expresión de plantas. Cada uno de los ADNc fue liberado del plásmido pCR[®]2.1 como un fragmento *BamHI*, en el extremo 5', y *Sall*, en el extremo 3', para su posterior clonación en el vector binario de expresión de plantas pCHF3 (ver **Tabla 5**) (MJ Marcote, resultados no publicados). pCHF3 es un vector de expresión bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la

coliflor (CaMV) (Benfey *et al.*, 1990) y del terminador de la carboxilasa/oxigenasa 1,5-bisfosfato de guisante, y que contiene el gen *nptII* de resistencia a kanamicina para la selección de las plantas transformadas. Para la selección de bacterias transformadas pCHF3 tiene el gen *aadA* de resistencia a espectinomicina. El vector con el inserto tiene un tamaño de 11200 Kb aproximadamente. La estructura de los T-DNAs resultantes se representa en la **Figura 13**.

Una vez obtenidas las distintas construcciones (pCHF3-*PsMAPK2*, pCHF3-*PsMAPK2-GOF* y pCHF3-*PsMAPK2-LOF*) se transformó *E. coli*, mediante choque térmico (ver apartado 4.1.1 de Material y Métodos), y se seleccionaron los transformantes espectinomicina resistentes tal y como se describe en el apartado 4.1.3 de Material y Métodos. Se aisló el vector con el inserto y se transformó por electroporación una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, que contenía ya el plásmido pTi desarmado (resistencia rifampicina) (ver apartado 4.1.2 de Material y Métodos). Se seleccionaron los recombinantes rifampicina/espectinomicina resistentes y se procedió a la transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante baño floral (del término inglés “*floral dip*”) (ver apartado 5.1 de Material y Métodos), donde el ADN comprendido entre los bordes LB y RB del vector binario es transferido a la célula vegetal. Las plantas que insertaron el ADN fueron seleccionadas en medio con kanamicina. El esquema general seguido para las construcciones se muestra en la **Figura 14**.

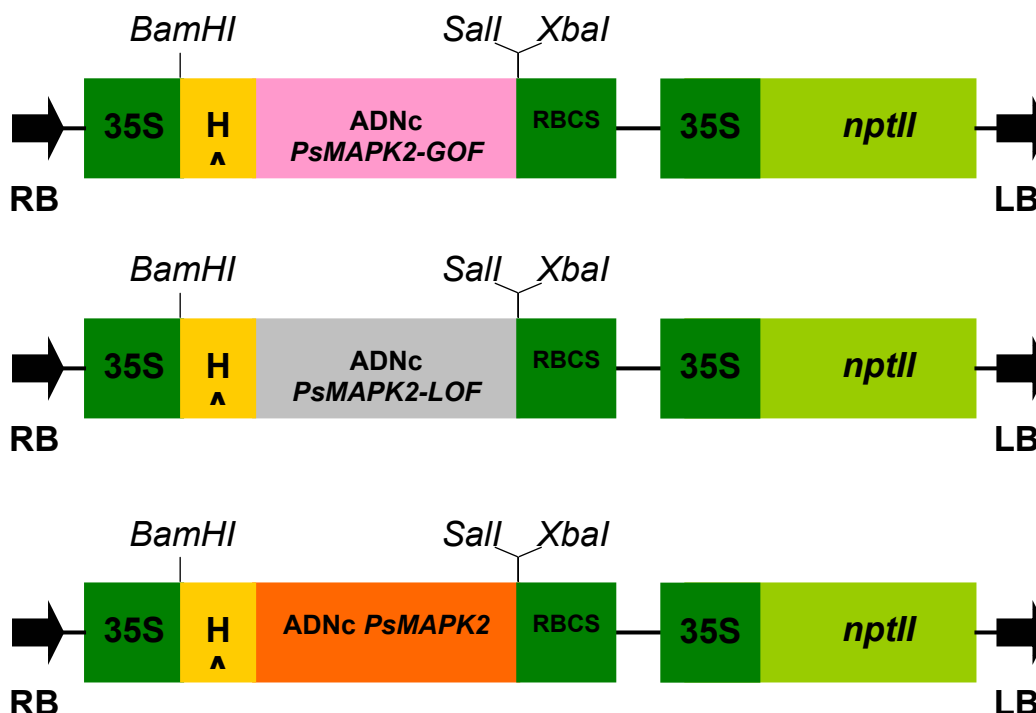
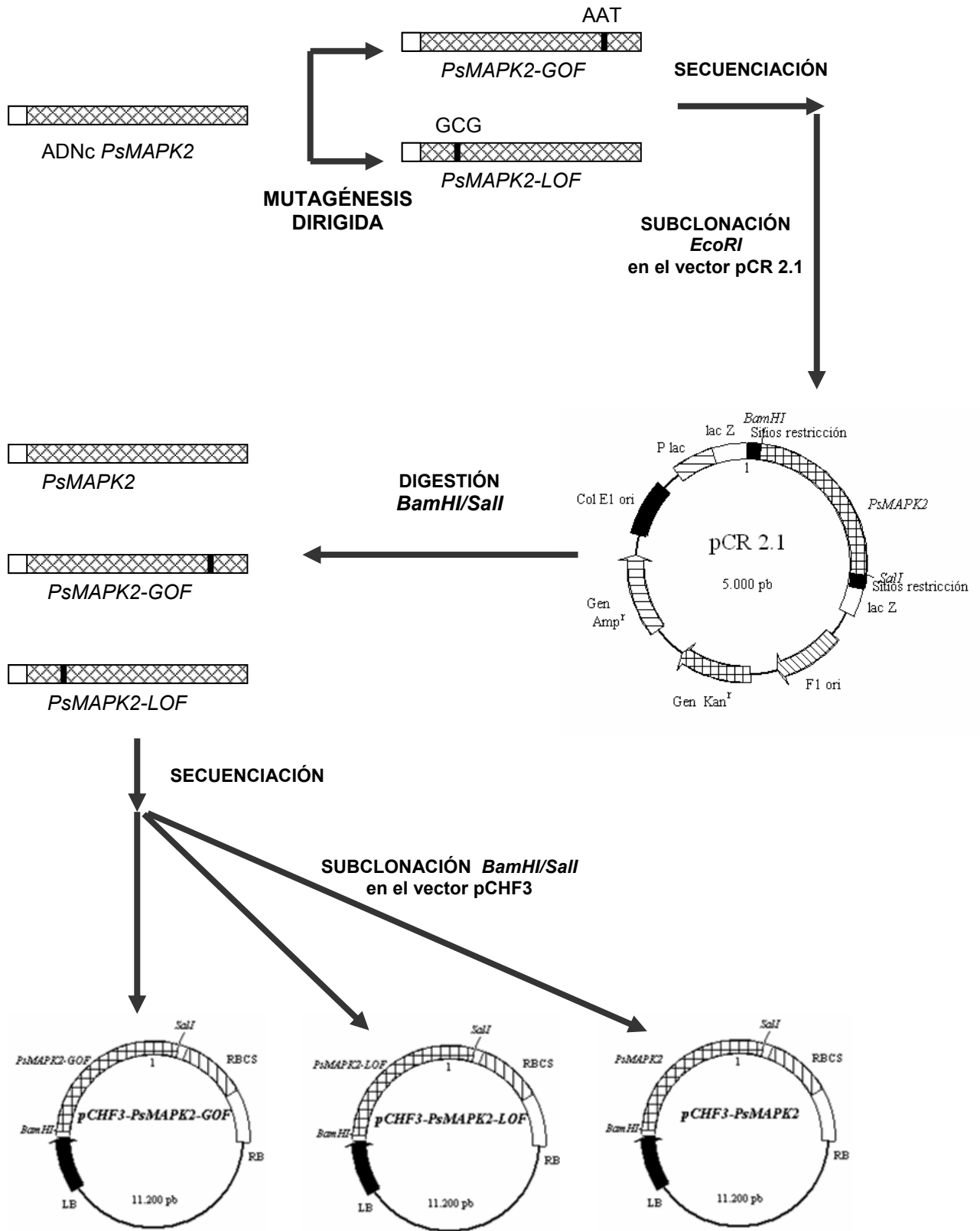


Figura 13. Esquema de la estructura del T-DNA para los distintos ADNc (*PsMAPK2-GOF*, *PsMAPK2-LOF* y *PsMAPK2*) utilizados para transformar *A. thaliana*. El plásmido pCHF3, empleado en las construcciones, contiene el promotor 35S CaMV y el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina (C. Fankhauser, K. Hanson, and J. Chory, resultados no publicados).

Figura 14 (página siguiente). Esquema del diseño, obtención y construcción de las diferentes versiones mutantes de *PsMAPK2*. Se adicionó en el extremo 5' del ADNc de *PsMAPK2* la secuencia que codifica el péptido YPYDVPDYA, derivado de la hemaglutinina humana del virus de la gripe, HA. Posteriormente se generó la versión mutante dominante negativa de *PsMAPK2* (*PsMAPK2-LOF*), y la constitutivamente activa (*PsMAPK2-GOF*) mediante mutagénesis dirigida. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación. Los ADNc de cada una de las versiones se subclonaron en el sitio *EcoRI* del plásmido pCR[®]2.1 para agregar 3 sitios de restricción (*BamHI*, *Sall* y *XbaI*) y facilitar así la inserción del ADNc en el vector de transformación de plantas pCHF3. Cada uno de los ADNc fue liberado del plásmido pCR[®]2.1 como un fragmento *BamHI*, en el extremo 5', y *Sall*, en el extremo 3', para su posterior clonación en el vector pCHF3.



3.5 Síntesis de ADNc por retrotranscripción (RT)

Este procedimiento permite obtener ADNc, a partir de ARN mediante la acción de una retrotranscriptasa (una enzima de origen viral que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN). La enzima retrotranscriptasa utilizada fue la “Expand Reverse Transcriptase” de Roche (50 U/μl) y se siguieron las instrucciones de Roche. Se partió de 1 μg de ARN total al que se añadió 2 μl del oligonucleótido dT₁₅ (80 pmoles) y agua libre de ribonucleasas hasta un volumen de 10.5 μl. Se desnaturalizó el ARN y el oligonucleótido durante 10 minutos a 65°C y rápidamente se enfriaron en un baño a 4°C. A continuación se añadió a cada tubo un volumen total de 9.5 μl, que contenía 1 μl de la retrotranscriptasa, 0.5 μl del inhibidor de ribonucleasas (“ARNse inhibitor” de Roche 40 U/μl), 2 μl de una mezcla equimolar a 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 2 μl de DTT 100 mM y 4 μl del tampón del enzima. Posteriormente se incubaron los tubos durante 1 hora a 43°C; luego se inactivó la retrotranscriptasa dejando los tubos 3 minutos a 95°C. Finalmente se añadieron 20 μl de agua y el ADNc obtenido se conservó a -20°C.

3.6 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos de ADNc

Las reacciones de amplificación se realizaron a partir de las indicaciones suministradas en el Kit de PCR Master de Roche (Cat. No. 1 636 103), en un termociclador “GeneAmp PCR system 2400” (Perkin Elmer). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl, a partir de 3 μl de ADNc procedente de la reacción de retrotranscripción. La mezcla de reacción de PCR contenía además 2 μl de una solución 10 μM de cada oligonucleótido específico utilizado en cada reacción (cebadores) (**Tabla 6**), completándose con agua suministrada por el Kit hasta un volumen total de

25 µl. Las reacciones de amplificación se iniciaron con el denominado “Hot start” para evitar amplificaciones inespecíficas. De forma que a los 25 µl de la reacción se añadieron 25 µl de una solución proporcionada por el Kit, que contiene los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, cada uno a una concentración de 0.4 mM) y 2.5 U de la ADN polimerasa de thermophilic eubacterium *Thermus aquaticus* BM (Taq polimerasa) una vez se ha producido la primera desnaturalización a 95°C durante 2 minutos.

Los ciclos de amplificación se repartieron en 15 ciclos iniciales (que empiezan una vez se ha añadido la Taq polimerasa) que están divididos cada uno en tres tramos: 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a la respectiva temperatura de hibridación de los cebadores específicos (normalmente 55°C) y 1 minuto a 72°C (elongación). A estos ciclos iniciales se añadieron un número de ciclos variable (que dependía de lo abundante que era el ARNm que se iba a amplificar) divididos a su vez en tres tramos: 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a la respectiva temperatura de hibridación de los cebadores específicos (normalmente 55°C) y 2 minutos a 72°C (elongación). Finalmente se añadió un periodo de elongación final durante 7 minutos a 72°C. Las muestras se guardaron a -20°C. En la **Tabla 6** se detallan los cebadores utilizados en este trabajo que fueron sintetizados por Isogen Life Science.

Tabla 6. Cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR.

	Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
<i>P. sativum</i>	<i>PsMAPK2</i>	PsMAPK25	GGATCCGCTTTTGGGTTATCAATAAA	68
		PsMAPK23	GGATCCATGGCGACTCCGGTCGAGCC	84
	PsMAPK23	CAGAATATATATCGAGCTCACCGATGACCG	66.8	
	<i>PEAct1</i>	Psact5	GGATCCAAAAGATGGCCGATGCTGAGGAT	68.1
		Psact3	GCAAATCACTTACCATTATACGCGC	61.6
<i>A. thaliana</i>	<i>AtMPK1</i>	AtMPK15	GGATCCCCGGGGAACGTCGTTGG	69.6
		AtMPK13	GGATCCTGATGACAATCAGACATAAGAAGAA	64.2
	<i>AtMPK2</i>	AtMPK25	GGATCCGCGACTCCTGTTGATCCACCT	69.5
		AtMPK23	GGATCCTCCCTGGTGAGTAAGGGAGTG	69.5
	<i>AtMPK7</i>	AtMPK75	GGATCCCATCTCTGATCATTAACAAC	61.6
		AtMPK73	GGATCCCTACTACTCACTCACTGCAAC	66.5
	<i>AtLOX2</i>	LOX2F	TTGGCTGAGGAAGATAAGACCGCAGAACAT	66.8
		LOX2R	TCATTTTATCAAGAAGACAGAGATACAGAA	59.9
	<i>AtAOS</i>	CYP74F	GGATCCATCACAACACTCGCCACT	66.3
		CYP74R	CAGATTATACAACATTTTCTCAAATTCACG	60.2
	<i>AtVSP2</i>	VSP5	ACGTCCAGTCTTCGGCATCC	61.4
		VSP3	GAGCTTAAAAACCCTTCCAG	55.3
	<i>Actina-7</i>	Act5	GGATCCAAATGGCCGATGGTGAGG	66.1
		Act3	GGAAAACCTCACCACCACGAACCAG	64.4

Tm, temperatura de fusión estimada. En todos los cebadores se utilizó una temperatura de alineamiento de 55°C.

Apartado 4

Transformación de Bacterias

4.1 Preparación de células competentes y métodos de transformación

4.1.1 Transformación mediante choque térmico

4.1.2 Transformación mediante electroporación

4.1.3 Selección de recombinantes

4.1 Preparación de células competentes y métodos de transformación

4.1.1 Transformación mediante choque térmico

Se utilizaron células DH5 α (**Tabla 4**) competentes de Invitrogen. La transformación mediante choque térmico se llevó a cabo según el protocolo descrito por el fabricante.

4.1.2 Transformación por electroporación

La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse controller, Accesory for bacterial and fungal electrotransformation (BioRad) según Shen & Forde, 1989 para *A. tumefaciens*.

Tras descongelar en hielo una alícuota de 50 μ l de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1 μ l de vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0.1

cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser™ (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 400 Ω , 25 μ F y 1.8 kV. Después del pulso eléctrico se adicionó 1 ml de LB y se incubó 3 h a 28°C y 200 rpm.

4.1.3 Selección de recombinantes

La selección de recombinantes se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas transformadas en cajas de 9 cm de diámetro con medio sólido LB suplementado con el antibiótico al cual el plásmido en uso confería resistencia. En la **Tabla 7** se muestran los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y las concentraciones a las que se usaban.

Tabla 7. Antibióticos y sus concentraciones utilizadas.

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	100 μ g/ml para <i>E.coli</i> .
Espectinomicina	100 μ g/ml para <i>E.coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .
Rifampicina	50 μ g/ml para <i>A. tumefaciens</i> .

Apartado 5

Transformación de Plantas

5.1 Transformación de *A. thaliana*

5.2 Análisis fenotípico y genotípico de las líneas transgénicas

5.1 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para la construcción de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron plantas silvestres del ecotipo *Columbia* (Col). La transformación se realizó siguiendo el protocolo de baño floral descrito por Clough & Bent, 1998.

Aproximadamente unas 60 semillas de *A. thaliana* se sembraron en macetas de 15 cm de diámetro, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. Transcurridas unas 2 semanas desde la siembra, se eliminaron algunas plantas con el fin de facilitar el crecimiento homogéneo y adecuado de la población. Una vez las plantas habían producido el escape floral, cuando la última hoja caulinar se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia principal (altura de las plantas de 9-11 cm) éste se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencias laterales. El tiempo aproximado que transcurría desde la siembra hasta que se decapitaban las plantas era de aproximadamente de un mes y 5-6 días. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración (día -3) un tubo de 10 ml con 5 ml de medio LB, con 50 µg/ml rifampicina y 100 µg/ml espectinomicina, se inoculó a partir de un glicerinado, con la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens* (**Tabla**

4), portadora de la construcción de interés y se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C, con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo (día -2), un matraz de 1 litro con 300 ml de medio LB con rifampicina (50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) se inoculó con los 5 ml de precultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones durante 24 h. El día de la infiltración (día 0) el cultivo se recogió por centrifugación, 6000 rpm durante 15 minutos, y el sedimento con las bacterias se resuspendió en 250 ml de medio de infiltración (sacarosa 5% (w/v) y silwet L-77 200 µl/l).

Antes de la infiltración, a las plantas se les quitaron todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas.

En el momento de la infiltración, las macetas se invertían y se introducían durante 1 minuto en una cubeta que contenía los 250 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración, de manera que no sólo los ápices florales sino también las hojas de la roseta quedaban sumergidos en el líquido. Durante el tiempo que la planta permanecía sumergida en el medio de infiltración era agitada vigorosamente. Una vez pasado este periodo de tiempo las plantas se colocaron horizontalmente en bandejas, se cubría la bandeja con un plástico transparente y se devolvían las plantas a la cabina de cultivo. Se mantuvieron con el plástico durante 24 h, para posteriormente eliminarlo y poder colocar las plantas verticalmente para que continuaran creciendo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. Las plantas se cultivaron hasta obtener semillas maduras (3 semanas después).

Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de papel y se almacenaron en ambiente seco durante al menos 1 mes. Para la selección de los transformantes primarios (T_1), las semillas procedentes de plantas individuales T_1 se esterilizaron, se sembraron en cajas Petri de 9 cm de diámetro con medio de selección con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro* (ver apartado 1.1.1.2 de Material y Métodos). Después de

7-10 días desde la siembra los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas; en este momento se trasplantaron a alveolos (6.5 X 6.5 X 5 cm) con una mezcla de turba:perlita:vermiculita 2:1:1 y se trasladaron a un fitotrón para su crecimiento bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos.

5.2 Análisis fenotípico y genotípico de las líneas transgénicas

Para estimar el número de *loci* en que se había integrado el T-DNA en las distintas líneas transgénicas primarias se *Arabidopsis*, 40 semillas procedentes de plantas individuales T₁ se sembraron tras su esterilización en cajas de medio con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro* tal y como se describe en el apartado 1.1.1.2 de Material y Métodos. El recuento de plántulas verdes, resistentes al antibiótico, y de plántulas albinas (sensibles al antibiótico) se realizó a los 7-10 días después de la siembra. Las plantas homocigotas y heterocigotas en la población T₂ fueron identificadas mediante el análisis de las correspondientes progenies T₃ por el mismo método.

Para el análisis de los datos de segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie de las distintas líneas transgénicas, las hipótesis nulas (H₀) planteadas fueron: que los datos eran compatibles con una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) lo que corresponde a la inserción del T-DNA en un único *locus*, compatibles con una segregación 15:1, que corresponde a la inserción del T-DNA en dos *loci*, o bien compatibles con una segregación 1:1 (resistentes:sensibles) en plantas cruzadas con polen de plantas no transformadas (Col(0)). La hipótesis alternativa (H₁) fue que

no se cumpliera la hipótesis H_0 ; las categorías son: plántulas resistentes y sensibles a kanamicina.

Se utilizó el estadístico muestral χ^2 , que se construye utilizando la siguiente expresión analítica:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{[(O_i - E_i) - 0.5]^2}{E_i}$$

donde K = número de categorías; O_i = número de plantas observadas de la categoría; E_i = número de plantas esperadas de la categoría. Este estadístico se distribuye bajo la hipótesis nula como una χ^2 con $k-1 = 1$ grados de libertad.

Para contrastar el cumplimiento de la H_0 se compara el valor del estadístico muestral χ^2 con el valor del χ^2 de las tablas para un grado de libertad y un nivel de significación α (probabilidad de rechazo) del 0.05 (5%). Si el valor del estadístico muestral χ^2 es superior al valor de las tablas (χ^2_{k-1}) se rechaza la hipótesis nula. En este caso concreto de un grado de libertad, el valor del χ^2 de las tablas es 3.84.

Apartado 6

Extracción e Inmunoprecipitación de Proteínas

6.1 Extracción de proteínas

6.2 Determinación de la concentración de proteínas

6.3 Anticuerpos específicos de MAP quinasas del subgrupo C1 de plantas

6.4 Inmunoprecipitación de proteínas

6.1 Extracción de proteínas

La procedencia del material utilizado para las extracciones variaba dependiendo de la edad de las plantas de *A. thaliana*. Así, las plántulas de 14 días utilizadas para la detección y medida de actividad de las diferentes versiones de PsMAPK2 eran cultivadas en placas Petri, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.2 de Material y Métodos. Para los ensayos de daño, JA, SA, ABA y H₂O₂ se utilizaron hojas de roseta de *A. thaliana* de 4 semanas crecidas en tierra, tal y como describe en el apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos. Una vez recogidas, las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la extracción de proteínas, las muestras se pulverizaron con nitrógeno líquido hasta la homogenización, con ayuda de un mortero y un pistilo. Se transfirió el polvo obtenido a un tubo de 1.5 ml preenfriado, evitando en todo momento que la muestra se descongelara, que contenía tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, NaF 20 mM, EGTA 5 mM, EDTA 5mM, DTT 5 mM, β-glicerofosfato 20 mM, Tritón X-100 0.05%,

inhibidores de fosfatasas (SIGMA) e inhibidores de proteasas (SIGMA)). Aproximadamente se utilizó una proporción 1:4 (100 mg de tejido en 400 μ l de tampón). Se centrifugó dos veces a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, para eliminar los agregados celulares, y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo.

6.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas del extracto crudo se midió según el procedimiento de medida de proteína del sistema Bio-Rad Protein Assay Kit, basado en el método de Bradford, 1976. Este método permite relacionar la variación de la absorbancia a 595 nm de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, con la cantidad de proteínas presentes en una muestra.

Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-160 (SHIMADZU).

6.3 Anticuerpos específicos de MAP quinasas del subgrupo C1 de plantas

Se generaron anticuerpos específicos de PsMAPK2 (Gramsch Laboratories, Germany), AtMPK1 y AtMPK2 (SIGMA-GENOSYS) mediante inmunización de conejos contra los siguientes péptidos del extremo C-terminal:

- PsMAPK2-HYHPGSAMGNAELSS
- AtMPK1-HPQASTLNTEL
- AtMPK2-PEAATINNNEVSEF

Los péptidos se sintetizaron y se unieron a la hemocianina de la lapa californiana (keyhole limpet). Los anticuerpos se purificaron por afinidad (MJ. Marcote, resultados no publicados y SIGMA-GENOSYS). En el apartado de Resultados se demuestra la especificidad de estos anticuerpos en inmunoprecipitación. En general, estos anticuerpos no son de utilidad para análisis Western (ver Resultados).

6.4 Inmunoprecipitación de proteínas

La medida de la actividad proteín quinasa de las diferentes versiones de PsMAPK2 (PsMAPK2-LOF, PsMAPK2-GOF y PsMAPK2) expresadas en *A. thaliana* se realizó mediante la inmunoprecipitación previa de las distintas versiones de PsMAPK2 con el anticuerpo anti-PsMAPK2 (ver apartados 1.2 y 1.3 de Resultados). No se utilizó el anticuerpo anti-HA porque los experimentos realizados en este trabajo indican que este anticuerpo no reconoce a HA-PsMAPK2 en inmunoprecipitación. Para cada inmunoprecipitación se utilizaron 200 µg de proteínas totales y se ajustó el volumen a 500 µl con tampón de lisis (ver apartado 6.1 de Material y Métodos). La medida de la actividad proteín quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 se realizó mediante la inmunoprecipitación previa de AtMPK1 y AtMPK2 con los anticuerpos específicos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2, respectivamente (ver apartado 2.2 de Resultados). Para cada inmunoprecipitación se utilizaron 100 y 400-800 µg de proteínas total, para el caso de AtMPK1 y AtMPK2 respectivamente, y se ajustó el volumen a 500 µl con tampón de lisis.

Una vez ajustados los volúmenes se adicionó el anticuerpo de elección (**Tabla 8**) y se incubó durante 1 h, a 4°C. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 25 µl de proteína A sefarosa (Amersham Bioscience), y se incubó bajo rotación durante 1.5 h a 4°C. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con tampón de lisis y una vez con

tampón del ensayo quinasa (Tris 30 mM pH 7.5, EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, β-glicerofosfato 20 mM).

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para las inmunoprecipitaciones en este trabajo

Anticuerpo	Casa comercial	Volumen utilizado (μl)
Anti-PsMAPK2	Gramsch Laboratorios	7
Anti-AtMPK1	SIGMA	7
Anti-AtMPK2	SIGMA	7

Una vez lavada la proteína A sefarosa, si las muestras eran destinadas a la elaboración del ensayo de actividad proteín quinasa, descrito en el apartado 7 de Material y Métodos, se adicionaba directamente el tampón del ensayo quinasa y se procedía a realizar el ensayo de actividad. En el caso de que las muestras fueran para la detección por Western, se eluyeron las proteínas de la proteína A sefarosa adicionando tampón de carga Laemmli 3X, (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 25 μg/ml, 50 μl/ml β - mercaptoetanol 14 M) y calentando 5 min a 100°C.

Apartado 7

Ensayo de Actividad MAP quinasa

7.1 Sistema no radioactivo (MAP Kinase Assay Kit)

7.1.1 Cálculo de la actividad quinasa

7.1.2 Titulación Erk1

7.2 Sistema radioactivo ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$)

7.2.1 Cálculo de la actividad quinasa

En las células, las MAP quinasa pueden estar reguladas a nivel de la transcripción, traducción y por activación o inactivación de su actividad enzimática por fosforilación y desfosforilación, respectivamente. Sin embargo, la detección de cambios en la actividad enzimática de las MAPKs es uno de los mejores indicativos para relacionar un determinado suceso fisiológico con una ruta MAPK. La actividad enzimática de las MAPKs se mide por la capacidad de fosforilar un sustrato específico. Normalmente se utiliza como sustrato la proteína básica de mielina (PBM), que contiene el sitio consenso de fosforilación de las MAPKs.

En este trabajo, la medida de actividad quinasa (actividad transferasa de grupo fosforilo) de las MAP quinasa del subgrupo C1 se realizó sobre los inmunoprecipitados de PsMAPK2, AtMPK1 o AtMPK2 (ver apartado 6 de Material y Métodos). Se midió la actividad quinasa por dos procedimientos (con y sin radioactividad), ambos basados en la fosforilación de la proteína básica de mielina. Como dador del grupo fosforilo se utilizó el ATP. La **Figura 15** muestra el esquema general del ensayo de actividad MAP quinasa.

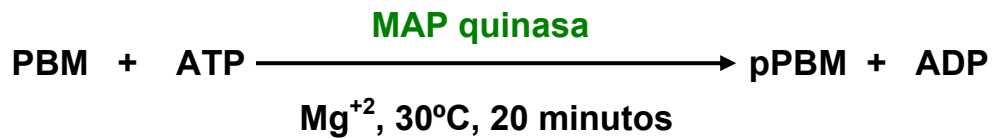


Figura 15. Esquema básico de la medida de actividad proteína quinasa.

El primer procedimiento de medida de actividad MAP quinasa que se describe es el sistema no radioactivo MAP Kinase Assay Kit (Upstate biotechnology). El sistema no radioactivo se ha utilizado en las etapas iniciales del trabajo y tiene la gran ventaja de evitar el manejo de radioactividad. Cuando se determinaba que tras un tratamiento se inducía la actividad quinasa de las MAPKs del subgrupo C1, éste método se sustituía por el radioactivo con objeto de cuantificar los incrementos de actividad.

7.1 Sistema no radioactivo MAP Kinase Assay Kit

El esquema general de este procedimiento se muestra en la **Figura 16**. Este sistema no radioactivo está basado en la detección del sustrato fosforilado por análisis Western utilizando un anticuerpo monoclonal contra la PBM fosforilada (ver **Tabla 9**).

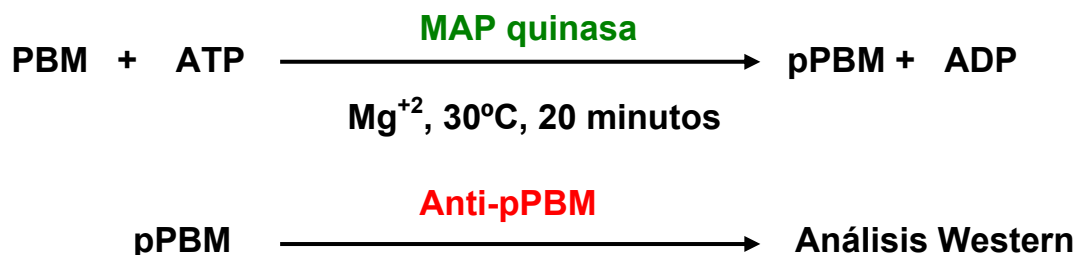


Figura 16. Esquema del ensayo de actividad MAP quinasa no radioactivo. En un primer paso, se adiciona al inmunoprecipitado el tampón de actividad, que contiene ATP, PBM y magnesio, y se incuba durante 20 min a 30°C. Posteriormente se procede a la detección de la PBM fosforilada mediante SDS-PAGE y posterior análisis Western con el anticuerpo monoclonal pPBM.

La medida de la actividad quinasa específica de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2 se realizó en inmunoprecipitados con anticuerpos específicos contra PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2 respectivamente (ver apartado 6.3 de Material y Métodos). Una vez lavada la proteína A sefarosa, se adicionó directamente el tampón de actividad [10 μ l tampón ADBI (MOPS 20 mM, pH 7.2, β -glicerofosfato 25 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, ditiotreitól 1 mM), 10 μ l tampón ATP/Magnesio (Cl_2Mg 75 mM, ATP 500 μ M en ADBI), 10 μ l tampón PBM (PBM 2 mg/ml, MOPS 20 mM, pH 7.2, β -glicerofosfato 25 mM, EGTA 5 mM, MnCl_2 0.4 mM, ortovanadato sódico 1 mM, ditiotreitól 1 mM), y 10 μ l del cóctel de inhibidores (péptido inhibidor PKC 20 μ M, péptido inhibidor PKA 2 μ M en ADBI)]. Se incubó durante 20 min a 30°C, dando pulsos de agitación cada 5 min, para favorecer el contacto de la MAPK con la PBM. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción enfriando en hielo durante varios minutos, se adicionó tampón de carga Laemmli 3X y se procedió al análisis por SDS-PAGE y Western (ver apartado 8 y 9 de Material y Métodos). En los geles de poliacrilamida-SDS se cargaron 20 μ l del sobrenadante obtenido tras sedimentar la proteína A sefarosa.

7.1.1 Cálculo de la actividad quinasa

La actividad quinasa se midió cuantificando la intensidad de las bandas de pPBM por densitometría y se expresó como actividad quinasa relativa. Para ello, se calculó el número de veces que se induce la actividad quinasa con respecto al tiempo 0, considerándose la actividad quinasa relativa a tiempo 0 como 1.

7.1.2 Titulación Erk1

Para caracterizar este método, y antes de utilizarlo con los inmunoprecipitados de las MAPKs objeto de este trabajo, se midió la actividad quinasa de una MAPK humana activa, Erk1 (proteína recombinante expresada en *E. coli*), que posee una masa molecular de 69.9 kDa (MAP Kinase Erk1, UPSTATE Cell Signalling Solutions, referencia # 25105AU). Esta MAPK posee una actividad específica de 550 U/mg, donde una unidad de Erk1 activa está definida como 1 nmol de fosfato incorporado a 0.33 mg/ml de PBM por minuto a 30°C utilizando una concentración final de ATP de 100 μ M. Se efectuaron varias diluciones de Erk1 con el tampón ADBI (ver apartado 7.1 de Material y Métodos) hasta un volumen final de 20 μ l, posteriormente se realizó el ensayo de actividad tal y como se ha descrito en el apartado 7.1 de Material y Métodos y se analizaron los resultados mediante análisis Western con el anticuerpo anti-pPBM.

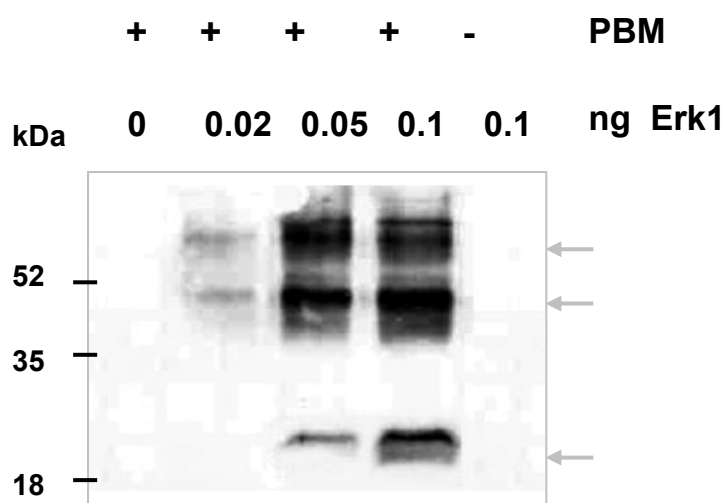


Figura 17. Titulación Erk1.

Como se puede ver en la **Figura 17** el anticuerpo detecta 3 bandas a 20, 40 y 60 kDa cuando están presentes simultáneamente la PBM y Erk1, y la intensidad de estas bandas se incrementa conforme aumenta los nanogramos de Erk1 utilizados (ver las carreras de 2, 3 y 4). Por otro lado, si no se adiciona Erk1 (ver carrera 1) o el sustrato de la reacción (ver carrera 5) no se detecta ninguna banda. La PBM posee una masa molecular de 20 kDa, y las bandas que aparecen a 40 y 60 kDa parecen corresponder a las formas dímeras y trímeras de la PBM.

7.2 Sistema radioactivo ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP)

El esquema general de este método se muestra en la **Figura 18**. Este sistema radioactivo utiliza $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, de manera que las MAPKs transfieren el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ a la PBM en la reacción. Después, la PBM fosforilada se detecta por SDS-PAGE y posterior exposición del gel sobre una película fotográfica. En este trabajo también se midió en un contador de centelleo la radioactividad incorporada a la PBM (ver apartado 7.2.1 de Material y Métodos).

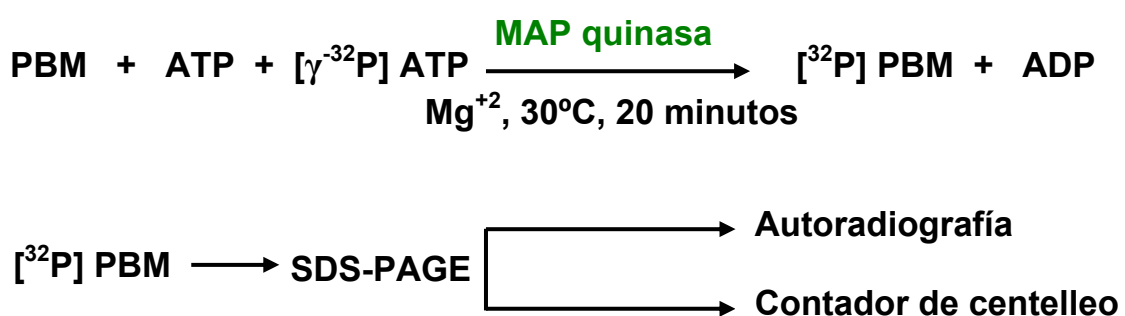


Figura 18. Esquema del ensayo de actividad MAP quinasa radioactivo. En un primer paso, se adiciona al inmunoprecipitado el tampón de actividad, que contiene ATP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, PBM y magnesio, y se incuba durante 20 min a 30°C. Posteriormente se procede a la detección de la $[\text{}^{32}\text{P}]$ PBM mediante SDS-PAGE y posterior autoradiografía, o bien se mide la radioactividad de incorporada a la PBM en un contador de centelleo.

La medida de la actividad quinasa específica de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2 se realizó sobre los inmunoprecipitados de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2, respectivamente (ver apartado 1.2 y 2.2 de Resultados). Una vez lavada la proteína A sefarosa, se adicionó directamente 39 μ l del tampón del ensayo quinasa que contenía PBM 0.7 mg/ml, ATP (frío) 100 μ M y 5 μ Ci de [γ - 32 P] ATP (6000Ci/mmol). Se incubó durante 20 min a 30°C, dando pulsos de agitación cada 5 min, para favorecer el contacto de la MAPK con la PBM. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción enfriando en hielo durante varios minutos, y se adicionó tampón de carga Laemmli 3X. Tras sedimentar la proteína A sefarosa se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente los geles eran teñidos con azul Coomassie R250 (Coomassie Blue R250 2.5% (w/v), MeOH 40% (v/v) y AcH 7% (v/v)) durante 30 minutos bajo agitación constante. Pasado este tiempo, se procedía a la decoloración de los geles con una mezcla MeOH-AcH (MeOH 10% (v/v) y AcH 10% (v/v)) durante 1 hora bajo agitación. Una vez decolorados, los geles eran secados con la ayuda de una bomba de vacío y se procedía a la exposición de una película de 3 a 24 h según la intensidad de la señal.

7.2.1 Cálculo actividad quinasa

Para cuantificar los cambios en la actividad quinasa, se midió la radioactividad (cuentas detectadas por minuto, cpm) incorporada a la proteína básica de mielina en cada muestra. Para ello, se cortaron las bandas de 20 kDa correspondientes a la PBM de los geles de poliacrilamida-SDS previamente secados y se midió la radioactividad en un contador de centelleo (1450 Microbeta TRILUX). Las bandas eran colocadas en tubos y se les adicionaba 1 ml de líquido de centelleo. Las actividades específicas se obtuvieron calculando 32 P incorporado $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Las actividades quinasas relativas se han expresado como el número de

veces que se induce la actividad específica con respecto al tiempo 0, considerándose la actividad específica relativa a tiempo 0 como 1. Los valores de actividades quinasa relativas que se muestran en las gráficas son iguales a las actividades quinasa determinadas por densitometría de PBM de las autorradiografías en el rango lineal de desarrollo de las bandas del film.

Apartado 8

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida, SDS-PAGE

8.1 Soluciones, tampones utilizados y procedimiento

La electroforesis nos permite separar proteínas en base a su movilidad electroforética (Laemmli, 1970). La presencia de un agente reductor como el 2-β-mercaptoetanol y el calentamiento de las muestras provocan la desnaturalización de las proteínas. El SDS (dodecil sulfato sódico), un detergente aniónico, rodea a las proteínas y les confiere una carga negativa proporcional a su peso molecular. Dentro de un campo eléctrico, las proteínas migran hacia el polo positivo (ánodo) a través de una matriz porosa constituida, básicamente de polímeros de acrilamida. El tamaño de las moléculas (proporcional a la masa) determina la separación de las proteínas durante la electroforesis en los geles de poliacrilamida, las cuales migrarán en el gel a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

8.1 Soluciones, tampones utilizados y procedimiento

- **Tampón de electroforesis, pH 8.3.** Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%.
- **Gel de resolución.** 10% acrilamida para la detección de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2 o del 13% acrilamida para el análisis

del ensayo actividad (PBM fosforilada), Tris-HCl 0.39 mM pH 8.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, TEMED 0.0002%.

- **Gel de concentración.** Acrilamida 5%, Tris-HCl 0.13% pH 6.8, SDS 0.1%, APS 0.1%, TEMED 0.0002%.

En la elección del porcentaje de acrilamida del gel de resolución se tuvo en cuenta el tamaño de las proteínas que se quería analizar. El porcentaje más bajo de acrilamida (10%) se utilizó para la separación de proteínas de mayor masa molecular (PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2), mientras que el porcentaje alto (13%) se utilizó para la separación de proteínas de menor masa molecular como la PBM ya que posee una masa molecular de 20 kDa.

Se usaron geles verticales de 0.75 mm de espesor. Una vez polimerizado el gel de resolución, se adicionó el gel de concentración, que sirve para empaquetar las proteínas y en él se hacen los pocillos, de 20 μ l de capacidad, donde se cargan las diferentes muestras. El porcentaje de acrilamida de este gel es siempre bajo para permitir el paso de proteínas de cualquier tamaño.

La electroforesis se realizó en cubetas que contenían tampón de electroforesis a voltaje inicial de 100 V mientras las muestras corren por el gel de concentración y posteriormente a 150-200 V.

Apartado 9

DetECCIÓN DE PROTEÍNAS: ANÁLISIS WESTERN

9.1 Soluciones, tampones empleados y procedimiento

9.2 Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa

9.3 Detección por quimioluminiscencia

La técnica de análisis Western o inmunoblot (inmunodetección) consiste en la detección indirecta de proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa, obtenida por transferencia de un gel de poliacrilamida, utilizando anticuerpos contra ellas. Esta técnica nos permite detectar proteínas gracias a la especificidad de unión que existe entre un antígeno y un anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo puede ser detectado utilizando un segundo anticuerpo marcado con un enzima gracias al producto de la reacción enzimática.

9.1 Soluciones, tampones empleados y procedimiento

- **Tampón de transferencia.** Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, MeOH 20% (v/v).
- **TBS (Tris buffer saline).** Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM.
- **Blotto-Tween.** Leche 3-5% en TBS, Tween-20 0.01%.
- **TBS-Tween (TBS-T).** Tween-20 0.01% en TBS.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm siguiendo la técnica de Burnette (Burnette, 1981).

Las condiciones de transferencia fueron de 100 V durante 1 h a 4°C en tampón de transferencia. Pasado este tiempo, la membrana de nitrocelulosa a la que se le habían transferido las proteínas se incubó con la solución Ponceau (SIGMA) que tiñe reversiblemente todas las proteínas (y se utiliza como control de la cantidad de proteínas cargadas en cada pocillo). A continuación, tras eliminar la tinción de Ponceau con agua se bloqueó la membrana con blotto-tween durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente o alternativamente se bloqueaba durante 16 h a 4°C.

Tras el bloqueo se adicionó el primer anticuerpo diluido en blotto-tween (3-5% de leche) según el anticuerpo. Los anticuerpos empleados así como las diluciones realizadas se muestran en la **Tabla 9**. Las condiciones de incubación variaban según el anticuerpo utilizado: 1 h a temperatura ambiente en el caso de los anticuerpos anti-PsMAPK2 y anti-HA, 2 horas para el caso de anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 y 16 h a 4°C en el caso del anticuerpo anti-pPBM. A continuación se realizaron 6 lavados de 5 min con TBS-T, para eliminar el anticuerpo excedente, y se incubó la nitrocelulosa con el segundo anticuerpo diluido en TBS-T, en aquellos casos en que el primer anticuerpo no tenga acoplado un enzima capaz de convertir un determinado sustrato en luminiscente. Las condiciones de incubación de este segundo anticuerpo también variaban según los anticuerpo: 1 h bajo agitación a temperatura ambiente en el caso de los anticuerpos anti-PsMAPK2, anti-HA, anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 y 1.5 h bajo agitación a temperatura ambiente en el caso del anticuerpo pPBM. A continuación se volvieron a realizar los lavados con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo y se procedió con el revelado (ver apartado 9.3 de Material y Métodos).

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en este trabajo y las diluciones empleadas.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Segundo anticuerpo	Casa comercial	Dilución
Anti-PsMAPK2	Gramsch Laboratories	1:4000	Anti- rabbit IgG HRP	Amersham Biosciences	1:7500
Anti-HA alta afinidad (clon 3F10)	Roche	1:1000	Anti-rat IgG HRP	Amersham Biosciences	1:3000
Anti-HA-Peroxidasa* Alta afinidad	Roche	1:500			
Anti-AtMPK1	SIGMA	1:300	Anti- rabbit IgG HRP	Amersham Biosciences	1:7500
Anti-AtMPK2	SIGMA	1:300	Anti- rabbit IgG HRP	Amersham Biosciences	1:7500
Anti-pPBM (clon P12)	Upstate biotechnology	1:1000	Anti-mouse IgG HRP	Amersham Biosciences	1:2000

* no necesita que se le acople un segundo anticuerpo ya que está conjugado con HRP.

9.2 Eliminación de anticuerpos y reutilización de las membranas de nitrocelulosa

La eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios de las membranas se realizó sumergiendo la membrana en una solución de glicina 0.5 M pH 2.5 durante 10 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación constante. Posteriormente se realizan dos lavados de 10 minutos con TBS-T (ver apartado 9.1 de Material y Métodos) a temperatura ambiente.

Las membranas, una vez lavadas, eran bloqueadas con blotto-tween y se procedió tal y como se especifica en el apartado 9.1 de Material y Métodos. Si las membranas no se utilizaron inmediatamente, se guardaron con SaranWrap a 2-8°C hasta su posterior utilización.

9.3 Detección por quimioluminiscencia

La detección o revelado se realizó mediante ECL, según el procedimiento del sistema de análisis de ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences), basado en una reacción de quimioluminiscencia del luminol que genera un producto que se encuentra en estado excitado y emite luminiscencia (Isaccson & Watermark, 1974; Whitehead, 1979). La adición de un segundo anticuerpo, en aquellos casos que sea necesario, se debe a que este tiene acoplado un enzima, HRP, que en presencia de peróxido de hidrógeno y en condiciones alcalinas, produce la oxidación del luminol, dando lugar a un producto que se encuentra en su estado excitado. La detección por éste método se realizó siguiendo las sugerencias del fabricante. Para el revelado se utilizaron películas CL-X Posure (PIERCE). El tiempo de exposición variaba de 1 min hasta 1 h, según la intensidad de la señal. Las películas se revelaron con una máquina de revelar automática, CURIX 60 (AGFA).



Resultados

1. CARACTERIZACIÓN de PsMAPK2, una MAPK de Guisante

1.1 Expresión de *PsMAPK2* en *Pisum sativum L*

1.2 Expresión constitutiva de PsMAPK2 en un sistema transgénico heterólogo

1.2.1 Obtención de las líneas *35S::PsMAPK2-GOF*

1.2.1.1 Análisis de segregación

1.2.1.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.1.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-GOF

1.2.2 Obtención de las líneas *35S::PsMAPK2-LOF*

1.2.2.1 Análisis de segregación

1.2.2.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.2.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-LOF

1.2.3 Obtención de las líneas *35S::PsMAPK2*

1.2.3.1 Análisis de segregación

1.2.3.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.3.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2

1.2.4 Obtención de las líneas pCHF3

1.2.5 Análisis fenotípico de plantas *35S::PsMAPK2-GOF*,
35S::PsMAPK2-LOF y *35S::PsMAPK2*

1.3 Activación de PsMAPK2

1.3.1 Activación por daño mecánico

1.3.2 Activación por JA

1.3.3 Activación por ABA y H₂O₂

2. CARACTERIZACIÓN de AtMPK1 y AtMPK2, MAPKs de *Arabidopsis*

2.1 Expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en *Arabidopsis thaliana*

2.1.1 Regulación de la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* por luz

2.1.1.1 Respuesta a luz de plántulas etioladas del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

2.2 Activación de *AtMPK1* y *AtMPK2*

2.2.1 Activación por daño mecánico

2.2.2 Activación por JA

2.2.2.1 Análisis de la respuesta al daño JA-dependiente COI1-dependiente en los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* y en el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

2.2.2.2 Activación de *AtMPK1* y *AtMPK2* en *coi1*

2.2.3 Activación por ABA y H₂O₂

Apartado 1

Caracterización de PsMAPK2, una MAPK de Guisante

1.1 Expresión de PsMAPK2 en *Pisum sativum* L

1.2 Expresión constitutiva de PsMAPK2 en un sistema transgénico heterólogo

1.2.1 Obtención de las líneas 35S::PsMAPK2-GOF

1.2.1.1 Análisis de segregación

1.2.1.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.1.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-GOF

1.2.2 Obtención de las líneas 35S::PsMAPK2-LOF

1.2.2.1 Análisis de segregación

1.2.2.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.2.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-LOF

1.2.3 Obtención de las líneas 35S::PsMAPK2

1.2.3.1 Análisis de segregación

1.2.3.2 Análisis de los niveles de expresión

1.2.3.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2

1.2.4 Obtención de las líneas pCHF3

1.2.5 Análisis fenotípico de plantas 35S::PsMAPK2-GOF,

35S::PsMAPK2-LOF y 35S::PsMAPK2

1.3 Activación de PsMAPK2

1.3.1 Activación por daño mecánico

1.3.2 Activación por JA

1.3.3 Activación por ABA y H₂O₂

1.1 Expresión de *PsMAPK2* en *Pisum sativum L*

Con el fin de conocer los niveles de expresión de *PsMAPK2* en guisante, se realizaron análisis mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando cebadores específicos de *PsMAPK2* en distintos órganos de planta adulta. Como gen de referencia se utilizó *PEAc1* (Liu *et al.*, 2004a). El resultado de ese análisis se muestra en la **Figura 19**. *PsMAPK2* se expresa en todos los órganos testados (raíz, hojas, tallos, frutos, flores, carpelos y anteras), principalmente en anteras y sobre todo en raíz.

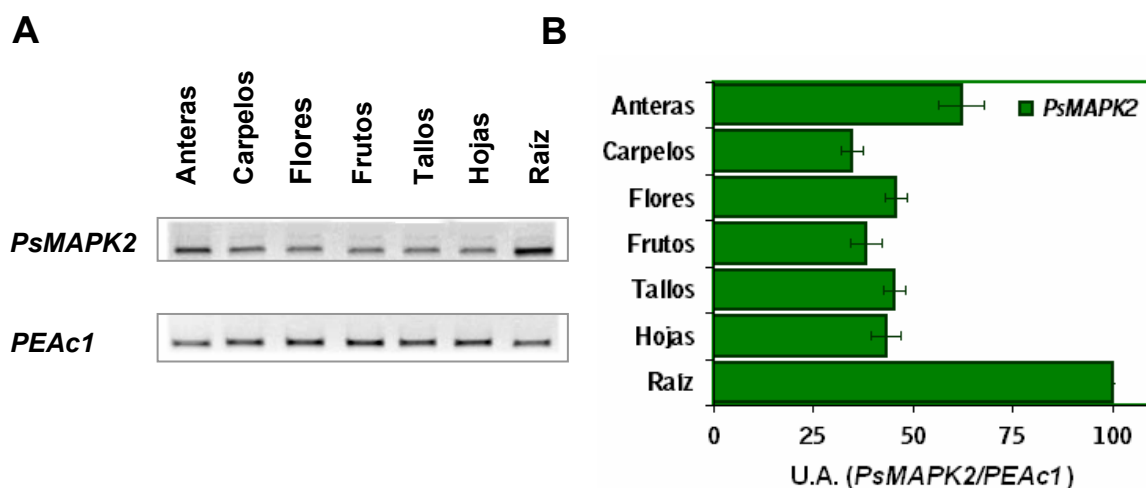


Figura 19. Análisis de los niveles de expresión de *PsMAPK2* en planta adulta de *Pisum sativum*. **A.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó ARN total de distintos órganos, de plantas de guisante crecidas en tierra durante 1 mes. En la PCR se utilizaron los cebadores *PsMAPK5* y *PsMAPK3*, específicos de *PsMAPK2*. Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *PEAc1*. Las PCRs se realizaron como se describe en Material y Métodos y se utilizaron 26 ciclos para la amplificación de los fragmentos de *PsMAPK2* y *PEAc1*. **B.** Cuantificación de la intensidad de las bandas del fragmento de *PsMAPK2* obtenidas en seis reacciones de PCR (como A) diferentes a partir de tres RTs independientes, normalizadas con respecto a la intensidad de las bandas del fragmento de *PEAc1* y considerándose la intensidad relativa obtenida en raíz como 100%. Se presentan los valores medios \pm SEM.

1.2 Expresión constitutiva de PsMAPK2 en un sistema transgénico heterólogo

Para iniciar el estudio de la función de PsMAPK2, se expresaron tres versiones de *PsMAPK2* bajo el promotor constitutivo 35S (ver apartado 3.5 de Material y Métodos) en un sistema heterólogo (*Arabidopsis thaliana*):

- La versión *35S::PsMAPK2-GOF* (del inglés *gain-of-function mutation*) se realizó sustituyendo los nucleótidos que codifican D328 en el ADNc de *PsMAPK2*, por los que codifican N328 (D328N), en analogía con la mutación de ganancia de función de la MAPK codificada por *rolled* (D334N), en el mutante *sevenmaker* de *Drosophila* (Brunner *et al.*, 1994).
- La versión *35S::PsMAPK2-LOF* (del inglés *loss-of-function mutation*) se obtuvo al sustituir los nucleótidos que codifican K61 en el ADNc de *PsMAPK2* por los que codifican A61 (K61A), lo que da lugar a una alteración del sitio de unión del ATP que inhibe la actividad enzimática (Robinson *et al.*, 1996).
- La versión *35S::PsMAPK2* se obtuvo a partir del ADNc de *PsMAPK2*.

Como control de la transformación se utilizó el vector de transformación de plantas (pCHF3) vacío (ver apartado 3.2 de Material y Métodos).

Con el fin de facilitar la detección de PsMAPK2 en las plantas transgénicas, se adicionó en el extremo 5' del ADNc de las diferentes versiones mutantes de PsMAPK2 la secuencia que codifica el péptido YPYDVPDYA, derivado de la hemaglutinina humana del virus de la gripe,

HA (Wilson *et al.*, 1984) (**Fig. 20**). Para la detección del epítipo de HA se utilizaron anticuerpos específicos comerciales (**Tabla 9**).

A partir de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de PsMAPK2 (HYHPGSAMGNAELSS) (**Fig. 20**), se sintetizó un péptido y se generaron anticuerpos específicos contra este péptido. Este anticuerpo se denominó anticuerpo anti-PsMAPK2 y reconoce de forma específica a PsMAPK2 expresada en *E.coli* como proteína de fusión GST-PsMAPK2, como se muestra en la **Figura 21**.

anti-HA

MYPYDVPDYAAATPVEPPNGIRADGKHYYSMWQTLFEIDTKYVPIKPIGRG
 AYGIVCSSVNRETNEKVAI**K**KIQNAFENRVDALRTLRELKLLRHLHHEHVI
 ALKDIMMPVHRTSFKDVYLVYELMDTDLHQIKSSQTLSDHCQYFLFQL
 LRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLINANCDLKICDFGLARTNCSKNQFMTE
 YVTRWYRAPELLLCDDNYGTSIDVWSVGCIFAELLGRKPIFPGSECLNQ
 LKLIINILGSQREEDIEFIDNPKAKRYIKSLPYSPGTPFSRLYPNAHPLAIDL
 LAKMLVFDPIKRISVTEALQHPFMASLYDPNC**D**PPAIIPIDLDIDEDLGEEM
 IRELMWREMV**HYHPGSAMGNAELSS**
anti-PsMAPK2

Figura 20. Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del ADNc de PsMAPK2, que incluye el epítipo HA adicionado. La secuencia YPYDVPDYA que codifica el péptido derivado de la hemaglutinina humana del virus de la gripe, HA, se muestra en naranja. La secuencia de aminoácidos a partir de la cual se sintetizó el péptido para la obtención del anticuerpo policlonal anti-PsMAPK2 se muestra en verde. El aminoácido sustituido en la mutación de pérdida de función (K61A) se muestra en rojo y el de ganancia de función (D328N) en azul.

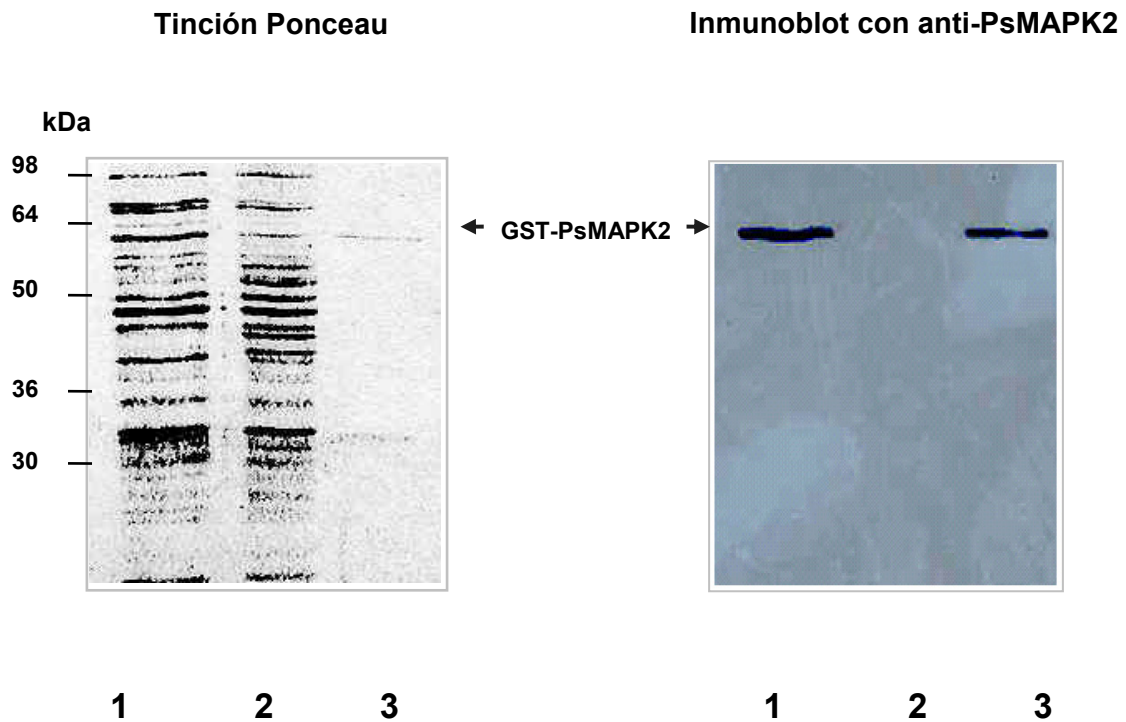


Figura 21. El anticuerpo anti-PsMAPK2 reconoce a PsMAPK2 expresada en *E.coli* como proteína de fusión GST-PsMAPK2. Las carreras 1 y 2 corresponden a 10 μ g de proteína de extracto de proteínas de *E.coli* BL 21 (DE 3) que contiene el vector pGEX-4T-PsMAPK2 tras la inducción con IPTG (carrera 1) o en ausencia de inducción con IPTG (carrera 2). La carrera número 3 corresponde a la purificación de PsMAPK2 del extracto celular de la carrera 1, con bolas de glutation (a las cuales se une la proteína GST fusionada a PsMAPK2).

1.2.1 Obtención de las líneas 35S::*PsMAPK2-GOF*

1.2.1.1 Análisis de segregación de plantas 35S::*PsMAPK2-GOF*

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo *Columbia* (Col) con *pCHF3-PsMAPK2-GOF* (ver apartado 3.5 de Material y Métodos) se obtuvieron 31 plantas independientes capaces de crecer en un medio de selección con kanamicina. Seis plantas mostraron

una alteración fenotípica en la mayoría de sus frutos, consistente en una inhibición en su desarrollo y en la no producción de semillas. Cinco plantas mostraron un fenotipo intermedio y producían frutos sin semillas en menor porcentaje que las anteriores. El resto de las plantas no mostraron cambios fenotípicos apreciables respecto a las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en los que se había producido la inserción del T-DNA, se llevó a cabo el análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T₂ en medio de selección con kanamicina (ver apartado 5.2 de Material y Métodos). Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y transgénicas. Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 10**.

Las líneas transgénicas GOF-17 y GOF-18 no se ajustan a ninguna segregación esperada. En las líneas GOF-1, GOF-2, GOF-3, GOF-6, GOF-7, GOF-10, GOF-11, GOF-12, GOF-14, GOF-15 y GOF-16, la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. Para las líneas GOF-4, GOF-5, GOF-9 y GOF-13, los datos de segregación sugieren que se han producido inserciones del transgen en dos o más *loci* diferentes.

Se seleccionaron varias líneas transgénicas cuya segregación se ajustaba a la esperada para la inserción del T-DNA en un solo locus (con y sin alteraciones fenotípicas) y a partir de ellas se generaron plantas homocigotas, que son las que se han utilizado en este trabajo.

Tabla 10. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T₂ 35S::PsMAPK2-GOF.

Línea	Nº total Semillas analizada s (T)	Resistencia a Kan		Relación S/T	Segregación R:S	Valor χ^2	Nº copias
		+	-				
		(R)	(S)				
GOF-1	14	9	5	1.4/4	3:1	0.66	1
GOF-2	33	24	9	1.1/4	3:1	0.12	1
GOF-3	18	14	4	0.9/4	3:1	0.08	1
GOF-4	25	23	2	1.3/16	15:1	0.13	2
GOF-5	150	137	13	1.4/16	15:1	1.14	2
GOF-6	34	29	5	0.6/4	3:1	2.23	1
GOF-7	129	92	37	1.2/4	3:1	0.40	1
GOF-9	119	114	5	0.6/16	15:1	1.20	2
GOF-10	17	15	2	0.5/4	3:1	1.90	1
GOF-11	31	23	8	1.0/4	3:1	0.04	1
GOF-12	9	7	2	0.9/4	3:1	0.26	1
GOF-13	168	161	7	0.7/16	15:1	1.60	2
GOF-14	11	7	4	1.5/4	3:1	0.84	1
GOF-15	11	8	3	1.1/4	3:1	0.11	1
GOF-16	71	58	13	0.7/4	3:1	1.89	1
GOF-17	149	149	0	-	-	-	-
GOF-18	127	127	0	-	-	-	-
Control	24	0	24				0

1.2.1.2 Análisis de los niveles de expresión de PsMAPK2-GOF en plantas 35S::PsMAPK2-GOF

Para determinar los niveles de expresión de PsMAPK2-GOF en las distintas líneas de *Arabidopsis* 35S::PsMAPK2-GOF se realizó un análisis

Western con un anticuerpo comercial anti-HA que reconoce la secuencia YPYDVDPDYA adicionada en el extremo N-terminal de PsMAPK2-GOF (ver **Tabla 9**). El resultado del análisis Western mostró que el anticuerpo anti-HA reacciona con una proteína de aproximadamente 45 kDa (correspondiente a la masa molecular estimada para PsMAPK2-GOF) en todas las plántulas transgénicas testadas, y no en plántulas control. Además se observa una gradación en los niveles de expresión de PsMAPK2-GOF en las diferentes líneas (**Fig. 22**). Se realizó también el análisis Western de las distintas líneas de *Arabidopsis* 35S::*PsMAPK2-GOF* con el anticuerpo anti-PsMAPK2 (ver apartado 1.2 de Resultados) y los resultados obtenidos indican que los niveles de expresión de PsMAPK2-GOF están por debajo del límite de detección del análisis.

Estos resultados indican que la proteína PsMAPK2-GOF se está expresando en las líneas transgénicas. Además, se observó una correlación entre el nivel de expresión y la alteración fenotípica en el fruto.



Figura 22. Expresión de PsMAPK2-GOF en plántulas 35S::*PsMAPK2-GOF*. 25 µg de proteína total de extracto crudo de plántulas control (Col(0)) y 35S::*PsMAPK2-GOF* (crecidas durante 14 días en placas Petri con medio de cultivo MS) se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con un anticuerpo primario anti-HA (ver Material y Métodos). La posición del marcador de 45 kDa se muestra a la izquierda.

1.2.1.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-GOF

La actividad enzimática MAP quinasa se evalúa por la capacidad de fosforilar un sustrato específico. Usualmente se utiliza como sustrato la proteína básica de mielina (PBM), que contiene el sitio consenso de fosforilación de las MAP quinasas.

Con objeto de medir la actividad quinasa de PsMAPK2-GOF en las plantas 35S::PsMAPK2-GOF, se inmunoprecipitó PsMAPK2-GOF del extracto crudo con el anticuerpo específico anti-PsMAPK2, y posteriormente se midió la actividad proteín quinasa, tal y como se detalla en el apartado 7.1 de Material y Métodos. Como se muestra en la **Figura 23**, en las líneas GOF-6 y GOF-16 se detectan niveles más altos de actividad quinasa frente a la PBM, si se compara con las plantas control (Col(0)) (**Fig. 23A**). La **Figura 23B** muestra los niveles de PsMAPK2-GOF presentes en los inmunoprecipitados que se utilizaron para la medida de actividad quinasa, observándose una correlación directa entre los niveles de proteína y la actividad quinasa. Además, estos resultados demuestran la especificidad del anticuerpo anti-PsMAPK2 en inmunoprecipitación.

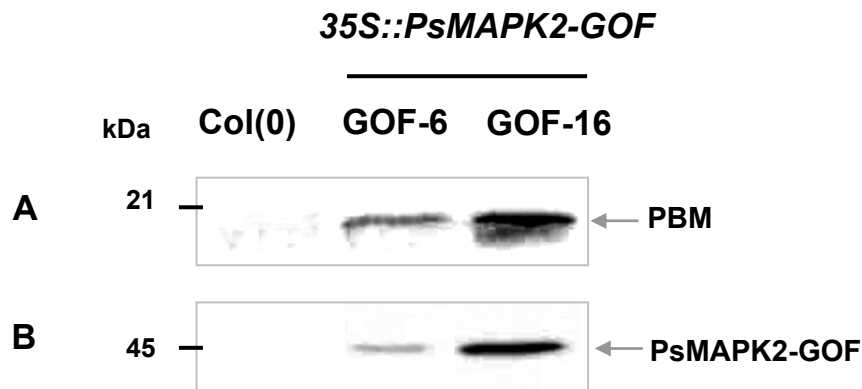


Figura 23. Análisis de la actividad proteína quinasa de PsMAPK2-GOF. **A.** Actividad quinasa PsMAPK2-GOF. Se inmunoprecipitaron con anti-PsMAPK2 200 μ g de proteína de extracto crudo de plántulas control (Col(0)) y 35S::PsMAPK2-GOF (GOF-6 y GOF-16) de 14 días crecidas en placas Petri con medio de cultivo MS. Posteriormente se realizó el ensayo de actividad según se describe en Material y Métodos. La PBM fosforilada se analizó mediante análisis Western. **B.** Niveles de proteína de PsMAPK2-GOF en los inmunoprecipitados con anti-PsMAPK2. La membrana utilizada en el apartado A fue lavada con glicina 0.5 M pH 2.5 e incubada con el anticuerpo primario anti-HA. La posición de los marcadores se muestra a la izquierda.

1.2.2 Obtención de las líneas 35S::PsMAPK2-LOF

1.2.2.1 Análisis de segregación de plantas 35S::PsMAPK2-LOF

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col con *pCHF3-PsMAPK2-LOF* (ver apartado 3.5 de Material y Métodos) se obtuvieron 25 plantas independientes capaces de crecer en un medio de selección con kanamicina; Ocho plantas mostraron el mismo tipo de alteración fenotípica en los frutos descrita en las plantas transformadas con 35S::PsMAPK2-GOF, consistente en que la mayoría de sus frutos presentaban una inhibición del desarrollo y no producían semillas. Una planta mostraba un fenotipo intermedio y producía frutos sin semillas en menor porcentaje que las anteriores. Tres de estas plantas fueron incapaces de producir ningún fruto con semillas. Para conservar estas últimas líneas se realizaron cruces con polen de una línea silvestre Col(0).

El resto de las plantas no mostraron cambios apreciables respecto a las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en los que se había producido la inserción del T-DNA, se llevó a cabo el análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T₂ en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y transgénicas. En el caso de las plantas que no producían frutos con semillas se analizó la segregación a partir de las semillas obtenidas tras el cruce con la línea silvestre (LOF-C). Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 11**.

Las líneas transgénicas LOF-7 y LOF-11 no se ajustan a ninguna segregación esperada. La segregación de LOF-8C no se ajusta a una relación 1:1 correspondiente a la T₁ de un cruce con una planta control del ecotipo Col. En las líneas LOF-1, LOF-2, LOF-9 y LOF-12 la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1, y para las líneas LOF-3C y LOF-4C la segregación obtenida se ajusta a una relación 1:1. Ambas segregaciones corresponden con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En las líneas LOF-5, LOF-6 y LOF-10 la segregación obtenida se ajusta a una relación 15:1, que indica la inserción del transgen en dos *loci* diferentes.

Se seleccionaron varias líneas transgénicas cuya segregación se ajustaba a la esperada para la inserción del T-DNA en un solo locus (con y sin alteraciones fenotípicas) para generar plantas homocigotas. Sólo se consiguió obtener una línea homocigota *35S::PsMAPK2-LOF* (LOF-12). Por ello también se mantuvieron las líneas estériles LOF-3C y LOF-4C en heterocigosis (mediante sucesivos cruces con polen de Col(0)) para los ensayos posteriores.

Tabla 11. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T2 *35S::PsMAPK2-LOF*.

Línea	Nº total semillas analizadas (T)	Resistencia		Relación S/T	Segregación R:S	Valor χ^2	Nº copias
		a Kan					
		+	-				
		(R)	(S)				
LOF-1	40	33	7	0.7/4	3:1	1.40	1
LOF-2	41	28	13	0.9/4	3:1	0.83	1
LOF-3C	40	26	14	1.4/4	1:1	3.63	1
LOF-4C	39	17	22	2.2/4	1:1	0.67	1
LOF-5	41	40	1	0.4/16	15:1	2.14	2
LOF-6	38	35	3	1.2/16	15:1	0.02	2
LOF-7	38	1	37	-	-	-	-
LOF-8C	37	26	11	1.2/4	1:1	6.10	-
LOF-9	34	23	11	1.2/4	3:1	0.82	1
LOF-10	40	36	4	1.6/16	15:1	0.24	2
LOF-11	38	38	-	-	-	-	-
LOF-12	40	33	7	0.7/4	3:1	1.40	1
Control	40	0	40	-	-	-	0

1.2.2.2 Análisis de los niveles de expresión de PsMAPK2-LOF en plantas 35S::PsMAPK2-LOF

Para determinar los niveles de expresión de PsMAPK2-LOF en las distintas líneas de *Arabidopsis* 35S::PsMAPK2-LOF se realizó un análisis Western con el anticuerpo comercial anti-HA. El resultado del análisis mostró que el anticuerpo anti-HA reacciona con una proteína de aproximadamente 45 kDa (correspondiente a la masa molecular estimada para PsMAPK2-LOF) en todas las plántulas transgénicas testadas, y no en plántulas control (**Fig. 24**). Estos resultados indicaron que la proteína PsMAPK2-LOF se está expresando en las líneas transgénicas. Se observa una gradación en los niveles de expresión de PsMAPK2-LOF en las diferentes líneas. También parece existir una correlación entre el nivel de expresión y la alteración fenotípica en el fruto (como en el caso de PsMAPK2-GOF).

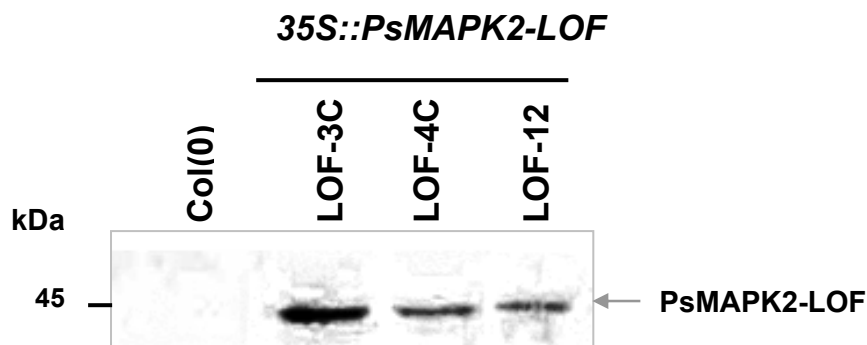


Figura 24. Expresión de PsMAPK2-LOF en plántulas 35S::PsMAPK2-LOF. 25 µg de proteína total de extracto crudo de plántulas control (Col(0)) y 35S::PsMAPK2-LOF (crecidas durante 14 días en placas Petri con medio de cultivo MS) se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con un anticuerpo primario anti-HA. La posición del marcador de 45 kDa se muestra a la izquierda.

1.2.2.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2-LOF

Con objeto de medir la actividad quinasa de PsMAPK2-LOF en las plantas *35S::PsMAPK2-LOF* se inmunoprecipitó PsMAPK2-LOF del extracto crudo con el anticuerpo específico anti-PsMAPK2, y posteriormente se midió la actividad proteín quinasa tal, y como se detalla en el apartado 7.1 de Material y Métodos.

De todas las líneas *35S::PsMAPK2-LOF* testadas ninguna mostró niveles de actividad quinasa frente a PBM diferente a los de las plantas control (datos no mostrados).

1.2.3 Obtención de las líneas 35S::PsMAPK2

1.2.3.1 Análisis de segregación de plantas 35S::PsMAPK2

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col con *pCHF3-PsMAPK2* (ver apartado 3.5 de Material y Métodos), se obtuvieron 16 plantas independientes capaces de crecer en un medio de selección con kanamicina. Dos plantas mostraron el mismo tipo de alteración fenotípica en los frutos descrita en las plantas transformadas con *35S::PsMAPK2-GOF* y *35S::PsMAPK2-LOF*, consistente en que la mayoría de sus frutos presentaban una inhibición del desarrollo y no producían semillas. Una planta presentaba un fenotipo intermedio y producía frutos sin semillas en menor porcentaje que las anteriores. El resto de las plantas no mostraron cambios fenotípicos apreciables respecto a las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en que se había producido la inserción del T-DNA, se llevó a cabo el análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T₂ en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de

plantas control (sin transformar) y transgénicas. Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis T₂ 35S::PsMAPK2*.

Línea	Nº total semillas analizadas (T)	Resistencia a Kan		Relación S/T	Segregación R:S	Valor χ^2	Nº copias
		+	-				
		(R)	(S)				
K2-1	40	31	9	0.9/4	3:1	0.23	1
K2-2	38	35	3	1.2/16	15:1	0.02	2
K2-3	40	20	20	-	-	-	-
K2-4	41	38	3	1.1/16	15:1	0.08	2
K2-5	50	35	15	1.2/4	3:1	0.60	1
K2-6	40	10	30	-	-	-	-
K2-7	58	42	16	1.1/4	3:1	0.15	1
K2-8	60	48	12	0.8/4	3:1	0.95	1
K2-9	29	15	14	1.9/4	-	-	-
K2-10	60	42	18	1.2/4	3:1	0.70	1
K2-11	60	16	44	-	-	-	-
K2-13	40	0	40	-	-	-	0
K2-14	49	46	3	1.0/16	15:1	0.08	2
K2-15	60	48	12	0.8/4	3:1	0.95	1
K2-16	39	32	7	0.7/4	3:1	1.20	1
Control	40	0	40	-	-	-	0

La segregación de las líneas transgénicas K2-3, K2-6, K2-9 y K2-11 no se ajustan a ninguna segregación esperada. En las líneas K2-1, K2-5, K2-7, K2-8, K2-10, K2-15 y K2-16 la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1, correspondiente con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En las líneas K2-2, K2-4 y K2-14 la segregación obtenida

se ajusta a una relación 15:1, que indica la inserción del transgen en dos *loci* diferentes.

Se seleccionaron varias líneas transgénicas cuya segregación se ajustaba a la esperada para la inserción del T-DNA en un solo locus y a partir de ellas se generaron plantas homocigotas, que son las que se han utilizado en este trabajo.

1.2.3.2 Análisis de los niveles de expresión de PsMAPK2 en plantas 35S::PsMAPK2

Para determinar los niveles de expresión de PsMAPK2 en las distintas líneas de *Arabidopsis* 35S::PsMAPK2, se realizó un análisis Western con el anticuerpo comercial anti-HA. El resultado del análisis mostró que el anticuerpo anti-HA reacciona con una proteína de aproximadamente 45 kDa (correspondiente a la masa molecular estimada para PsMAPK2) en todas las plántulas transgénicas testadas, y no en plántulas control. Además, se observa una gradación en los niveles de expresión de PsMAPK2 en las diferentes líneas (**Fig. 25**). Ninguna de estas líneas presentaba el fenotipo de esterilidad porque las líneas T₂ obtenidas procedían de plantas T₁ que no presentaban dicho fenotipo. Se procedió así para facilitar el mantenimiento de las líneas y poder utilizarlas para el estudio de la activación de PsMAPK2 en respuesta a distintos estímulos (ver apartado 1.3 de Resultados).

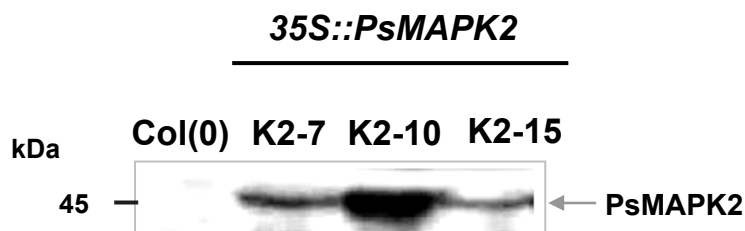


Figura 25. Expresión de PsMAPK2 en plántulas 35S::PsMAPK2. 25 μ g de proteína total de extracto crudo de plántulas control (Col(0)) y 35S::PsMAPK2 (crecidas durante 14 días en placas Petri con medio de cultivo MS) se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con un anticuerpo primario anti-HA. La posición del marcador de 45 kDa se muestra a la izquierda.

1.2.3.3 Análisis de la actividad quinasa de PsMAPK2

Con objeto de medir la actividad quinasa de PsMAPK2 en las plantas 35S::PsMAPK2 se inmunoprecipitó PsMAPK2 del extracto crudo de proteínas con el anticuerpo específico anti-PsMAPK2. Posteriormente se midió la actividad proteín quinasa tal y como se detalla en el apartado 7.1 de Material y Métodos. Como se muestra en la **Figura 26A**, en las líneas K2-7, K2-10, y K2-15 se detectan niveles más altos de actividad quinasa frente a la PBM, si se compara con las plantas control (Col(0)). En la **Figura 26B** se muestran los niveles de PsMAPK2 presentes en los inmunoprecipitados que se utilizaron para la medida de la actividad quinasa, observándose una correlación directa entre los niveles de proteína y la actividad quinasa.

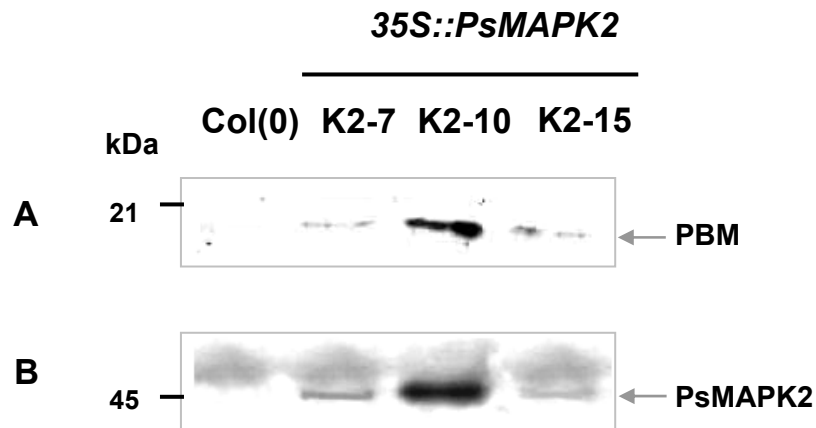


Figura 26. Análisis de la actividad proteína quinasa de PsMAPK2 . A. Actividad quinasa PsMAPK2. Se inmunoprecipitaron con anti-PsMAPK2 200 μ g de proteína de extracto crudo de plántulas control (Col(0)) y *35S::PsMAPK2* de 14 días crecidas en placas Petri con medio de cultivo MS. Posteriormente se realizó el ensayo de actividad según se describe en Material y Métodos. La PBM fosforilada se analizó mediante análisis Western. **B.** Niveles de proteína de PsMAPK2 en los inmunoprecipitados con anti-PsMAPK2. La membrana utilizada en el apartado A fue lavada con glicina 0.5 M pH 2.5 e incubada con el anticuerpo primario anti-HA. La posición de los marcadores se muestra a la izquierda.

1.2.4 Obtención de las líneas control pCHF3

1.2.4.1 Análisis de segregación de plantas pCHF3

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col con el vector pCHF3, se obtuvieron 14 plantas independientes capaces de crecer en un medio de selección con kanamicina. Estas plantas presentaban un fenotipo similar a la línea silvestre.

Con el fin de determinar el número de *loci* en que se había producido la inserción del T-DNA, se llevó a cabo el análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T₂ en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de

plantas control (sin transformar) y transgénicas. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T₂ pCHF3.

Línea	N° total			Relación S/T	Segregación R:S	Valor χ^2	N° copias
	Semillas analizada	Resistencia a Kan					
	s (T)	+ (R)	- (S)				
pCHF3-1	20	14	6	1.2/4	3:1	0.20	1
pCHF3-2	28	22	6	0.9/4	3:1	0.30	1
pCHF3-3	24	17	7	1.0/4	3:1	0.16	1
pCHF3-10	23	22	1	0.7/16	15:1	1.10	2
pCHF3-12	39	25	14	1.4/4	3:1	1.92	1
pCHF3-13	39	32	7	0.7/4	3:1	1.45	1
pCHF3-14	40	33	7	0.7/4	3:1	1.65	1
Control	40	0	40	-	-	-	0

En las líneas pCHF3-1, pCHF3-2, pCHF3-3, pCHF3-12, pCHF3-13 y pCHF3-14 la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1, correspondiente con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En la línea pCHF3-10 la segregación obtenida se ajusta a una relación 15:1, que indica la inserción del transgen en dos *loci* diferentes.

Se seleccionaron varias líneas transgénicas cuya segregación se ajustaba a la esperada para la inserción del T-DNA en un solo locus, y a partir de ellas se generaron plantas homocigotas, que son las que se han utilizado en este trabajo.

1.2.5 Análisis fenotípico de plantas 35S::*PsMAPK2-GOF*, 35S::*PsMAPK2-LOF* y 35S::*PsMAPK2*

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col con las diferentes versiones de *PsMAPK2*, se generaron plantas T₁ con un fenotipo característico y común en el fruto. El 36% de las plantas T₁ 35S::*PsMAPK2-GOF*, el 36% de las plantas T₁ 35S::*PsMAPK2-LOF* y el 18% de las plantas T₁ 35S::*PsMAPK2* presentaban este fenotipo, que se mantenía en las plantas T₂ homocigotas. En estas plantas se apreciaba visualmente que no habían desarrollado silicuas con semillas (**Fig. 27**). Además, las plantas permanecían en estado de floración de forma casi indefinida, a diferencia de la línea silvestre. Sin embargo, todas las plantas T₁ y T₂ resultantes de la transformación con el vector de transformación vacío, presentan un fenotipo similar a la línea silvestre.

Las plantas T₁ 35S::*PsMAPK2-LOF* presentaban un fenotipo severo de esterilidad masculina en heterocigosis y sólo fue posible obtener una línea homocigota. En el caso de las plantas T₁ 35S::*PsMAPK2-GOF*, las distintas líneas no presentaban un fenotipo tan severo en heterocigosis, haciendo posible la autofecundación y posterior obtención de líneas homocigotas.

Comparando las flores de plantas 35S::*PsMAPK2-GOF*, 35S::*PsMAPK2-LOF* y Col(0) de igual edad, se observó que en las anteras de las plantas transgénicas no se produce la dehiscencia, y sí en las anteras de plantas control (**Fig. 28A y 28B**). Los cortes transversales de las anteras de las plantas 35S::*PsMAPK2-GOF* y 35S::*PsMAPK2-LOF* mostraron que contienen polen en su interior (**Fig. 28B**). Estos resultados indican que estas plantas presentan esterilidad masculina al no poder liberarse el polen del interior de las anteras.

Se analizaron las anteras de plantas transformadas con el vector de transformación pCHF3, observándose que las anteras de flores de estas plantas presentan una dehiscencia similar a la que presenta la línea silvestre (**Fig. 28C**).



Figura 27. Fenotipo de las plantas 35S::PsMAPK2-GOF. Tallo principal de una planta 35S::PsMAPK2-GOF y control. La mayoría de las silicuas de la planta 35S::PsMAPK2-GOF no están desarrolladas y no contienen semillas.

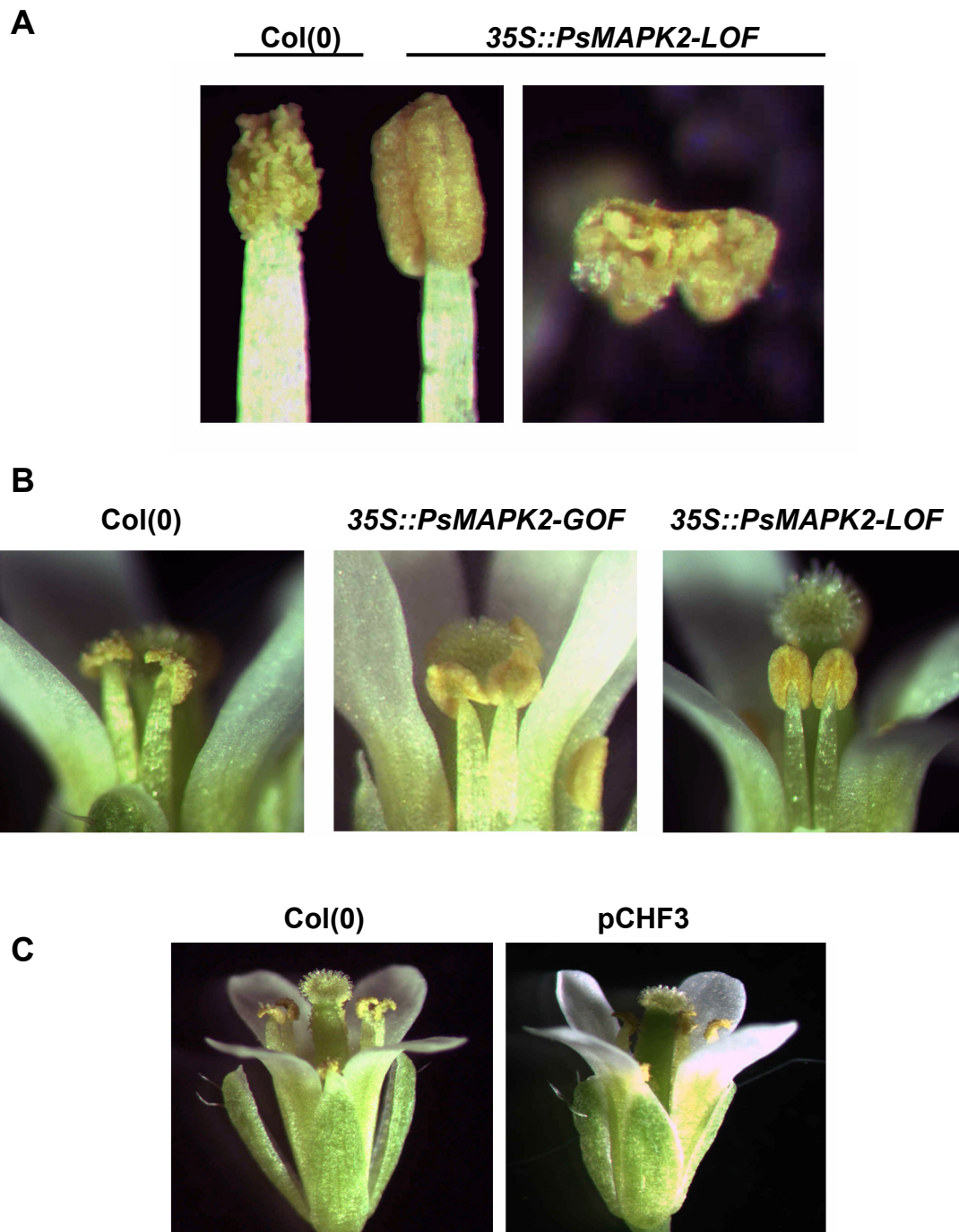


Figura 28. Fenotipo de las plantas 35S::PsMAPK2-GOF y 35S::PsMAPK2-LOF. A. Detalle de las anteras de plantas control (dehiscente) y 35S::PsMAPK2-LOF (no dehiscente). **B.** Detalle de una flor control que presenta las anteras dehiscentes, y de flores 35S::PsMAPK2-GOF y 35S::PsMAPK2-LOF con las anteras no dehiscentes. **C.** Flores de plantas control (Col(0)) y de plantas transformadas con el vector pCHF3.

Como se ha mencionado en el apartado 1.2.2 de Resultados, debido al fenotipo de esterilidad obtenido en las plantas *35S::PsMAPK2-LOF*, se realizaron cruces con polen de flores control para poder obtener frutos con semillas y no perder las líneas. Los cruces de flores *35S::PsMAPK2-LOF* con el polen control dan lugar a silicuas desarrolladas con semillas, indicando que estas líneas no presentan esterilidad femenina (**Fig. 29**). De igual modo se hicieron cruces inversos con el polen de flores *35S::PsMAPK2-LOF* sobre flores de plantas silvestres, dando lugar a frutos con semillas, indicando la viabilidad del polen de estas plantas.



Figura 29. Cruce de una planta *35S::PsMAPK2-LOF* con polen de una línea silvestre. Las flechas blancas señalan silicuas con semillas obtenidas tras la realización de cruces de flores de plantas *35S::PsMAPK2-LOF* con polen control.

El ácido jasmónico (JA) tiene un papel esencial en el desarrollo de las anteras. Mutantes en la biosíntesis de JA (Ishiguro *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi *et al.*, 2001) o insensibles a JA (Feys *et al.*, 1994) tienen alterada la dehiscencia de las anteras. Además, la aplicación exógena de JA en las flores de mutantes de síntesis de JA revierte el fenotipo de esterilidad en estos mutantes (Ishiguro *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002). Como el fenotipo observado en las plantas que expresan las distintas versiones de PsMAPK2 es similar al de los mutantes de síntesis de JA, se testó si la aplicación exógena de JA podría revertir el

fenotipo de esterilidad observado en las plantas que expresan PsMAPK2-GOF y PsMAPK2-LOF. Como se observa en la **Figura 30**, el tratamiento con JA y MeJA no recupera el fenotipo de esterilidad observado en las líneas *35S::PsMAPK2-LOF*. Se obtuvieron resultados idénticos para la las líneas *35S::PsMAPK2-GOF* (datos no mostrados). Estos resultados sugirieren que estos mutantes no son deficientes en la síntesis de JA.

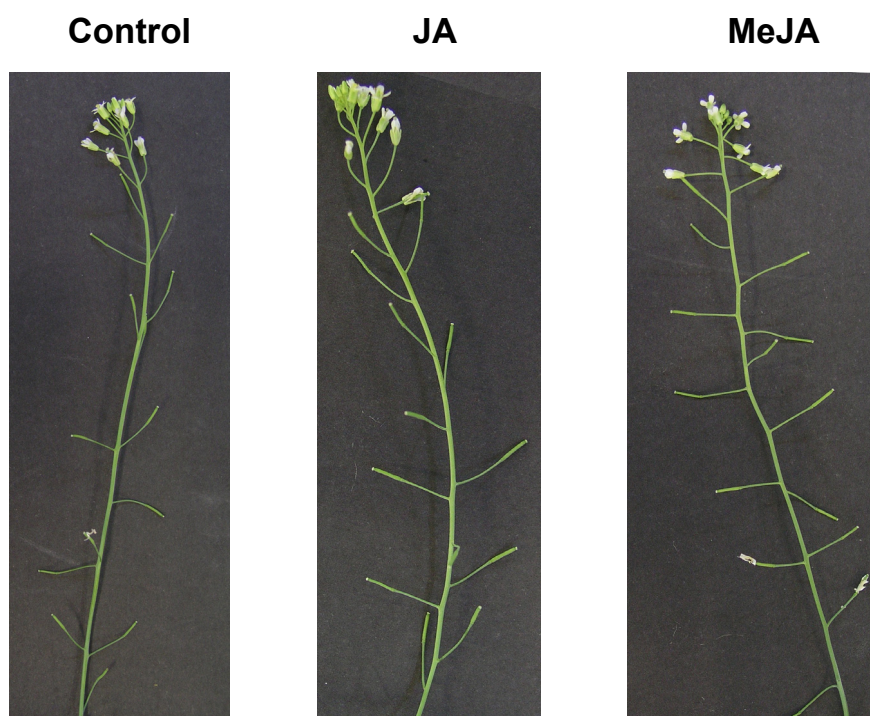


Figura 30. Los jasmonatos no revierten el fenotipo de esterilidad de las plantas *35S::PsMAPK2-LOF*. Detalle del tallo principal de plantas *35S::PsMAPK2-LOF* tratadas con: MeJA 1 mM (en Tween-20 0.05%, DMSO 0.2%), JA 0.5 mM (en Tween-20 0.05%, N,N,-dimetilformamida 0.05%) o con una solución control (Tween-20 0.05%, N,N,-dimetilformamida 0.05%) (ver apartado 1.1.2.2 de Material y Métodos).

1.3 Activación de PsMAPK2

1.3.1 Activación por daño mecánico

Como se ha mencionado en la Introducción, actualmente está muy establecido el papel central que juegan las MAPKs de plantas en la regulación de mecanismos de defensa. Varias rutas de MAPKs son activadas por más de un tipo de estrés biótico y abiótico, sugiriendo que las cascadas de MAPKs actúan como puntos de convergencia en la señalización del estrés (**Fig. 7**). La función de las MAPKs del subgrupo C1 no se conoce aunque existen indicios de su posible participación en la respuesta a estrés (Mizoguchi *et al.*, 1996; Vogel, 2005). Por ello, en este trabajo se procedió a evaluar el efecto de la herida y diversas moléculas señalizadoras de estrés sobre la actividad de PsMAPK2.

Con objeto de conocer si la herida afectaba a la actividad de PsMAPK2, se dañaron de forma mecánica hojas de roseta de plantas crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos). El ensayo de daño se realizó en plantas de 4 semanas de *A. thaliana* que expresaban la versión silvestre de PsMAPK2 (línea K2-10, ver apartado 1.2.3 de Resultados). Como controles se utilizaron plantas de 4 semanas de la línea silvestre (Col(0)), de una línea que expresa la versión negativa de PsMAPK2 (línea LOF-12, ver apartado 1.2.2 de Resultados) y de una línea que expresa el vector de transformación de plantas vacío (línea pCHF3-3, ver apartado 1.2.4 de Resultados). A partir de las hojas de roseta dañadas se obtuvo un extracto crudo de proteínas, y se inmunoprecipitó PsMAPK2 con el anticuerpo anti-PsMAPK2 (ver apartado 1.2 de Resultados). Posteriormente se midió la actividad proteín quinasa en los inmunoprecipitados, utilizando como sustrato la proteína básica de mielina (PBM) (ver apartado 7.2 de Material y Métodos).

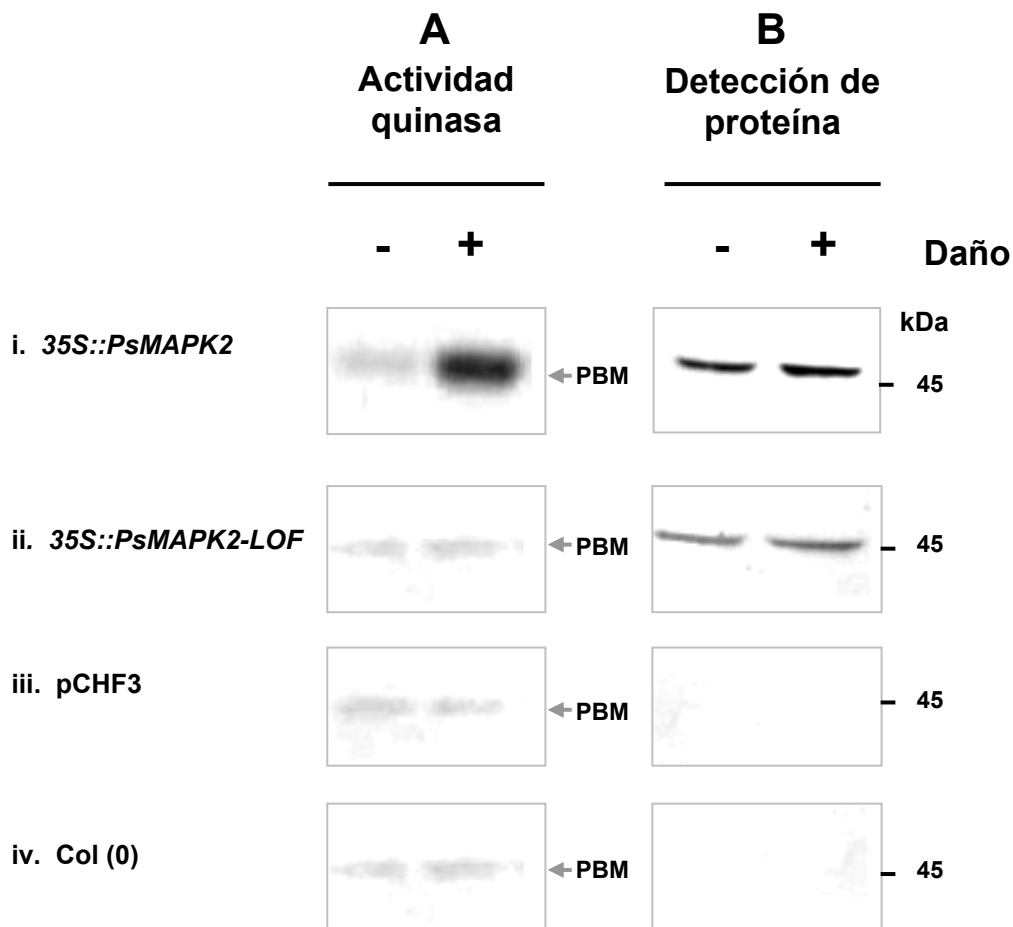


Figura 31. Activación de PsMAPK2 por daño mecánico. Hojas de plantas de *Arabidopsis* crecidas en tierra durante 4 semanas de las líneas: (i) *35S::PsMAPK2* (para el ensayo se utilizó la línea homocigota K2-10, ver apartado 1.2.3 de Resultados), (ii) *35S::PsMAPK2-LOF* (para el ensayo se utilizó la línea LOF-12, ver apartado 1.2.2 de Resultados), (iii) *pCHF3* (para el ensayo se utilizó la línea homocigota *pCHF3-3*, ver apartado 1.2.4 de Resultados) y (iv) línea silvestre, fueron dañadas tal y como se describe en el apartado 1.1.2.1 de Material y Métodos. **A.** 200 μ g de proteínas de extracto crudo de hojas de roseta no dañadas (-) y dañadas recogidas a la hora del daño (+) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-PsMAPK2. Posteriormente se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. **B.** 25 μ g de proteínas de extracto crudo utilizado para la medida de actividad se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con el anticuerpo primario anti-HA. Los marcadores se muestran a la derecha de la figura.

Cuando se compara la actividad quinasa de PsMAPK2 en hojas dañadas de la línea *35S::PsMAPK2*, con las no dañadas (**Fig. 31i, A**), se observó que tras el daño mecánico se produce un aumento de la actividad quinasa de PsMAPK2. Este aumento no se observa cuando se utilizan plantas de una línea *35S::PsMAPK2-LOF* que expresan la versión negativa de PsMAPK2 que tiene alterada el sitio de unión del ATP y, por tanto, inhibida su actividad quinasa. (**Fig. 31ii, A**). No se detectaron cambios en la actividad quinasa de PsMAPK2 en los tres controles realizados (las líneas *35S::PsMAPK2-LOF*, *pCHF3* y *Col(0)*) (**Fig. 31A**). Además, estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-PsMAPK2 es específico de PsMAPK2 y no reconoce a las MAPKs de *A. thaliana* del subgrupo C1. Los niveles de la proteína PsMAPK2 en las distintas plantas se muestran en la **Figura 31B**.

1.3.2 Activación por JA

Como se ha mencionado en la Introducción, el JA es una de las hormonas que tiene una función esencial en la señalización del daño (Rojo *et al.*, 2003). Tras el daño, los niveles endógenos de JA son más altos debido a un aumento de su biosíntesis. Este incremento en los niveles de JA es el responsable de la activación de una serie de genes de respuesta al daño JA-dependientes, que se caracterizan porque su expresión también está regulada por JA cuando se aplica exógenamente a plantas no dañadas (Titarenko *et al.*, 1997). Por ello, se analizó el efecto que tiene el JA sobre la actividad de PsMAPK2. Se trataron hojas de plantas de *Arabidopsis 35S::PsMAPK2* con JA 100 μ M y se midió la actividad quinasa de esta proteína. La actividad quinasa de PsMAPK2 aumenta tras el tratamiento con JA (**Fig. 32**). En la **Figura 32B** se muestran los niveles de expresión de la proteína PsMAPK2 en estas plantas. No se observaron cambios

significativos en la actividad quinasa de PsMAPK2 cuando las plantas eran tratadas con una solución control (ver Material y Métodos) (resultados no mostrados).

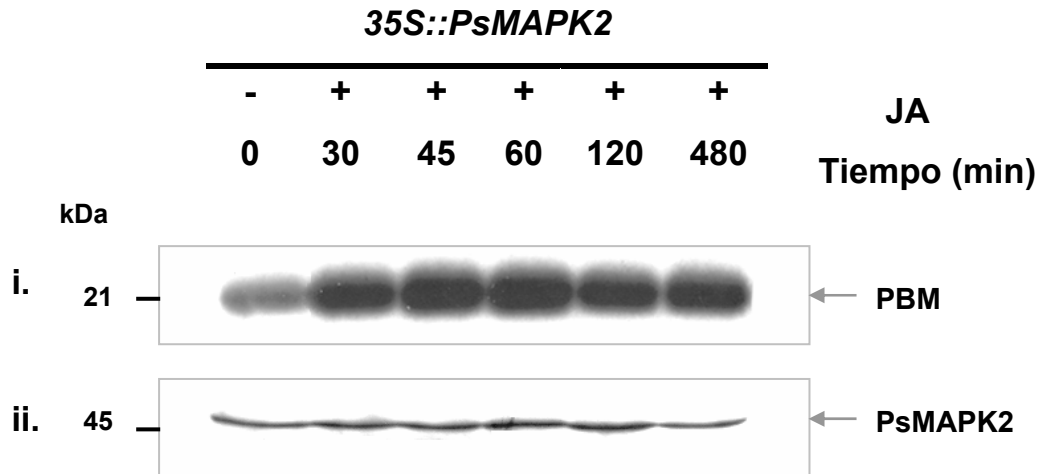


Figura 32. Activación de PsMAPK2 por JA. Plantas de 4 semanas crecidas en tierra de la línea 35S::PsMAPK2 (para el ensayo se utilizó la línea homocigota K2-10, ver apartado 1.2.3 de Resultados) fueron tratadas con JA 100 μ M en Tween-20 0.01%, etanol 0.05% (JA) (apartado 1.1.2.2 de Material y Métodos). i. 200 μ g de proteínas del extracto crudo de hojas recogidas a 0, 30, 45, 60, 120 y 480 minutos tras el tratamiento se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-PsMAPK2. Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. ii. 25 μ g de proteínas de extracto crudo utilizado para la medida de actividad se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con el anticuerpo primario anti-HA. Los marcadores se muestran a la izquierda de la figura.

1.3.3 Activación por ABA y H₂O₂

Aunque los jasmonatos juegan un papel muy importante en la ruta de señalización de daño, otras moléculas, como el ABA y ROS, y otros procesos físicos, como el estrés hídrico y los impulsos eléctricos, se han relacionado con la respuesta a daño (León *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2006). Datos recientes sugieren que la señalización del daño no tiene lugar a través de una única vía, sino que es resultado de la interacción de varias rutas (Fig. 7 y 9).

Para estudiar el efecto que tiene el ABA sobre la actividad de PsMAPK2, se trataron hojas de plantas de *Arabidopsis 35S::PsMAPK2* con ABA 100 μ M y se midió la actividad quinasa de esta proteína. La actividad quinasa de PsMAPK2 aumenta de forma transitoria tras el tratamiento con ABA, alcanzando un máximo a las dos horas del tratamiento (**Fig. 33A, i**). Los niveles de la proteína PsMAPK2 en estas plantas se muestran en la **Figura 33A, ii**. No se observaron cambios significativos en la actividad quinasa de PsMAPK2 cuando las plantas eran tratadas con una solución control (ver Material y Métodos) (resultados no mostrados).

Para estudiar si el H₂O₂ tiene algún efecto sobre la actividad de PsMAPK2, se trataron hojas de plantas de *Arabidopsis 35S::PsMAPK2* con H₂O₂ 5 mM y se midió la actividad quinasa de esta MAP quinasa. La actividad quinasa de PsMAPK2 aumenta de forma transitoria tras el tratamiento con H₂O₂ (**Fig. 33B, i**). Los niveles de expresión de la proteína PsMAPK2 en estas plantas se muestran en la **Figura 33B, ii**. No se observaron cambios significativos en la actividad quinasa de PsMAPK2 cuando las plantas eran tratadas con una solución control (ver Material y Métodos) (resultados no mostrados).

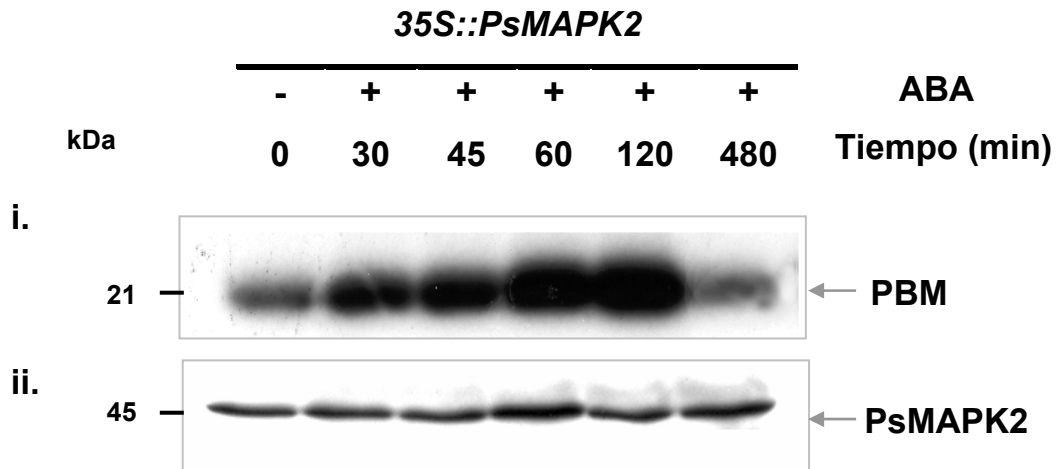
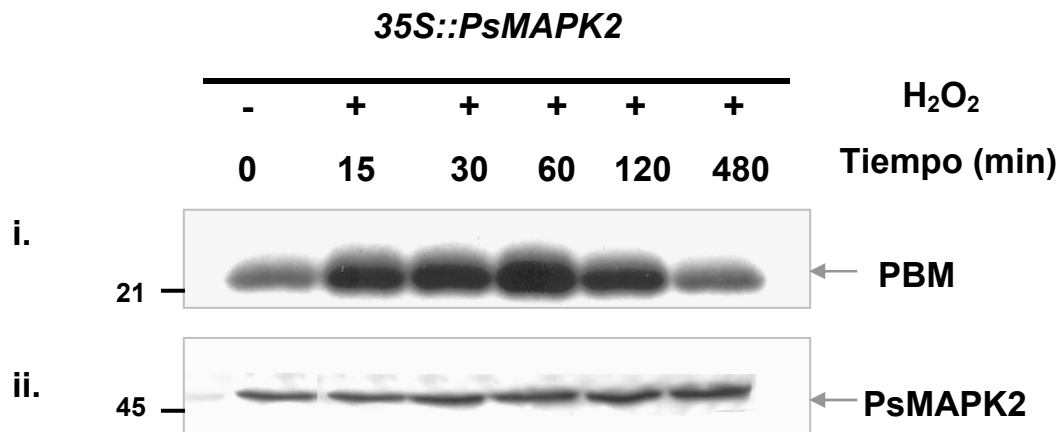
A**B**

Figura 33. Activación de PsMAPK2 por ABA y H₂O₂. Plantas de 4 semanas crecidas en tierra de la línea *35S::PsMAPK2* (para el ensayo se utilizó la línea homocigota K2-10, ver apartado 1.2.3 de Resultados) fueron tratadas con ABA 100 μ M en Tween-20 0.01%, etanol 0.05% (ABA) (**A**) o con H₂O₂ 5 mM (H₂O₂) (**B**) (ver Material y Métodos). i. 200 μ g de proteínas del extracto crudo de hojas recogidas a distintos tiempos tras el tratamiento se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-PsMAPK2. Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. ii. 25 μ g de proteínas de extracto crudo utilizado para la medida de actividad se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB con el anticuerpo primario anti-HA. Los marcadores se muestran a la izquierda de la figura.

Apartado 2

Caracterización de AtMPK1 y AtMPK2, MAPKs de Arabidopsis

2.1 Expresión de AtMPK1 y AtMPK2 en Arabidopsis thaliana

2.1.1 Regulación de la expresión de AtMPK1 y AtMPK2 por luz

2.1.1.1 Respuesta a la luz de plántulas etioladas del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

2.2 Activación de AtMPK1 y AtMPK2

2.2.1 Activación por daño mecánico

2.2.2 Activación por JA

2.2.2.1 Análisis de la respuesta al daño JA-dependiente COI1- dependiente en los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* y en el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

2.2.2.2 Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño mecánico en *coi1*

2.2.3 Activación por ABA y H₂O₂

2.1 Expresión de AtMPK1 y AtMPK2 en A. thaliana

Con el fin de conocer la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col), se realizaron análisis mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando cebadores específicos para *AtMPK1* y *AtMPK2*, de distintos órganos de planta adulta. Como gen de referencia se utilizó *Actina-7* (Colcombet *et al.*, 2005). *AtMPK1* y *AtMPK2* se expresan en todos los órganos testados (raíz, hojas de roseta, tallos, silicuas, flores, carpelos y anteras), y aunque los niveles de ambas MAPKs varían según el tipo de

tejido, tanto *AtMPK1* como *AtMPK2* se expresan principalmente en raíz (Fig. 34).

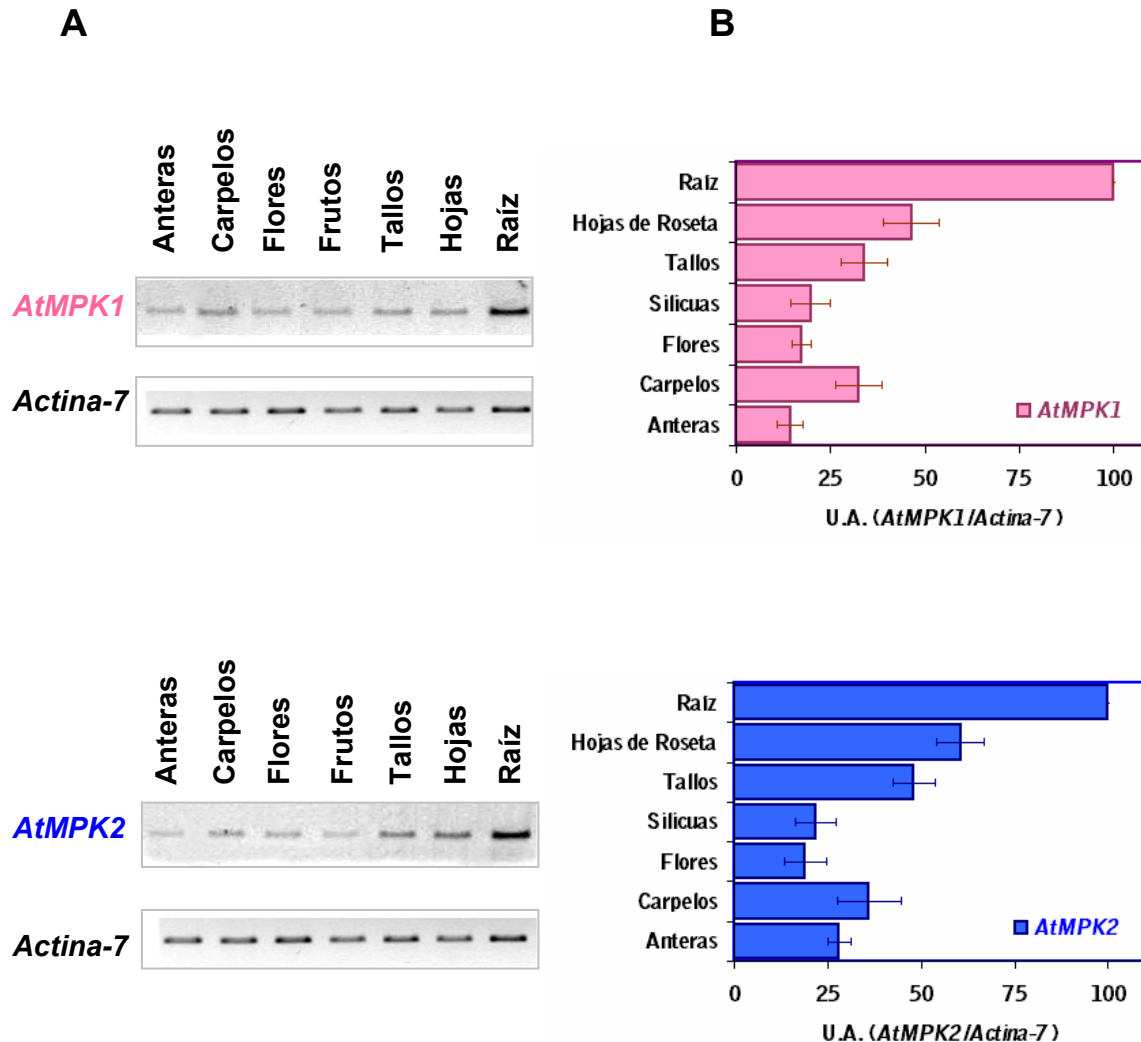


Figura 34. Expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en planta adulta de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col).A. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó ARN total de distintos órganos de plantas de *Arabidopsis* crecidas en tierra durante 25 días. En la PCR se utilizaron los cebadores *AtMPK15* y *AtMPK13*, específicos para *AtMPK1*, y *AtMPK25* y *AtMPK23*, específicos para *AtMPK2*. Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *Actina-7*. Las PCRs se realizaron como se describe en Material y Métodos y se utilizaron 27, 25 y 20 ciclos para la amplificación de los fragmentos de *AtMPK1*, *AtMPK2* y *Actina-7*, respectivamente. **B.** Cuantificación de la intensidad de las bandas de los fragmentos de *AtMPK1* y *AtMPK2* obtenidas en seis reacciones de PCR (como A) diferentes a partir de tres RTs independientes, normalizadas con respecto a la intensidad de las bandas del fragmento de *Actina-7* y considerándose la intensidad relativa obtenida en raíz como 100%. Se presentan los valores medios \pm SEM.

2.1.1 Regulación de la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* por LUZ

De las bases de datos de análisis de micromatrices del Arabidopsis Functional Genomics Consortium (AFGC) y del GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004) se deduce que los niveles de expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* son bajos y no sufren grandes cambios tras diferentes tratamientos hormonales y de estrés. De estas bases de datos se deduce también que los niveles de expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* podrían estar regulados por luz. Se han observado diferentes niveles de expresión de estas MAP quinasas durante las fases de luz y oscuridad del fotoperiodo, así como en plantas etioladas tras ser transferidas a luz. Además, resultados publicados de análisis de micromatrices indican que la expresión de *AtMPK1* es mayor en plántulas crecidas en oscuridad que en plántulas crecidas en presencia de luz (Ma *et al.*, 2005).

Con el fin de conocer los posibles cambios de expresión de *AtMPK1* y de *AtMPK2* con la luz, se analizó la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en un ciclo de luz/oscuridad durante 24 horas. Para ello se hicieron crecer plántulas de *Arabidopsis* en placas Petri, con un fotoperiodo 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, durante 12 días. Transcurridos los 12 días, se tomaron muestras cada 4 horas, durante un periodo de 24 horas. Mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando cebadores específicos para *AtMPK1* y *AtMPK2*, se calcularon los niveles de ARNm para cada punto (**Fig. 35**). Los niveles de ARNm, tanto de *AtMPK1* como de *AtMPK2*, disminuyen a la mitad a las 4 horas del comienzo de la fase de luz del fotoperiodo y vuelven a aumentar a lo largo de la fase de oscuridad del fotoperiodo.

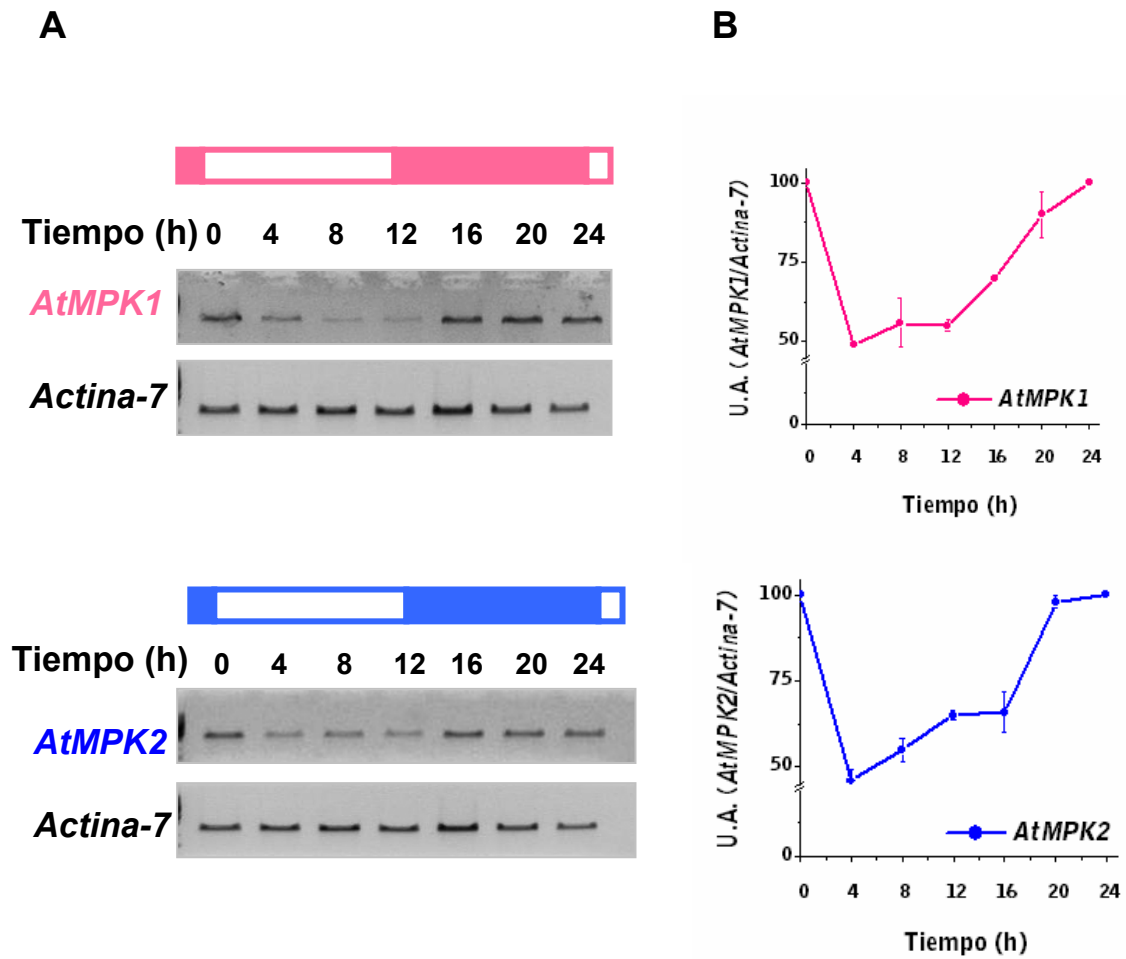


Figura 35. Expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en un ciclo de luz/oscuridad. **A.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó ARN total de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en placas Petri con medio de cultivo MS durante 12 días y se tomaron muestras cada 4 horas durante 24 horas. En la PCR se utilizaron los cebadores *AtMPK15* y *AtMPK13*, específicos para *AtMPK1*, y *AtMPK25* y *AtMPK23*, específicos para *AtMPK2*. Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *Actina-7*. Las PCRs se realizaron como se describe en Material y Métodos y se utilizaron 27, 25 y 20 ciclos para la amplificación de los fragmentos de *AtMPK1*, *AtMPK2* y *Actina-7*, respectivamente. Las barras rosas/azules indican la fase de oscuridad y las barras blancas la fase de luz del fotoperiodo. **B.** Cuantificación de la intensidad de las bandas de los fragmentos de *AtMPK1* y *AtMPK2* obtenidas en seis PCRs realizadas de dos experimentos independientes, normalizadas con respecto a la intensidad de las bandas del fragmento de *Actina-7* y considerándose la intensidad relativa obtenida a tiempo cero como 100%. Se presentan los valores medios \pm SEM.

Estos resultados indican que la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* está regulada por luz pero no puede descartarse una regulación por el ritmo circadiano. Para estudiar una posible regulación por el ritmo circadiano, se analizaron los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* en plántulas crecidas con un fotoperiodo 12 horas de luz/12 horas de oscuridad después de ser transferidas a luz continua. Los resultados obtenidos indican que tras la transferencia a luz continua no se produce variación en los niveles de ARNm tanto de *AtMPK1* como de *AtMPK2* (**Fig. 36**), sugiriendo que la expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* no está regulada por el ritmo circadiano, y que su regulación es debida a la luz.

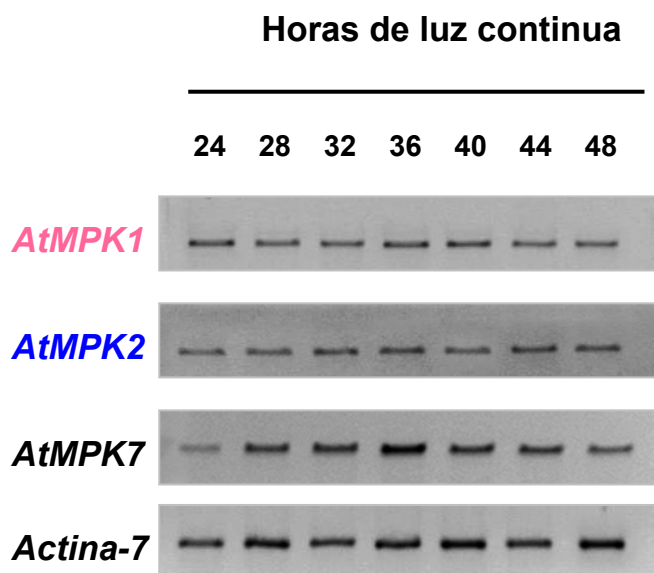
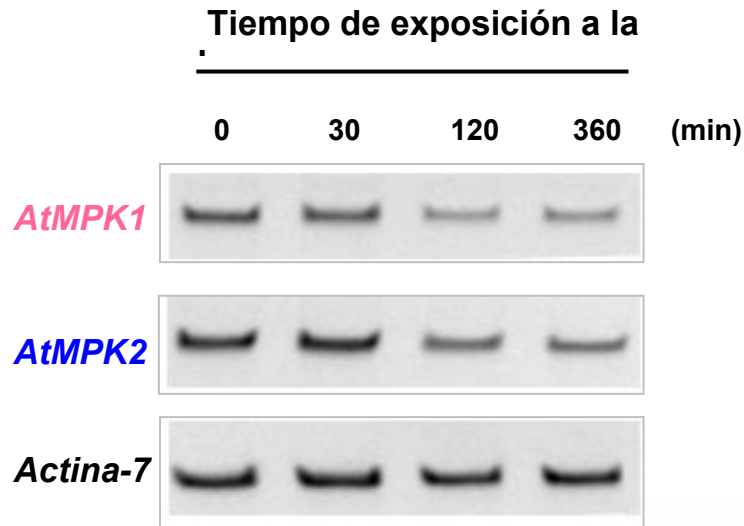


Figura 36. Expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en condiciones de luz continua. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó ARN total de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en placas Petri con MS durante 12 días con un fotoperiodo 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El decimotercer día las plantas se transfirieron a una cámara de cultivo con luz continua y se recogieron muestras durante las 24 horas del día catorce. En la PCR se utilizaron los cebadores *AtMPK15* y *AtMPK13*, específicos para *AtMPK1*, y los cebadores *AtMPK25* y *AtMPK23*, específicos para *AtMPK2*. Se utilizaron también los cebadores *AtMPK75* y *AtMPK73* específicos de una MAP quinasa de *Arabidopsis* regulada por el ritmo circadiano (*AtMPK7*) (Ichimura, 2002). Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *Actina-7*. Las PCRs se realizaron como se describe en Material y Métodos y se utilizaron 27, 25, 27 y 20 ciclos para la amplificación de los fragmentos de *AtMPK1*, *AtMPK2*, *AtMPK7* y *Actina-7*, respectivamente.

Se observó el mismo tipo de regulación por luz en plántulas crecidas en oscuridad (etioladas) cuando se transfieren a la luz. Los niveles de ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* disminuyen en plántulas etioladas cuando se transfieren a la luz (**Fig. 37**).

A



B

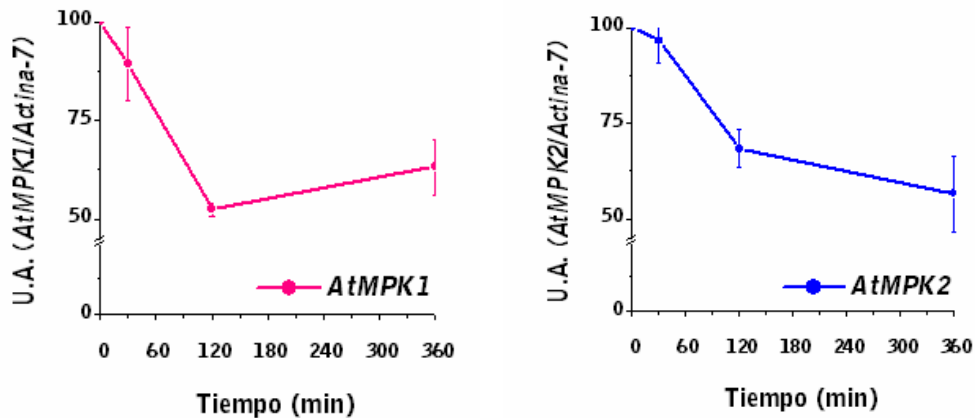


Figura 37. Expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en plántulas etioladas transferidas a luz. **A.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó ARN total de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en placas Petri conteniendo MS durante 4 días en oscuridad y transferidas a la luz (fotoperiodo: 16 h luz y 8 h oscuridad). En la PCR se utilizaron los cebadores *AtMPK15* y *AtMPK13*, específicos para *AtMPK1* y los cebadores *AtMPK25* y *AtMPK23*, específicos para *AtMPK2*. Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *Actina-7*. Las PCRs se realizaron como se describe en Material y Métodos y se utilizaron 27, 25 y 20 ciclos para la amplificación de los fragmentos de *AtMPK1*, *AtMPK2* y *Actina-7*, respectivamente. **B.** Cuantificación de la intensidad de las bandas de los fragmentos de *AtMPK1* y *AtMPK2* obtenidas en tres reacciones de PCR diferentes de dos RTs independientes, normalizadas con respecto a la intensidad de las bandas del fragmento de *Actina-7*, y considerándose la intensidad relativa obtenida a tiempo cero como 100%. Se presentan los valores medios \pm SEM.

2.1.1.1 Respuesta a la luz de plántulas etioladas del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* aumentan en la fase de oscuridad del fotoperiodo y disminuyen en plántulas crecidas en oscuridad (etioladas) cuando se transfieren a la luz. Las plántulas etioladas de *Arabidopsis*, cuando se transfieren a la luz, sufren inmediatamente una transición, denominada desetiolización, hacia el patrón fotomorfogénico de las plantas verdes. Esta transición es un proceso muy complejo que se inicia por la luz e implica una inhibición de la elongación de las células del hipocotilo, un desplegamiento del gancho apical y una estimulación de la expansión de las células del cotiledón.

Con el objeto de conocer el efecto que producía la supresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* en el desarrollo de plantas crecidas en oscuridad (etioladas) y en el proceso de desetiolización, se sembraron en placas Petri semillas de la línea silvestre, de los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2*, y del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* (ver apartado 1.1 de Material y Métodos) que se dejaron crecer 4 días en oscuridad, para luego ser transferidas a la luz. No se observaron diferencias significativas en el desarrollo de las plántulas etioladas en los mutantes simples. Sin embargo, cuando las plántulas etioladas se transfieren a la luz, un 40% de las plántulas de los mutantes simples presentan los cotiledones cerrados y sin coloración verde, frente al 10% de las plántulas de la línea silvestre (F. Calatayud, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2005). Las plántulas etioladas del doble mutante presentan una ligera disminución en la longitud del hipocotilo y cuando se transfieren a la luz se observa que, al igual que las plántulas de los mutantes simples, un 40% de las plántulas presentan los cotiledones cerrados y sin coloración verde. Además, las plántulas del doble mutante

desetioladas presentan una menor expansión y coloración verde en los cotiledones que las plántulas de la línea silvestre (**Fig. 38**).

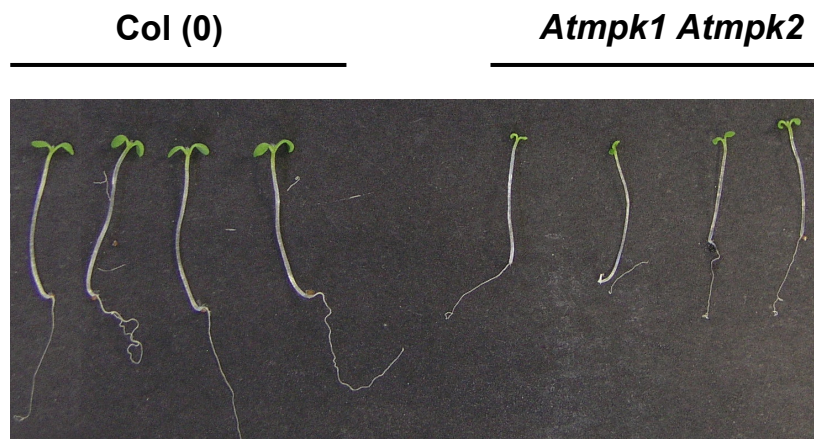


Figura 38. Respuesta a la luz de plántulas etioladas de las líneas silvestre y del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*. Plántulas de las líneas silvestre (*Col*) y *Atmpk1 Atmpk2* crecidas en placas Petri conteniendo MS durante 4 días en oscuridad y transferidas a luz (fotoperiodo: 16 h luz y 8 h oscuridad) durante 4 días.

2.2 Activación de AtMPK1 y AtMPK2

2.2.1 Activación por daño mecánico

AtMPK1 y AtMPK2 se encuentran dentro del subgrupo C1 de MAPKs de plantas, al igual que PsMAPK2. Como se ha descrito en el apartado 1 de Resultados, el daño mecánico induce la activación de PsMAPK2 en plantas de *A. thaliana* que expresan de forma constitutiva PsMAPK2. Con el fin de estudiar si AtMPK1 y AtMPK2 participan en la respuesta al daño mecánico en *Arabidopsis*, se analizó la actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 después de la herida.

Para poder medir la actividad quinasa específica de AtMPK1 y AtMPK2, se generaron anticuerpos anti-péptido contra el extremo C-terminal de cada proteína (ver apto 6.3 de Material y Métodos) (**Fig. 39**).

AtMPK1-C _t	HYHP QASTL NTEL
AtMPK2-C _t	HYHP EAAT I NNNEVSEF
AtMPK7-C _t	YYHP EAE IS NA
AtMPK14-C _t	HYLP RA
PsMAPK2-C _t	HYHP GSAMG NAEISS

Figura 39. Secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de MAPKs del grupo C. En color se señala la secuencia de los péptidos que se utilizaron para generar los anticuerpos contra AtMPK1 y AtMPK2.

En primer lugar, se testó por análisis Western la especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 generados. Para ello, se utilizaron los mutantes de inserción *Atmpk1* y *Atmpk2*, caracterizados recientemente en nuestro laboratorio (F. Calatayud, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2005) (ver Material y Métodos). Estos mutantes pueden considerarse como mutantes de pérdida de función de *AtMPK1* y *AtMPK2*, respectivamente (ver Material y Métodos).

El análisis Western se realizó a partir de extractos crudos de proteínas de hojas de roseta de plantas de las líneas silvestre, *Atmpk1* y *Atmpk2*. Se utilizaron los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 purificados por afinidad (ver apartado 6.3 de Material y Métodos). El anticuerpo anti-AtMPK1 reacciona muy débilmente con una proteína del extracto crudo de hojas de las plantas de la línea silvestre que tiene una masa molecular de aproximadamente 42 KDa y no del extracto de hojas de la línea *Atmpk1* (la masa molecular estimada para AtMPK1, según la secuencia de aminoácidos, es de alrededor de 42.5 kDa) (**Fig. 40**). Sin embargo, se observa reacción cruzada del anticuerpo anti-AtMPK1 con

otras proteínas de diferente masa molecular. Por otra parte, el anticuerpo anti-AtMPK2 reacciona débilmente con una proteína del extracto crudo de hojas de la plantas de la línea silvestre, que tiene una masa molecular de aproximadamente 43 kDa. Y no reacciona con una proteína del extracto de hojas de la línea *Atmpk2* (la masa molecular estimada para AtMPK2, según la secuencia de aminoácidos, es de alrededor de 43 KDa) (**Fig. 40**). Se observa además reacción cruzada del anticuerpo anti-AtMPK2 con otras proteínas, siendo de forma bastante intensa con una proteína de aproximadamente 55 kDa. Así pues, estos anticuerpos no son de gran utilidad para la detección de AtMPK1 y AtMPK2 por análisis Western. Se han utilizado diferentes órganos y distintos métodos de extracción para la obtención del extracto crudo, con el objeto de mejorar la detección de los niveles de proteína AtMPK1 y AtMPK2 por análisis Western, que no tuvieron éxito, probablemente por la baja expresión de AtMPK1 y AtMPK2.

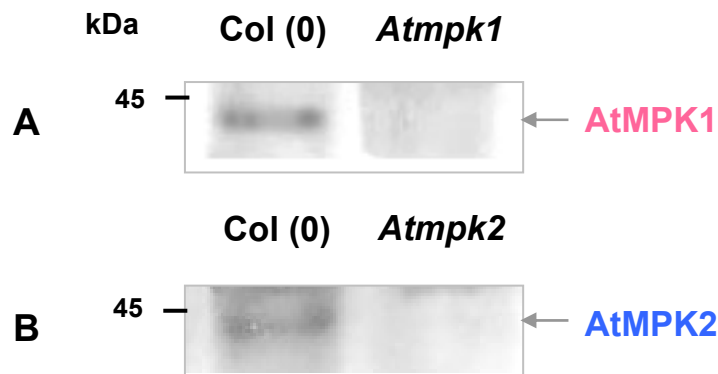


Figura 40. Estudio de la especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 por análisis Western. Plantas de *Arabidopsis* de la línea silvestre (Col(0)), y de los dos mutantes de inserción (*Atmpk1* y *Atmpk2*) se crecieron en tierra durante 12 días. 20 μ g de proteínas de extracto crudo de hojas de roseta fueron separados por SDS-PAGE, y se realizó análisis Western con los anticuerpos anti-AtMPK1 (**A**) y anti-AtMPK2 (**B**). La posición de los marcadores se muestra a la izquierda.

Sin embargo, estos anticuerpos han sido de gran utilidad para la medida de la actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 en inmunoprecipitados (ver apartado 7 de Material y Métodos), debido a que el sistema de detección de la medida de actividad quinasa es más sensible que el análisis Western. Hay varios ejemplos de anticuerpos de proteínas quinasas que no son suficientemente sensibles para análisis Western, y que pueden ser utilizados para medida de actividad quinasa, como por ejemplo anticuerpos contra la MAP quinasa LeMPK3 (Mayrose *et al.*, 2004).

Se realizó un ensayo de medida de actividad proteína quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 en los inmunoprecipitados de extracto de hojas dañadas mecánicamente, utilizando los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2, respectivamente. Comparando las hojas de plantas no dañadas con las dañadas (**Fig. 41**), se observa que la actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 aumenta tras el daño, como se ha descrito anteriormente para PsMAPK2. Se determinó la linealidad del ensayo de medida de actividad quinasa con la cantidad de proteína inmunoprecipitando diferentes cantidades de proteína de extracto crudo con los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2, y midiendo la actividad quinasa. Para el anticuerpo anti-AtMPK1, la linealidad del ensayo se mantiene hasta 200 μg de extracto crudo y para anti-AtMPK2 hasta 800 μg de extracto crudo (**Fig. 41**).

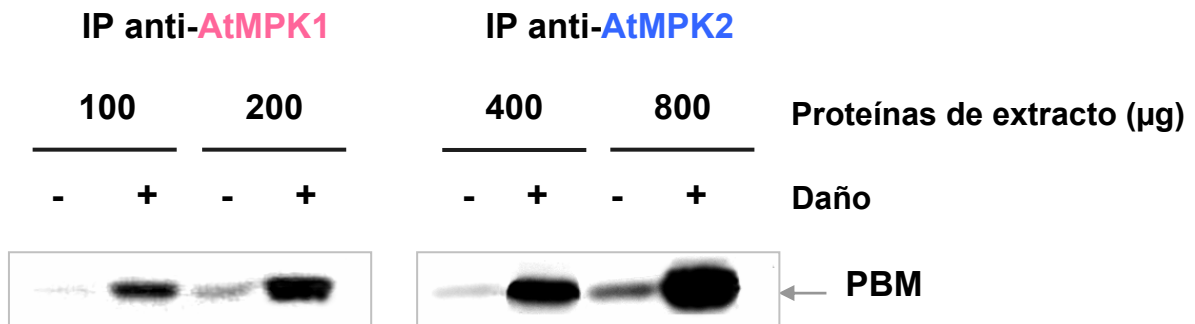


Figura 41. Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño mecánico. Hojas de roseta de plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra fueron dañadas tal y como se describe en el apartado 1.1.2.1 de Material y Métodos. Distintas cantidades de proteínas de extracto crudo de hojas de la línea silvestre no dañadas (-) y dañadas, recogidas a las 2 horas del daño (+), se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2. Posteriormente se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados, según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica.

Para comprobar que la actividad quinasa detectada era específica de AtMPK1 y AtMPK2, se realizó el ensayo de daño en plantas de la línea silvestre y de las líneas *Atmpk1* (que no expresan AtMPK1), *Atmpk2* (que no expresan AtMPK2) y *Atmpk1 Atmpk2* (que no expresan ambas MAP quinasas). Si se compara la actividad quinasa en las hojas de roseta dañadas de la línea silvestre con la de las líneas de los mutantes nulos, se observa la especificidad de los anticuerpos (**Fig. 42**). Cuando se utiliza el anticuerpo anti-AtMPK1 para la inmunoprecipitación, en el mutante simple *Atmpk1* y en el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* no se detecta un aumento de la actividad proteín quinasa tras el daño, mientras que en Col(0) y el mutante *Atmpk2*, que son las líneas que expresan AtMPK1, sí que se detecta un aumento de la actividad (**Fig. 42**). Por otro lado, cuando se inmunoprecipita con el anticuerpo anti-AtMPK2 sólo se detecta un aumento de actividad quinasa en Col(0) y en el mutante *Atmpk1*, que son las líneas

que expresan AtMPK2 (Fig. 42). Estos resultados indican que los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 reconocen de forma específica a AtMPK1 y AtMPK2, respectivamente, y pueden utilizarse para la medida de la actividad quinasa de estas MAP quinasas en inmunoprecipitados.

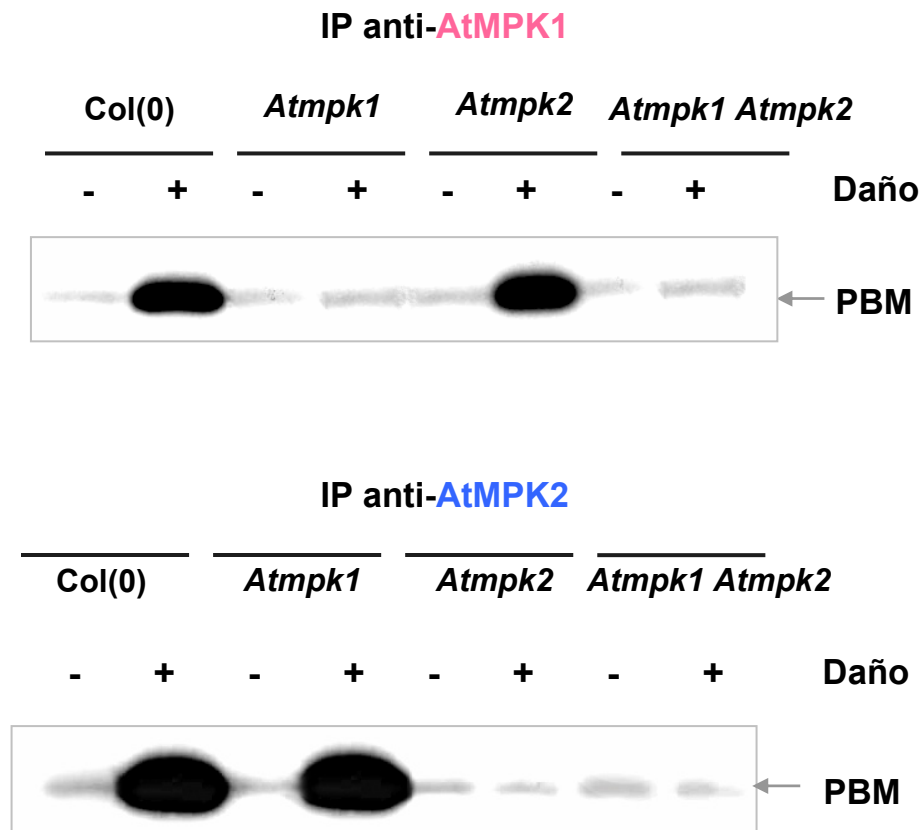


Figura 42. Especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2. Hojas de roseta de plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra fueron dañadas tal y como se describe en el apartado 1.1.2.2 de Material y Métodos. Extractos crudos de proteína de hojas de la línea silvestre y de los mutantes de inserción (*Atmpk1*, *Atmpk2* y *Atmpk1 Atmpk2*) no dañadas (-) y dañadas, recogidas a las 2 horas del daño (+) se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2. Se utilizaron 100 y 400 µg de proteína de extracto crudo para la inmunoprecipitación de AtMPK1 y AtMPK2, respectivamente. Posteriormente se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados, según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica.

Utilizando estos anticuerpos, se determinó la cinética de activación de AtMPK1 y AtMPK2 tras el daño (**Fig. 43**). La actividad de AtMPK1 y AtMPK2 aumenta de forma transitoria tras el daño, presentando un pico de actividad alrededor de las 2 horas (**Fig.43**).

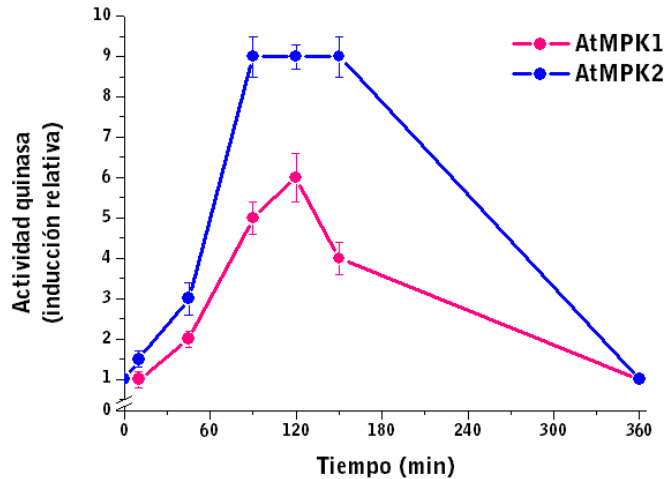


Figura 43. Cinética de activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño mecánico. Extractos crudos de hojas de *Arabidopsis* dañadas a los tiempos indicados y hojas sin dañar (tiempo 0) se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-AtMPK1 (100 μ g de proteína de extracto crudo) y anti-AtMPK2 (800 μ g de proteína de extracto crudo). Posteriormente se realizó el ensayo de actividad quinasa según se describe en el apartado 7.1 de Material y Métodos. La PBM fosforilada (pPBM) se detectó utilizando un anticuerpo contra pPBM mediante análisis Western. La actividad quinasa se expresa como número de veces que se induce con respecto al tiempo 0 (ver Material y Métodos). Se presentan los valores medios \pm SEM.

2.2.2 Activación por JA

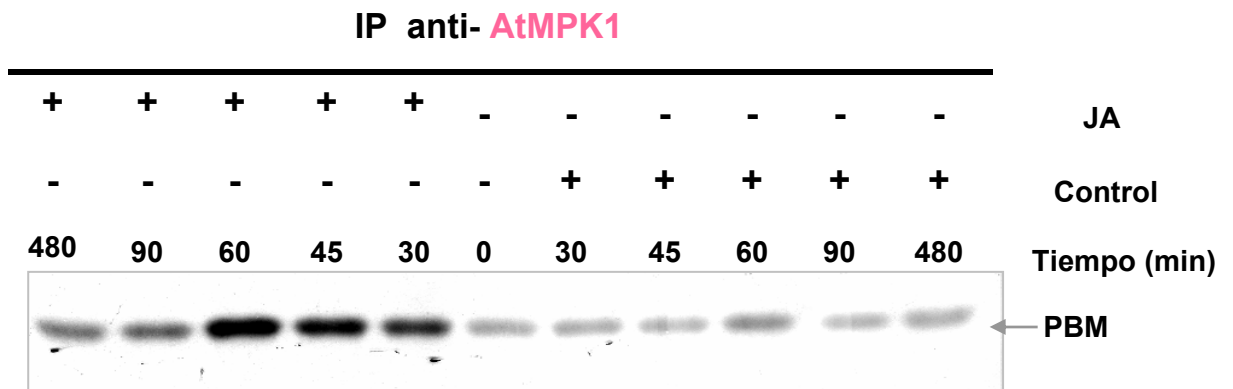
Como se ha mencionado anteriormente, el JA es una de las hormonas que tiene una función esencial en la señalización del daño (Rojo *et al.*, 2003). Tras el daño, los niveles endógenos de JA son más altos debido a un aumento de su biosíntesis. Este incremento en los niveles de JA es el responsable de la activación de una serie de genes de respuesta al daño JA-dependientes, que se caracterizan porque su expresión también está regulada por JA cuando se aplica exógenamente a plantas no dañadas. En *Arabidopsis*, la síntesis de JA inducida por daño alcanza el

máximo alrededor de los 90 min y tiene una cinética muy similar a la de activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño (Stenzel *et al.*, 2003; Stintzi *et al.*, 2001). Por ello, se analizó el efecto que tiene el JA sobre la actividad de AtMPK1 y AtMPK2. Se trataron hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* con JA 100 μ M y se midió la actividad quinasa de estas proteínas. La actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 aumenta de forma transitoria tras el tratamiento con JA, alcanzando un máximo a la hora del tratamiento (**Fig. 44 y 45**). El tratamiento con una solución control activó ligeramente a AtMPK1 y AtMPK2, pero a niveles más bajos que la solución de JA (**Fig. 44 y 45**). No se detectó un aumento de actividad en las hojas de los mutantes de inserción tratadas con JA (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que estas MAP quinasas podrían estar implicadas en una ruta JA-dependiente de respuesta al daño.

2.2.2.1 Análisis de la respuesta al daño JA-dependiente COI1-dependiente en los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* y en el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*

En *A. thaliana*, algunas de las respuestas JA-dependientes requieren del gen *COI1* (Benedetti *et al.*, 1995; Feys *et al.*, 1994). Para estudiar la posible implicación de estas MAP quinasas en la ruta de señalización del daño dependiente de JA vía *COI1*, se analizó la expresión de algunos genes marcadores de esta ruta como *AtLOX2*, *AtAOS* y *AtVSP2* (Benedetti *et al.*, 1995; Farmer & Ryan, 1990; Lorenzo *et al.*, 2004; Titarenko *et al.*, 1997) en los mutantes de inserción de T-DNA simples de *AtMPK1* y *AtMPK2* y en el doble mutante tras la herida. En la **Figura 46** se observa que estos genes se inducen tras el daño tanto en la línea silvestre como en las líneas mutantes. De estos resultados se deduce que la actividad de estas MAP quinasas no parece ser esencial para la señalización del daño a través de la ruta de JA-dependiente *COI1*-dependiente.

A



B

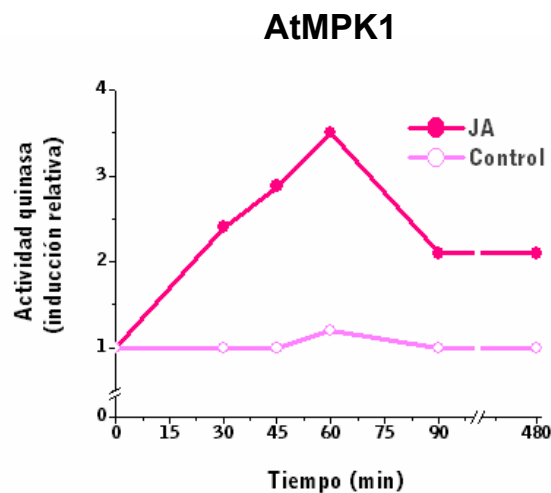
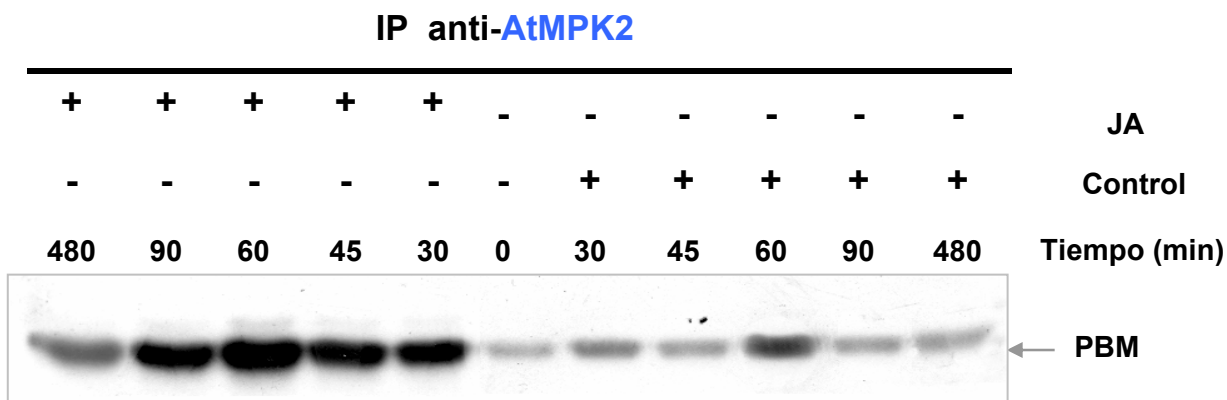


Figura 44. Activación de AtMPK1 por JA. **A.** Plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos) fueron tratadas con JA 100 μ M en etanol 0.05%, Tween-20 0.01% y con una solución control (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%) tal y como se especifica en el apartado 1.1.2.2 de Material y Métodos. 100 μ g de proteínas del extracto crudo de hojas, recogidas a 0, 30, 45, 60, 90 y 480 minutos tras el tratamiento, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-AtMPK1. Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados, según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. **B.** Cuantificación de los niveles de actividad quinasa de AtMPK1 detectados en A (ver Material y Métodos). Los resultados están expresados en número de veces que se induce la actividad respecto al tiempo cero (sin tratar).

A



B

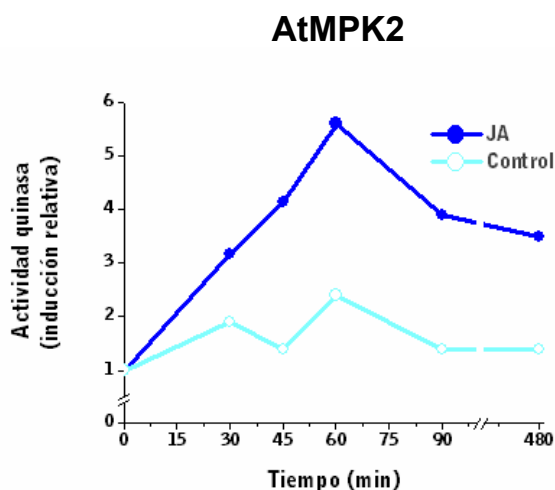


Figura 45. Activación de AtMPK2 por JA. **A.** Plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos) fueron tratadas con JA 100 μ M en etanol 0.05%, Tween-20 0.01% y con una solución control (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%) tal y como se especifica en el apartado 1.1.2.2 de Material y Métodos. 500 μ g de proteínas del extracto crudo de hojas, recogidas a 0, 30, 45, 60, 90 y 480 minutos tras el tratamiento, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-AtMPK2. Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados, según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. **B.** Cuantificación de los niveles de actividad quinasa de AtMPK2 detectados en A (ver Material y Métodos). Los resultados están expresados en número de veces que se induce la actividad respecto al tiempo cero (sin tratar).

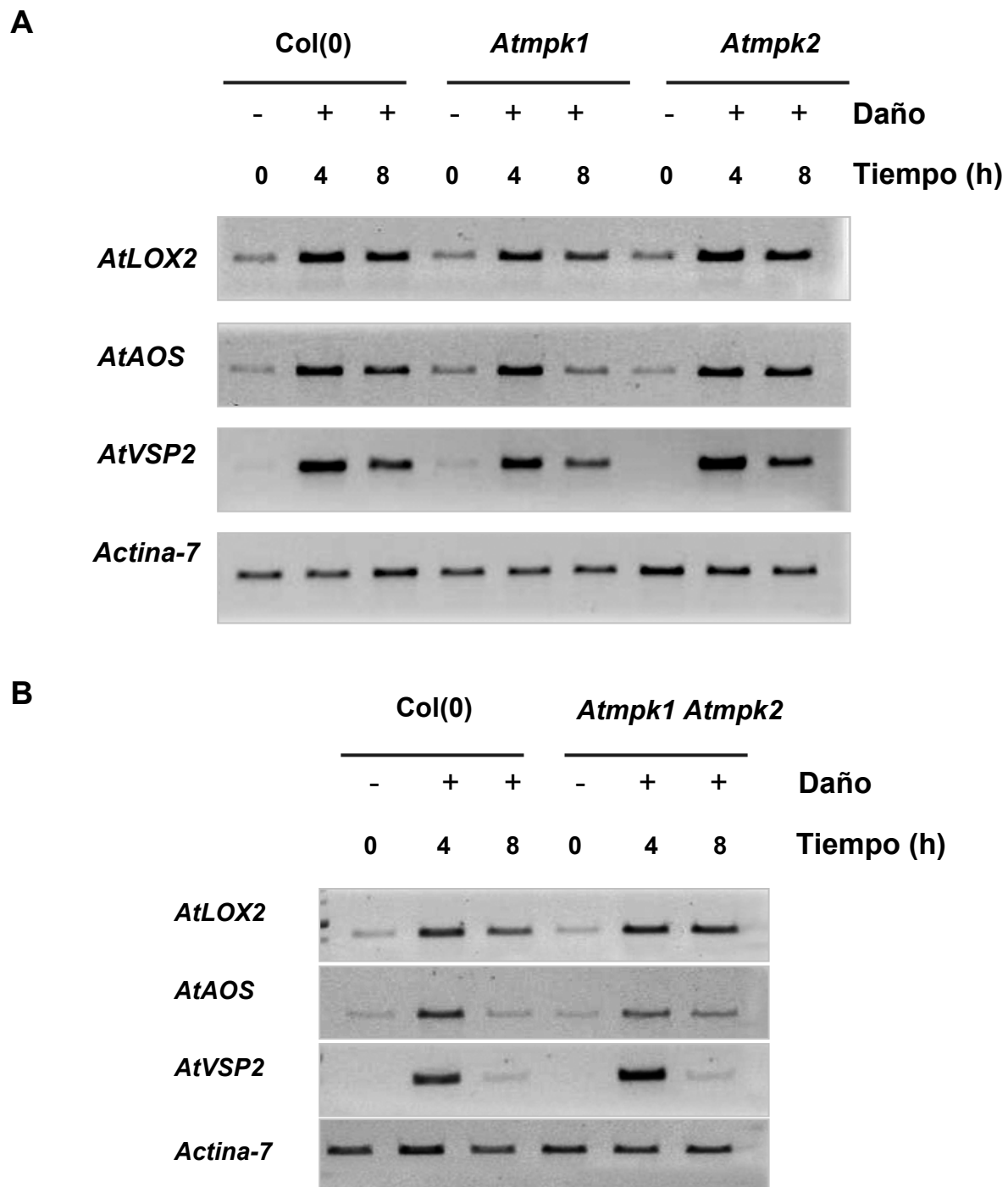


Figura 46. Análisis mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *AtLOX2*, *AtAOS* y *AtVSP2* tras el tratamiento de daño. Se aisló el ARN total de hojas de plantas de la línea silvestre y de los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* (**A**) y el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* (**B**) sin dañar (tiempo 0) y dañadas, recogidas a 4 y 8 horas tras el tratamiento. En la PCR se utilizaron los cebadores específicos para cada gen, que se especifican en la **Tabla 6** de Material y Métodos. Como control se realizó una PCR utilizando cebadores específicos de *Actina-7*.

2.2.2.2 Activación de AtMPK1 y AtMPK2 en *coi1-1*

Con el fin de estudiar si la activación por daño de AtMPK1 y AtMPK2 está mediada por COI1, se realizó el ensayo de daño en plantas *coi1-1* y se analizó la actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 en este mutante (**Fig. 47**). Los resultados obtenidos indican que AtMPK1 y AtMPK2 se activan tras el daño tanto en la línea silvestre como en el mutante *coi1-1*, indicando que la activación de AtMPK1 y AtMPK2 por daño es independiente de COI1.

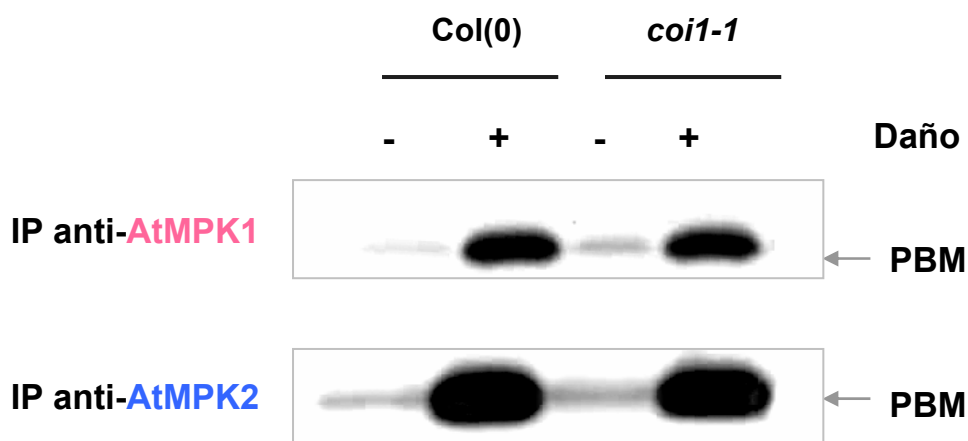


Figura 47. Activación por daño de AtMPK1 y AtMPK2 en *coi1*. Extractos de proteínas de hojas de la línea silvestre (Col(0)) y del mutante *coi1-1* sin dañar (-) y dañadas recogidas a las 2 horas del daño (+) se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2. Para la inmunoprecipitación de AtMPK1 y AtMPK2 se utilizaron 100 y 400 μ g de extracto crudo, respectivamente. Posteriormente se realizó el ensayo de actividad utilizando la PBM como sustrato de la reacción (ver apartado 7.2 de Material y Métodos). La fosforilación de la PBM fue analizada mediante análisis Western y exposición de una película fotográfica.

2.2.3 Activación por ABA y H₂O₂

Como se ha mencionado anteriormente, además del JA, se ha descrito que el ABA y el H₂O₂ pueden estar implicados en la señalización del daño (Chang *et al.*, 2004; León *et al.*, 2001). Para estudiar el efecto que tiene el ABA sobre la actividad de AtMPK1 y AtMPK2, se trataron hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* con ABA 100 µM y se midió la actividad quinasa de estas proteínas. La actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 aumenta de forma transitoria tras el tratamiento con ABA, alcanzando un máximo a las dos horas del tratamiento (**Fig. 48**). El tratamiento con una solución control activó ligeramente a AtMPK1 y AtMPK2, pero a niveles mucho más bajos que la solución de ABA (**Fig. 48**). No se detectó un aumento de actividad en las hojas de los mutantes de inserción tratadas con ABA (datos no mostrados).

Para estudiar si H₂O₂ tiene algún efecto sobre la actividad de AtMPK1 y AtMPK2, se trataron hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* con H₂O₂ 5 mM y se midió la actividad quinasa de estas MAP quinasas. Como se muestra en la **Figura 49**, la actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 aumenta tras el tratamiento con H₂O₂. No se detectó un aumento de actividad en las hojas de los mutantes de inserción tratadas con H₂O₂ (datos no mostrados).

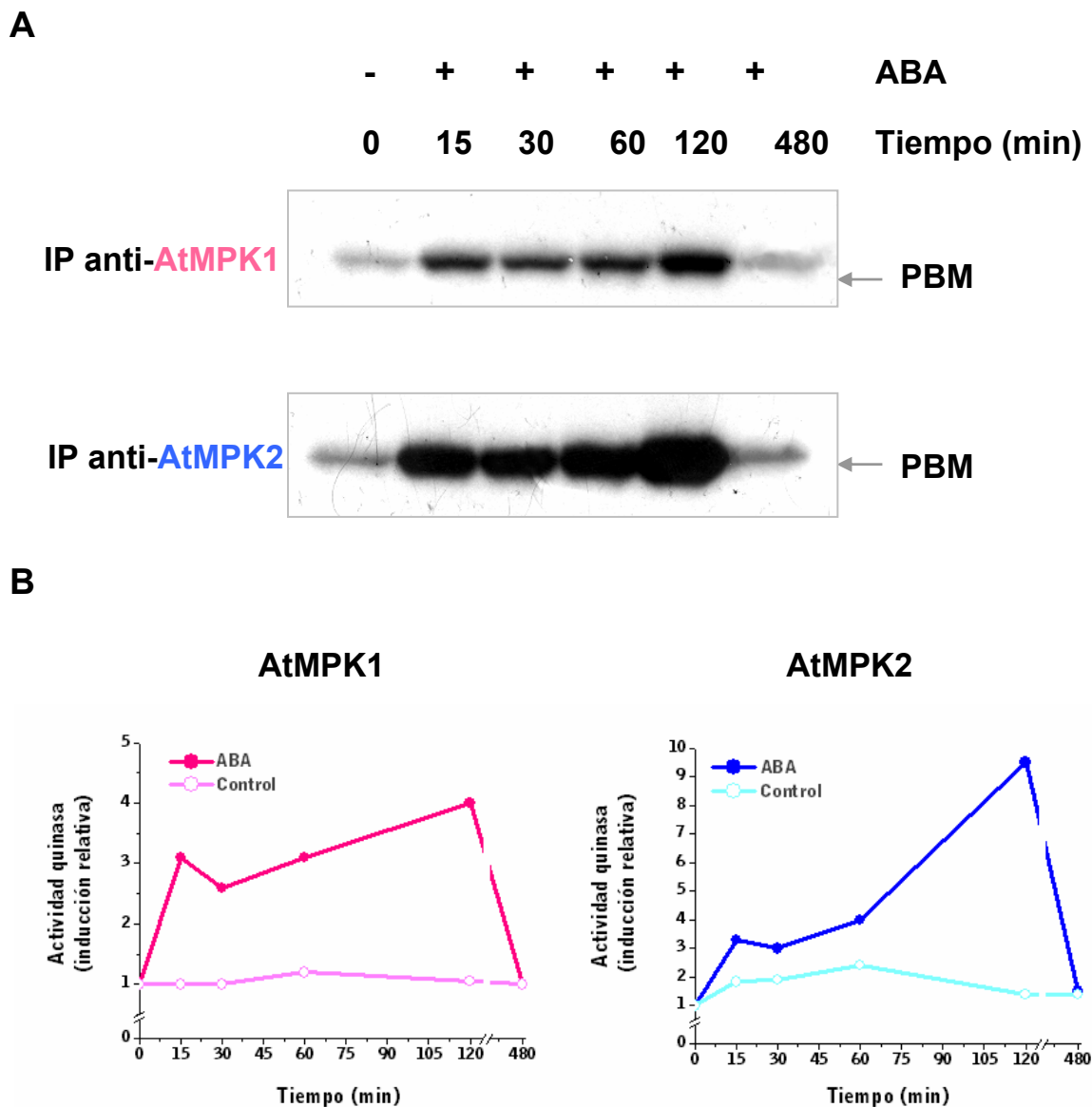


Figura 48. Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por ABA. **A.** Plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos) fueron tratadas con ABA 100 μ M en etanol 0.05%, Tween-20 0.01% y con una solución control (etanol 0.05%, Tween-20 0.01%) tal y como se especifica en el apartado 1.1.2.3 de Material y Métodos. Extractos crudos de hojas recogidas a 0, 15, 30, 60, 120 y 480 minutos tras el tratamiento se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-AtMPK1 (100 μ g de proteínas de extracto crudo) y con el anti-AtMPK2 (400 μ g de proteínas de extracto crudo). Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. **B.** Cuantificación de los niveles de actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 detectados en A (ver Material y Métodos). Se han incluido los datos de los niveles de actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 de los extractos control de las **Figuras 44 y 45**. Los resultados están expresados en número de veces que se induce la actividad respecto al tiempo cero (sin tratar).

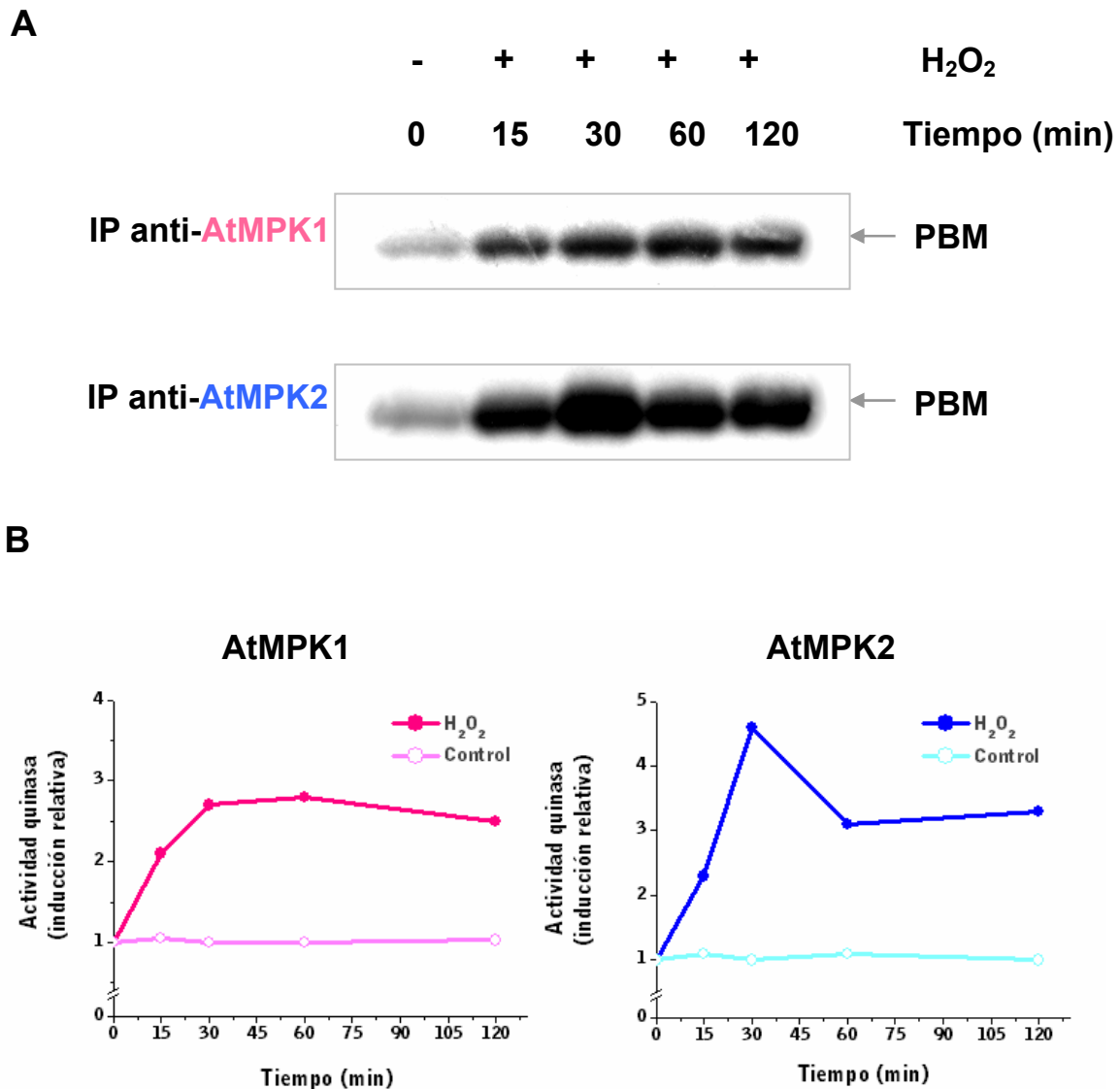


Figura 49. Activación de AtMPK1 y AtMPK2 por H₂O₂. **A.** Plantas de 4 semanas de *Arabidopsis* crecidas en tierra (ver apartado 1.1.1.1 de Material y Métodos) fueron tratadas con H₂O₂ 5 mM (apartado 1.1.2.4 de Material y Métodos) y con una solución control (H₂O). Los extractos de proteínas de las hojas recogidas 0, 15, 30, 60 y 120 minutos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-AtMPK1 (100 µg de proteínas de extracto crudo) y con el anti-AtMPK2 (400 µg de proteínas de extracto crudo). Se realizó el ensayo de medida de actividad quinasa de los inmunoprecipitados según se describe en el apartado 7.2 de Material y Métodos. La fosforilación de la PBM fue analizada mediante SDS-PAGE y exposición del gel sobre una película fotográfica. No se detectó un aumento de la fosforilación de PBM en las hojas tratadas con solución control (datos no mostrados). **B.** Cuantificación de los niveles de actividad quinasa de AtMPK1 y AtMPK2 detectados en A (ver Material y Métodos). Los resultados están expresados en número de veces que se induce la actividad respecto al tiempo cero (sin tratar).



Discusión

En plantas, la señalización a través de las cascadas de MAP quinasas da lugar a un amplio número de respuestas celulares que incluyen la división y diferenciación celular, así como respuesta a estrés abiótico o biótico (Mishra et al., 2006).

Numerosos estudios han demostrado que las MAP quinasas de plantas pueden estar reguladas a nivel de la transcripción y traducción, así como post-traduccionalmente (Mishra *et al.*, 2006; Pitzschke & Hirt, 2006; Zhang *et al.*, 2006). En general, la regulación de la actividad de una MAP quinasa en respuesta a un estímulo es la característica esencial que se requiere para implicar a una MAP quinasa en la señalización de dicho estímulo. Hasta el momento, sólo se ha demostrado la regulación de la actividad quinasa en respuesta a un estímulo con AtMPK3 (subgrupo A1), AtMPK4 (subgrupo B1) y AtMPK6 (subgrupo A2) y sus ortólogos en numerosas especies como tabaco, tomate y arroz (Ichimura *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2005; Kovtun *et al.*, 2000; Rentel *et al.*, 2004; Yuasa *et al.*, 2001).

Se dispone de muy poca información acerca de los miembros del subgrupo C1. Se han descrito cambios en los niveles de ARNm de *Ntf3* de tabaco durante el desarrollo del polen (Wilson *et al.*, 1993) y de *PhMEK1* de petunia durante el desarrollo del ovario (Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995). En *Arabidopsis*, el subgrupo C1 está constituido por dos genes de MAP quinasas: *AtMPK1* (*At1g10210*) y *AtMPK2* (*At1g59580*). La función de estos genes no se conoce, aunque hay algún dato que indica una posible relación entre esos genes y respuestas de estrés. Se ha descrito que los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2* aumentan ligeramente tras un tratamiento de salinidad (Mizoguchi *et al.*, 1996), y que disminuyen a las 24 horas tras un

tratamiento a bajas temperaturas (Vogel *et al.*, 2005). Además, resultados obtenidos mediante análisis de micromatrices indican que la expresión de *AtMPK1* es mayor en plántulas crecidas en oscuridad que en plántulas crecidas en presencia de luz (Ma *et al.*, 2005). El análisis de los datos de expresión depositados en bases de datos de acceso público indican que los niveles de expresión de estos genes son muy bajos y que no hay cambios relevantes tras las diferentes condiciones ensayadas (Zimmermann *et al.*, 2004; Arabidopsis Functional Genomics Consortium (AFGC) Microarrays databases). No hay ningún dato sobre la regulación de la actividad quinasa de las MAP quinasas del subgrupo C1.

La presente Tesis aborda el estudio de la función de *PsMAPK2* (guisante), *AtMPK1* y *AtMPK2* (*Arabidopsis*), genes que codifican MAP quinasas del subgrupo C1. Para emprender dicho estudio, en este trabajo se han realizado diferentes aproximaciones: 1- Se ha analizado la expresión de estas MAPKs en distintos órganos de la planta; 2- Se han obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan distintas versiones mutantes de *PsMAPK2*; 3- Se ha analizado la actividad quinasa de estas MAPKs en respuesta a distintas señales de estrés.

Expresión de PsMAPK2 en distintos órganos de P. sativum

En este trabajo se ha analizado la expresión de *PsMAPK2* en distintos órganos de planta adulta de guisante mediante RT-PCR semicuantitativa. Los resultados obtenidos indican que *PsMAPK2* se expresa en todos los órganos testados (raíz, hoja, tallo, fruto, flor, carpelo y antera), principalmente en antera y raíz (**Fig. 19**). Cuando se comparan los análisis de expresión en distintos órganos de *PsMAPK2* con los de MAPKs del subgrupo C1 de *Arabidopsis* (*AtMPK1/2*) se observa que *PsMAPK2*

presenta en anteras un nivel de expresión más alto en relación a otros órganos.

Expresión ectópica de PsMAPK2 en A. thaliana

El estudio de la función fisiológica de una proteína se puede realizar mediante diferentes aproximaciones de genética molecular. Una aproximación ampliamente utilizada consiste en desregular o abolir la expresión de la proteína de interés. Las técnicas más utilizadas en genética molecular de plantas son el ARNi o la caracterización de mutantes nulos de inserción de T-DNA (Knockout) del gen en cuestión. Una aproximación complementaria utilizada para determinar la función de una proteína consiste en elevar la actividad de esta proteína y evaluar las consecuencias tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular. En algunos casos, el incremento de la actividad de la proteína se obtiene mediante sobreexpresión de la proteína en cuestión. Pero esta técnica generalmente se utiliza para proteínas que poseen una actividad basal específica que no está sujeta a mecanismos de regulación. En el caso de proteínas cuya actividad está regulada, como en el caso de las MAP quinasas, hay que utilizar otras técnicas que conduzcan a incrementar la actividad de la proteína.

En particular, el estudio de las funciones de las MAPKs de plantas se ha abordado desde dos aproximaciones de genética molecular. Por una parte se han descrito aproximaciones que analizan las consecuencias que a nivel fisiológico y a nivel molecular produce la pérdida de función de las MAPKs. Para ello, se ha utilizado la técnica de ARNi y la de los mutantes nulos de T-DNA (Menke *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2000; Samuel & Ellis, 2002). También se ha utilizado la sobreexpresión de versiones mutantes inactivas (Samaj *et al.*, 2002). Por otra parte, se han

descrito aproximaciones que analizan los efectos que produce la ganancia de función de las MAP quinasas. Para ello, se ha expresado una MAP2K o MAP3K (de forma constitutiva o condicionalmente activa) responsable de la activación de una MAPK determinada (Ichimura *et al.*, 2006 Teige *et al.*, 2004). Sin embargo, esta última aproximación es bastante inespecífica ya que, como se ha mencionado en la Introducción, las MAP2K y las MAP3K pueden activar a varias MAPKs (Kovtun *et al.*, 2000). Por ello, una aproximación alternativa es la expresión de la MAP quinasa en cuestión constitutivamente activa. No obstante, a diferencia de lo que sucede con las MAP3Ks y MAP2Ks, no hay una estrategia simple para obtener MAPKs constitutivamente activas. Un método utilizado es la expresión de una versión mutante de la MAPK análoga al mutante *sevenmaker* de *Drosophila* (Samaj *et al.*, 2002). La forma en la que la mutación D334N actúa en el mutante de *Drosophila* no está muy clara, pero resulta en un fenotipo de ganancia de función en la ruta del desarrollo del ojo de *Drosophila* (Brunner *et al.*, 1994). Experimentos realizados con una mutación similar en la MAPK de levadura FUS3 (Hall *et al.*, 1996) y en ERK2 de mamíferos (Benfey *et al.*, 1990; Bott *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1996), indican que las MAPKs con esta mutación no son inactivadas eficientemente por las fosfatasas de MAPKs una vez se ha transducido la señal.

En este trabajo se ha utilizado una aproximación de genética molecular para el estudio de la función de PsMAPK2 de guisante dirigida a la obtención de plantas transgénicas que expresen PsMAPK2 y versiones mutantes de ganancia y pérdida de función. Ante la imposibilidad de transformar plantas de guisante, en este trabajo se ha utilizado como sistema experimental *Arabidopsis*, ya que la eficacia de transformación es alta y tiene como ventaja adicional, frente a otros sistemas, el conocimiento de la secuencia de su genoma.

Se transformó *Arabidopsis* con el ADNc correspondiente a *PsMAPK2* y con el ADNc de las versiones constitutivamente activas o dominantes

negativas de *PsMAPK2*. La versión *PsMAPK2-LOF* (del inglés *loss-of-function mutation*) se obtuvo al sustituir K61 por A61, lo que produce una inhibición de la actividad enzimática alterándose el sitio de unión del ATP (Robinson *et al.*, 1996). La versión *PsMAPK2-GOF* (del inglés *gain-of-function mutation*) se realizó sustituyendo D328 por N328, en analogía a la mutación de ganancia de función de la MAPK codificada por *rolled* (D334N), en el mutante *sevenmaker* de *Drosophila* (Brunner *et al.*, 1994; Oellers & Hafen, 1996; Samaj *et al.*, 2002; Tárrega *et al.*, 2002).

El análisis fenotípico de las plantas transformadas T₁ reveló que el 36% de las plantas 35S::*PsMAPK2-GOF*, el 36% de las plantas 35S::*PsMAPK2-LOF* y el 18% de las plantas 35S::*PsMAPK2*, presentaban un fenotipo común de esterilidad (**Fig. 28**). El fenotipo de esterilidad observado en las plantas T₁ aparece también en plantas T₂ homocigotas. Sin embargo, todas las plantas T₁ y plantas T₂ resultantes de la transformación con el vector de transformación de plantas vacío presentaban un fenotipo similar a la línea silvestre.

El fenotipo de esterilidad de las plantas que expresan las diferentes versiones mutantes de *PsMAPK2* es un fenotipo de esterilidad masculina. El desarrollo de las anteras está interrumpido y no llega a producirse la dehiscencia, impidiendo la liberación de los granos de polen. El polen queda encerrado dentro de las anteras, por lo que los óvulos no son fecundados y no se producen silicuas con semillas. Estas plantas no presentan esterilidad femenina, ya que al polinizar las flores de las plantas con esterilidad masculina con polen control (Col(0)) se producen silicuas normales que contienen semillas en su interior.

Para determinar los niveles de expresión de las distintas versiones de *PsMAPK2* en las plantas transgénicas, se realizó un análisis Western con un anticuerpo comercial anti-HA que reconoce la secuencia YPYDVPDYA adicionada en el extremo N-terminal de las diferentes versiones de *PsMAPK2*. Además, se midió la actividad quinasa de *PsMAPK2* en las

distintas plantas transgénicas por inmunoprecipitación de extractos de proteínas con el anticuerpo anti-PsMAPK2. En las plantas *35S::PsMAPK2-GOF* homocigotas se observa una correlación entre el nivel de expresión de la proteína PsMAPK2-GOF y la alteración fenotípica en las anteras. Los resultados de medida de la actividad quinasa basal en los inmunoprecipitados de extractos de plántulas *35S::PsMAPK2-GOF* (**Fig. 23**) indican niveles más altos de actividad quinasa que en los extractos de la línea silvestre. Los resultados de medida de la actividad quinasa basal en los inmunoprecipitados de extractos de plántulas *35S::PsMAPK2* (**Fig. 26**) también indican niveles más altos de actividad quinasa que en la línea silvestre. Entre la actividad basal de los extractos de proteínas de plántulas *35S::PsMAPK2-GOF* y *35S::PsMAPK2*, al igual que ha sido descrito en otros sistemas, no se detectan grandes diferencias. Cuando se expresan MAP quinasas con este tipo de mutación GOF en células animales tampoco se detectan grandes diferencias entre la actividad de la versión GOF y la versión silvestre, en condiciones basales (Oellers & Hafen, 1996; Tárrega *et al.*, 2002). En cambio, tras el estímulo, se ha descrito que la versión GOF se mantiene activa durante un periodo de tiempo más largo que la versión silvestre, debido a que la mutación conduce a una disminución en la afinidad de las fosfatasas responsables de la inactivación de la MAP quinasa (Oellers & Hafen, 1996; Tárrega *et al.*, 2002). Así pues, en las plantas *35S::PsMAPK2-GOF* cabría esperar una activación de mayor duración que en las plantas *35S::PsMAPK2* en respuesta a una señal de activación. En relación a las líneas *35S::PsMAPK2-LOF* testadas, ninguna mostró niveles de actividad quinasa frente a la PBM diferente a los de las plantas control. Es importante señalar que sólo se ha conseguido obtener una línea homocigota *35S::PsMAPK2-LOF*. Se han mantenido dos líneas heterocigotas *35S::PsMAPK2-LOF* con un fenotipo de esterilidad muy marcado mediante cruce con la línea silvestre. En las plantas *35S::PsMAPK2-LOF* también se ha observado una correlación entre el nivel

de expresión de la proteína PsMAPK2-LOF y la alteración fenotípica en las anteras.

Los datos de expresión indican que *PsMAPK2* se localiza preferentemente en raíz y anteras, sugiriendo que *PsMAPK2* puede poseer una función específica en estos órganos, y por lo tanto es *a priori* donde cabría esperar que se produjeran alteraciones cuando se expresan las distintas versiones de PsMAPK2. No se ha detectado ninguna alteración relevante en la raíz de las plantas que expresan las distintas versiones de PsMAPK2. En cambio, como se ha descrito en esta memoria, sí que se han detectado alteraciones en las anteras de estas plantas. Estos resultados sugieren que esta MAPK puede tener una función en el desarrollo de las anteras. Sorprendentemente, se han observado alteraciones en las anteras tanto de las plantas *35S::PsMAPK2-GOF*, *35S::PsMAPK2* como de la *35S::PsMAPK2-LOF*. Una posible explicación a este hecho puede ser que PsMAPK2 forme parte de una cascada de señalización implicada en el desarrollo de las anteras, y el bloqueo de la cascada por la expresión PsMAPK2-LOF produzca androesterilidad severa. Del mismo modo, una actividad MAP quinasa mantenida excesivamente, como se supone que está ocurriendo en las plantas *35S::PsMAPK2-GOF*, en analogía con lo descrito del mutante *sevenmaker* de *Drosophila*, puede dar lugar a una alteración en el desarrollo de las anteras debido a que no se desconecta la ruta de señalización una vez transducida la señal. En la literatura se han descrito casos similares, como el estudio detallado por Samuel y Ellis en el que tanto la sobreexpresión como la supresión de la MAP quinasa de tabaco NtSIPK da lugar a plantas sensibles al ozono (Samuel & Ellis, 2002). De forma similar, Kalbina y Strid han descrito que tanto el incremento como la supresión de AtMKP1 (una MAP quinasa fosfatasa de *Arabidopsis*) da lugar a plantas que tienen incrementadas los niveles de ARNm de *PDF1.2*, *PR1* y *PR5* (Kalbina & Strid, 2006). Todos estos datos sugieren que es

necesario un buen balance de la actividad MAP quinasa para la correcta transmisión de la señal y posterior respuesta.

En distintas especies de plantas, incluida *Arabidopsis*, se han identificado mutantes androestériles. Y aunque algunos de los genes que producen esterilidad masculina no han sido clonados ni estudiados, los análisis fenotípicos sugieren que algunos de estos mutantes tienen afectada la diferenciación y/o función de algunos de los tipos celulares que forman parte de las anteras. Se conoce muy poco acerca de las señales que regulan la dehiscencia de las anteras. Una de las hormonas que tiene un papel relevante en la dehiscencia de las anteras es el JA. El mutante de T-DNA de *Arabidopsis dad1* (del inglés *delayed dehiscence 1*) es androestéril (Ishiguro *et al.*, 2001). DAD1 codifica una fosfolipasa del tipo A1. El defecto en la dehiscencia de las anteras de este mutante puede ser recuperado por la aplicación exógena de JA, sugiriendo que la actividad de DAD1 es requerida para la síntesis del JA en el desarrollo de las anteras. Otros mutantes de genes implicados en la biosíntesis del JA poseen también alteraciones en la dehiscencia de las anteras (McConn & Browse, 1996; Park *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi & Browse, 2000; Stintzi *et al.*, 2001). Por otra parte, el mutante de señalización del JA *coi1* de *Arabidopsis* también es androestéril. La esterilidad de este mutante no puede ser recuperada mediante el tratamiento exógeno con JA, ya que es un mutante de señalización del JA. Sin embargo, hay que señalar que otros mutantes de señalización del JA, como *jar1* de *Arabidopsis* son fértiles (Berger *et al.*, 1996; Staswick *et al.*, 1992). Además, el mutante *cos1*, que es un supresor de *coi1*, recupera la sensibilidad al JA en el crecimiento de la raíz y en respuestas de defensa, pero no la fertilidad, sugiriendo que puede haber distintas rutas de señalización del JA específicas de un tejido (Xiao *et al.*, 2004). En las plantas *35S::PsMAPK2-GOF* y *35S::PsMAPK2-LOF*, el tratamiento con JA o MeJA no es capaz de recuperar el fenotipo de androesterilidad, indicando que la reducción en la síntesis del JA no es la

responsable del fenotipo de estos mutantes. Sin embargo, PsMAPK2 podría actuar a nivel de la señalización del JA en anteras. De hecho, en esta memoria se ha demostrado que PsMAPK2 se activa por JA (**Fig. 32**).

Otra hormona que parece tener un papel importante en la dehiscencia de las anteras son las giberelinas (Izhaki *et al.*, 2002; Kaneko *et al.*, 2004 Kaneko *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2003; Swain *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). En la literatura se ha descrito que el desarrollo de las anteras se inhibe no sólo por una reducción en los niveles de GAs (Jacobsen & Olszewski, 1991) y señalización (Peng *et al.*, 1997), sino también por incrementos en la señal de GAs (Izhaki *et al.*, 2002). Así pues, se ha sugerido que las anteras requieren de un buen balance en la señal de GAs para su desarrollo normal. Este balance puede romperse en las plantas transgénicas que expresan las distintas versiones de PsMAPK2. Interesantes resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la expresión de *PsMAPK2* podría estar regulada por giberelinas. Los niveles del ARNm de PsMAPK2 disminuyen tras el tratamiento con ácido giberélico en ovarios no polinizados de guisante (MJ Marcote, resultados no publicados). Por otra parte, en esta memoria se ha demostrado que PsMAPK2 se activa por ABA. La función del ABA en el desarrollo de la antera no se ha estudiado. Pero sí que se ha sugerido que en el desarrollo de las anteras podría ocurrir que las hormonas GA y ABA tengan funciones antagónicas, como se ha descrito en la germinación de las semillas (Ji *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que en tomate la aplicación exógena de ABA interrumpe el desarrollo de la antera (Chandra Sekhar & Sawney, 1991) y uno de los mutantes de señalización del ABA (*abi8*) es androestéril (Brocard-Gifford *et al.*, 2004). Por tanto, no se puede descartar que el efecto que se ha observado en la deshiscencia de las anteras de las plantas que expresan PsMAPK2 y las diferentes versiones mutantes se deba a una alteración de las rutas de señalización del ABA y/o GA en anteras.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se han identificado y caracterizado mutantes de inserción de T-DNA simples de las MAP quinasas del subgrupo C1, *Atmpk1* y *Atmpk2*, que no expresan *AtMPK1* y *AtMPK2*, respectivamente (F. Calatayud, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2005). El análisis fenotípico mostró que en estos mutantes se produce la dehiscencia de las anteras como en la línea silvestre. Ya que *AtMPK1* y *AtMPK2* presentan un alto porcentaje de identidad en su secuencia de aminoácidos, se obtuvo el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* con el fin de eliminar el efecto de una posible redundancia de función entre ambas MAPKs (E. Barberá, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2006). El doble mutante, al igual que los mutantes simples, presenta un desarrollo normal de las anteras. Dicho resultado contrasta con el fenotipo de las anteras de las plantas *35S::PsMAPK2-LOF* que expresan la versión inactiva de *PsMAPK2*. Estos resultados podrían explicarse porque la pérdida de función que producen ambas estrategias no es idéntica. Se ha sugerido que al expresar una MAP quinasa inactiva, ésta puede unirse al sustrato, en respuesta a una señal, sin fosforilarlo, y de alguna manera secuestrarlo impidiendo su fosforilación por otras MAP quinasas. Así pues, la estrategia de expresar la versión inactiva de *PsMAPK2* puede conducir a la interrupción de la ruta de señalización en la que intervienen *AtMPK1/2*, suponiendo que *PsMAPK2* y *AtMPK1/2* tengan funciones similares (sustratos comunes). Por otra parte, con la estrategia de pérdida de función que utiliza los mutantes de inserción de T-DNA también se puede interrumpir la ruta en la que participan *AtMPK1/2* porque no se expresan estas MAPKs. Sin embargo, se interrumpirá la ruta siempre y cuando la actividad de *AtMPK1/2* no sea reemplazada por otra MAP quinasa de otro grupo. Esto último puede ocurrir como ya se ha mencionado en la Introducción (apartado 2.4 de Resultados) al existir un gran número de conexiones entre rutas de señalización en las que participan las MAP quinasas.

Expresión de AtMPK1 y AtMPK2 en Arabidopsis. Regulación por luz

El análisis de expresión de *AtMPK1* y *AtMPK2* por RT-PCR semicuantitativa indica que éstas se expresan en todos los órganos testados (raíz, hoja, tallo, fruto, flor, carpelo y antera), principalmente en hoja de roseta y raíz (**Fig. 34**), resultados que coinciden con los datos disponibles en las bases de datos públicas.

Como se muestra en este trabajo, la luz regula los niveles del ARNm de *AtMPK1* y *AtMPK2*. En plántulas crecidas con fotoperiodo (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) se produce una disminución en los niveles de los ARNm de estas MAP quinasas durante la fase de luz del fotoperiodo (ver **Figura 35**). Esta regulación no depende del ritmo circadiano. También se observa esta disminución en plantas etioladas (crecidas en oscuridad) cuando se transfieren a la luz (ver **Figura 37**). El fenotipo de los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* cuando crecen en oscuridad es similar al de la línea silvestre (F. Calatayud, Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, 2005), aunque el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* presenta una ligera disminución en la longitud del hipocotilo (datos no mostrados). Sin embargo, las plántulas etioladas tanto de los mutantes simples como del doble mutante, cuando son transferidas a la luz, presentan una inhibición de la desetiolización con respecto a la línea silvestre, lo cual sugiere que *AtMPK1* y *AtMPK2* pueden tener un papel regulador en el proceso de desetiolización. AtMEK1, una MAP2K de *Arabidopsis*, ha sido también relacionada con el proceso de desetiolización. Los niveles de ARNm de AtMEK1 aumentan cuando plántulas etioladas de *Arabidopsis* son transferidas a la luz (Morris *et al.*, 1997).

Como se ha descrito anteriormente, para implicar una MAP quinasa en una ruta de señalización se debe demostrar que la actividad de dicha MAPK está regulada por la señal. Aunque se han obtenido evidencias

genéticas de la implicación de estas MAP quinasas en el proceso de desetiologización, en este trabajo no se han realizado medidas de actividad quinasa de AtMPK1/2 en respuesta a luz/oscuridad que demuestren que la actividad de AtMPK1/2 está regulada por luz. Por ello, por el momento, sólo se puede especular acerca de la función de estas MAPK en la señalización por luz o en el proceso de desetiologización. Se sabe que las señales de luz se perciben principalmente por fitocromos y criptocromos y que regulan el crecimiento y el desarrollo de la planta como resultado de los cambios que se producen en el transcriptoma (Casal & Yanovsky, 2005). Además, se ha descrito que uno de los principales mecanismos de regulación de la transducción de señales de luz es la fosforilación/desfosforilación (Duek *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Li & Yang, 2006 Shen *et al.*, 2005). Se podría especular que las MAP quinasas del subgrupo C1 podrían estar implicadas directamente en la señalización de luz y, en este sentido, sería de gran interés analizar cómo se regula la actividad quinasa de AtMPK1/2 en plántulas etioladas tras la transferencia a la luz o en plántulas crecidas en presencia de luz tras ser transferidas a oscuridad. También sería de interés ensayar la actividad quinasa con diferentes clases de luz monocromática durante el proceso de desetiologización. Sin embargo, es más probable que intervengan indirectamente de forma que, podrían estar reguladas por la luz debido a la activación/desactivación de factores de transcripción compartidos por la señalización de luz y el metabolismo y/o señalización de hormonas como JA, ABA o GA (Casal & Yanovsky, 2005; Oh *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2005). Por otra parte, el proceso de desetiologización es tan complejo que una plántula etiolada, cuando es expuesta a la luz, sufre cambios masivos a nivel transcripcional y traduccional, de forma que puede resultar difícil conocer la función de dichos cambios. También hay que tener en cuenta que en el proceso de desetiologización es característico el rápido ensamblaje de la maquinaria fotosintética, lo que conlleva reajustes redox. Así pues, se puede especular

que estos reajustes también podrían estar regulados por estas MAPKs que según los resultados expuestos en esta memoria se activan por H₂O₂.

Diversas señales de estrés activan a PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2

AtMPK1 y AtMPK2 pueden ser un ejemplo de redundancia de función al presentar un 87% de identidad entre sus secuencias de aminoácidos. De acuerdo con los datos de los análisis públicos de micromatrices y los datos obtenidos en este trabajo, ambas MAPKs se expresan muy poco en la mayoría de los órganos, y no sufren grandes cambios en los niveles del ARNm tras tratamientos de estrés y hormonales. Además, su patrón de expresión es muy similar (ver **Figura 34**) (Zimmermann *et al.*, 2004; Arabidopsis Functional Genomics Consortium (AFGC) Microarrays databases). Por otra parte, PsMAPK2 es, hasta el momento, el único miembro del subgrupo C1 de guisante aislado y entre las secuencias de aminoácidos de PsMAPK2, AtMPK1 y AtMPK2 hay un 84% de identidad. A continuación se discuten los resultados de la activación de estas MAPKs, por herida y distintas moléculas señalizadoras de estrés, que sugieren que estas MAPKs del subgrupo C1 podrían desempeñar funciones similares.

En este trabajo se han obtenido anticuerpos específicos contra el extremo C-terminal de AtMPK1/2 y PsMAPK2 para medir la actividad quinasa específica de cada proteína mediante inmunoprecipitación (ver **Figura 39**). La especificidad de los anticuerpos anti-AtMPK1 y anti-AtMPK2 en la inmunoprecipitación de extractos de proteínas se demostró mediante la utilización de extractos de los mutantes simples *Atmpk1* y *Atmpk2* y del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2*. La especificidad del anticuerpo anti-PsMAPK2 se demostró al utilizar extractos de proteínas de plantas 35S::*PsMAPK2-LOF* y silvestres.

En esta tesis se ha demostrado que el tratamiento de daño produce un incremento de la actividad de AtMPK1, AtMPK2 y PsMAPK2. El incremento en la actividad quinasa de AtMPK1/2 podría ser producido por un aumento en los niveles de la proteína. Sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser probada debido a la baja señal obtenida con estos anticuerpos en el análisis Western. Este fenómeno ha sido observado en otros anticuerpos de otras proteínas quinasa (Mayrose *et al.*, 2004), y puede ser explicado por el hecho de que el sistema de detección utilizado en los ensayos de actividad quinasa es más sensible que el del Western Blotting. En el caso de PsMAPK2 sí que se han podido determinar los niveles de proteína mediante análisis Western con los anticuerpos anti-HA que reconocen el extremo N-terminal de PsMAPK2 en las plantas 35S::PsMAPK2. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la actividad de PsMAPK2 se debe en gran medida a un aumento de la actividad específica y no tanto a un aumento de la cantidad de proteína.

La actividad de AtMPK1/2 tras el daño aumenta de forma transitoria. La actividad alcanza un máximo alrededor de las 2 horas del daño y el pico de actividad es bastante ancho. La activación de AtMPK1/2 no es tan rápida como en otras MAPKs implicadas en la respuesta al daño. En *Arabidopsis*, AtMPK4 y AtMPK6 también se activan por herida, pero la máxima activación se alcanza a los 5-10 minutos y el pico de actividad es muy estrecho. (Ichimura *et al.*, 2000). Esta cinética diferente sugiere que AtMPK1/2 no son dianas primarias en la señalización del daño.

Se sabe que el JA es una de las principales señales que participan en la respuesta al daño (Devoto *et al.*, 2005; León *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). El JA puede ser responsable de la activación de AtMPK1/2 y PsMAPK2 tras la herida. En los experimentos realizados en este trabajo se muestra que el JA activa a AtMPK1/2 y PsMAPK2. Sin embargo, la inducción de la actividad de AtMPK1 y AtMPK2 por herida también se observa en el mutante insensible a JA, *coi1*. Por otra parte, el análisis de la

expresión en los mutantes simples y en el doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* de algunos genes marcadores de daño que se inducen por JA y que son COI1-dependientes (*AtLOX2*, *AtAOS* y *AtVSP2*) indicó que estos genes se inducen tras el daño tanto en la línea silvestre como en las líneas mutantes (**Fig. 46**). Todo esto sugiere que la activación de AtMPK1/2 por herida es independiente de COI1. Aunque COI1 regula un número considerable de genes cuya expresión responde a JA, análisis de micromatrices obtenidos recientemente han revelado que en la respuesta a herida existen numerosos genes que son regulados por JA y que no dependen de COI1 (Devoto *et al.*, 2005; Pérez-Amador *et al.*, 2002), como sucede con AtMPK1/2. El aumento de la actividad quinasa de AtMPK1/2 en *coi1* tras la herida podría reflejar también que otras señales además del JA regulan la actividad de AtMPK1/2 en la respuesta a herida. Aunque los jasmonatos poseen un papel muy importante en la ruta de señalización del daño, otras moléculas como el ABA y el H₂O₂ han sido relacionadas con la respuesta al daño y podrían también regular la actividad quinasa de AtMPK1/2 y PsMAPK2. Precisamente, en este trabajo se ha demostrado la inducción de la actividad de AtMPK1/2 y PsMAPK2 por el ABA y el H₂O₂.

Cada vez hay más evidencias que indican que una señal puede activar varias MAPKs (Mishra *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). De hecho, otras MAPKs de *Arabidopsis* se han relacionado con la señalización de JA, H₂O₂ y ABA. Se ha demostrado que *AtMPK4* está implicada en algunas respuestas mediadas por JA, aunque no se ha detectado un aumento en la actividad de AtMPK4 en respuesta a MeJA (Brodersen *et al.*, 2006). AtMPK3 y AtMPK6 también se activan por H₂O₂ (Kovtun *et al.*, 2000; Rentel *et al.*, 2004; Yuasa *et al.*, 2001). Estudios recientes indican que en la ruta de señalización del ABA que produce la inhibición del crecimiento tras la germinación de las semillas está implicada AtMPK3 (Lu *et al.*, 2002). Esta situación pone de manifiesto el gran número de conexiones que existe entre las rutas de señalización mediadas por

MAP quinasas (Mishra *et al.*, 2006). Además, como se ha descrito en esta memoria, diferentes estímulos pueden activar una misma MAP quinasa (Nakagami *et al.*, 2005). La complejidad del entramado de rutas de señalización de MAPKs hace difícil asignar una MAP quinasa a una hormona específica o a una ruta de estrés. Esto explicaría por qué sólo se ha descrito un mutante nulo con un fenotipo severo (Petersen *et al.*, 2000). Además, el gran número de conexiones hace difícil interpretar los fenotipos y los datos moleculares de mutantes que sobreexpresan MAPKs. Es necesario utilizar datos obtenidos de combinar aproximaciones genéticas, genómicas y proteómicas para elucidar la función biológica de las MAPKs de plantas en una determinada ruta hormonal o de estrés.

Conclusiones

1. El análisis de la expresión en distintos órganos de *PsMAPK2* indica que esta MAP quinasa del subgrupo C1 de guisante se expresa en hoja, tallo, fruto, flor, carpelo, y principalmente en antera y raíz.
2. Se han obtenido plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan *PsMAPK2* así como versiones mutantes de pérdida y ganancia de función de *PsMAPK2*. La expresión de las tres versiones de *PsMAPK2* produce un fenotipo de esterilidad masculina, debido a que no se produce la dehiscencia de las anteras y la posterior liberación del polen. Estos resultados sugieren una posible función de *PsMAPK2* en el desarrollo de las anteras.
3. Se ha demostrado la regulación de la actividad quinasa de *PsMAPK2* en respuesta a herida así como a otras señales de estrés, tales como el ácido jasmónico, el ácido abscísico y el peróxido de hidrógeno.
4. El análisis de la expresión en distintos órganos de *AtMPK1* y *AtMPK2* indica que estas MAP quinasas del subgrupo C1 de *Arabidopsis* se expresan en hoja de roseta, tallo, silicua, flor, carpelo, antera, y principalmente en raíz.
5. El análisis de la expresión en plántulas de *AtMPK1* y *AtMPK2* indica que la luz disminuye su expresión tanto en plántulas crecidas con ciclos de luz/oscuridad como en plántulas etioladas cuando se transfieren a la luz. El estudio de la respuesta a la luz de plántulas etioladas del doble mutante *Atmpk1 Atmpk2* revela que estas

plántulas presentan una inhibición de la desetiologización con respecto a la línea silvestre, sugiriendo la participación de *AtMPK1* y *AtMPK2* en el proceso de desetiologización.

6. Por primera vez se ha demostrado la regulación de la actividad de *AtMPK1/2* en respuesta a una señal. Se ha detectado un aumento en la actividad quinasa de *AtMPK1/2* en respuesta al daño mecánico y al ácido jasmónico. El aumento en la actividad quinasa de *AtMPK1/2* tras el daño es independiente de *COII*. Otras moléculas señalizadoras de estrés como el ácido abscísico y el peróxido de hidrógeno también regulan la actividad quinasa de *AtMPK1/2*.

Bibliografía

- Abeles, F., Morgan, P. and Saltveit, M.: Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego, CA (1992).
- Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosche, M., Schlichting, R., Scheel, D. and Kangasjarvi, J.: Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* 40 (2004) 512-22.
- Ahn, N.G., Campbell, J.S., Seger, R., Jensen, A.L., Graves, L.M. and Krebs, E.G.: Metabolic labeling of mitogen-activated protein kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and threonine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 5143-7.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J. and Cowley, S.: Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 13 (1994) 1610-9.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O. and Mundy, J.: The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* 24 (2005) 2579-89.
- Apel, K. and Hirt, H.: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55 (2004) 373-99.
- App, H., Hazan, R., Zilberstein, A., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Rapp, U.: Epidermal growth factor (EGF) stimulates association and kinase activity of Raf-1 with the EGF receptor. *Mol Cell Biol* 11 (1991) 913-9.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J.: MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415 (2002) 977-83.
- Barberá, E.: Caracterización de la función de las MAP quinasas del subgrupo C1 de *Arabidopsis* en la respuesta al daño mecánico. Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia (2006).
- Bardwell, A.J., Flatauer, L.J., Matsukuma, K., Thorner, J. and Bardwell, L.: A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* 276 (2001) 10374-86.

- Benedetti, C.E., Xie, D. and Turner, J.G.: Coi1-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol* 109 (1995) 567-72.
- Benfey, P.N., Ren, L. and Chua, N.H.: Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J* 9 (1990) 1685-96.
- Berger, S., Bell, E. and Mullet, J.E.: Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiol* 111 (1996) 525-531.
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W. and Somerville, C.R.: Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304 (2004) 1494-7.
- Blazquez, M.A., Trenor, M. and Weigel, D.: Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130 (2002) 1770-5.
- Bogre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H. and Heberle-Bors, E.: A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11 (1999) 101-13.
- Bostock, R.M.: Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol* 43 (2005) 545-80.
- Bott, C.M., Thorneycroft, S.G. and Marshall, C.J.: The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett* 352 (1994) 201-5.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- Brocard-Gifford, I., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B. and Finkelstein, R.R.: The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* 16 (2004) 406-21.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J. and Mundy, J.: *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* 47 (2006) 532-46.
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W.H. 3rd, Zipursky, S.L. and Hafen, E.: A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76 (1994) 875-88.

- Burnette, W.N.: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112 (1981) 195-203.
- Calatayud, F.: Caracterización de mutantes de inserción de T-DNA de las MAP quinasas del subgrupo C1 de *Arabidopsis*. Proyecto Fin de Carrera ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia (2005).
- Calderini, O., Bogre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E. and Wilson, C.: A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 20) (1998) 3091-100.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. and Arkinstall, S.: Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280 (1998) 1262-5.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F. and Hirt, H.: Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14 (2002) 703-11.
- Casal, J.J. and Yanovsky, M.J.: Regulation of gene expression by light. *Int J Dev Biol* 49 (2005) 501-11.
- Champion, A., Picaud, A. and Henry, Y.: Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci* 9 (2004) 123-9.
- Chandra Sekhar, K.N. and Sawney, V.K.: Role of ABA in stamen and pistel development in the normal and solanifolia mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Sexual Plant Reprod* 4 (1991) 279-283.
- Chang, C.C., Ball, L., Fryer, M.J., Baker, N.R., Karpinski, S. and Mullineaux, P.M.: Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J* 38 (2004) 499-511.
- Chang, L. and Karin, M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 (2001) 37-40.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L. and Schaller, G.E.: Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277 (2002) 19861-6.
- Cheng, M., Boulton, T.G. and Cobb, M.H.: ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *J Biol Chem* 271 (1996) 8951-8.

- Chu, Y., Solski, P.A., Khosravi-Far, R., Der, C.J. and Kelly, K.: The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* 271 (1996) 6497-501.
- Clark, G.B., Thompson, G. Jr and Roux, S.J.: Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Curr Sci* 80 (2001) 170-7.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (1998) 735-43.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C.E. and Schroeder, J.I.: *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* 17 (2005) 3350-61.
- Coronado, M.J., Gonzalez-Melendi, P., Segui, J.M., Ramirez, C., Barany, I., Testillano, P.S. and Risueno, M.C.: MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *J Struct Biol* 140 (2002) 200-13.
- Cvetkovska, M., Rampitsch, C., Bykova, N. and Xing, T.: Genomic analysis of MAP kinase cascades in *Arabidopsis* defense responses. *Plant Molecular Biology Reporter* 23 (2005) 331-343.
- D'Agostino, I.B. and Kieber, J.J.: Molecular mechanisms of cytokinin action. *Curr Opin Plant Biol* 2 (1999) 359-64.
- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mou, Z. and Li, J.: Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (2006) 308-20.
- Dan, I., Watanabe, N.M. and Kusumi, A.: The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11 (2001) 220-30.
- Dard, N. and Peter, M.: Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* 28 (2006) 146-56.
- Decroocq-Ferrant, V., Decroocq, S., Van Went, J., Schmidt, E. and Kreis, M.: A homologue of the MAP/ERK family of protein kinase genes is expressed in vegetative and in female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* 27 (1995) 339-50.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T. and Turner, J.G.: Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58 (2005) 497-513.

- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R. and Fankhauser, C.: The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol* 14 (2004) 2296-301.
- Ellis, C. and Turner, J.G.: A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* 215 (2002) 549-56.
- Farmer, E.E. and Ryan, C.A.: Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 7713-6.
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R.G., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D.J., Lehrach, H., Kreuzberger, J. and Kersten, B.: High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* 4 (2005) 1558-68.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and 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. *Plant Cell* 6 (1994) 751-759.
- Frye, C.A., Tang, D. and Innes, R.W.: Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 373-8.
- Fu, S.F., Chou, W.C., Huang, D.D. and Huang, H.J.: Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, *OsMAPK4*, in response to environmental stresses. *Plant Cell Physiol* 43 (2002) 958-63.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.: Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9 (2006) 436-442.
- Gartner, A., Nasmyth, K. and Ammerer, G.: Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev* 6 (1992) 1280-92.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T. and Katagiri, F.: Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* 34 (2003) 217-28.
- Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J. and Luan, S.: Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant J* 16 (1998) 581-9.

- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P.: The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25 (1994) 989-94.
- Hall, J.P., Cherkasova, V., Elion, E., Gustin, M.C. and Winter, E.: The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a FUS3 mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 6715-23.
- Hardie, D.G.: PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50 (1999) 97-131.
- Hewitt, Y.M.: Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux (1966)
- Hill, R.D., Liu, J.H., Durnin, D., Lamb, N., Shaw, A. and Abrams, S.R.: Abscisic Acid Structure-Activity Relationships in Barley Aleurone Layers and Protoplasts (Biological Activity of Optically Active, Oxygenated Abscisic Acid Analogs). *Plant Physiol* 108 (1995) 573-579.
- Hooley, R.: Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* 26 (1994) 1529-1555.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J. and Kieber, J.J.: Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 33 (2003) 221-33.
- Huttly, A.K. and Phillips, A.L.: Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol Biol* 27 (1995) 1043-52.
- Ichimura, K.: Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7 (2002) 301-8. Notes: CORPORATE NAME: MAPK Group.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K. and Shirasu, K.: MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue specific and temperature dependent cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* (2006)
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K. and Shinozaki, K.: Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 253 (1998) 532-43.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T. and Shinozaki, K.: Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J* 24 (2000) 655-65.
- Isaccson, U. and Watermark, G.: *Anal. Chim. Acta.* 68 (1974) 339-362.

- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. and Okada, K.: The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13 (2001) 2191-209.
- Izhaki, A., Borochoy, A., Zamski, E. and Weiss, D.: Gibberellin regulates post-microsporogenesis processes in petunia anthers. *Physiol Plant* 115 (2002) 442-447.
- Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E.: Characterization of the Arrest in Anther Development Associated with Gibberellin Deficiency of the gib-1 Mutant of Tomato. *Plant Physiol* 97 (1991) 409-414.
- Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C. and Chory, J.: An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* 282 (1998) 100-3.
- Ji, X.M., Raveendran, M., Oane, R., Ismail, A., Lafitte, R., Bruskiwich, R., Cheng, S.H. and Bennett, J.: Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall invertase genes of rice at flowering. *Plant Mol Biol* 59 (2005) 945-64.
- Jin, H., Axtell, M.J., Dahlbeck, D., Ekwenna, O., Zhang, S., Staskawicz, B. and Baker, B.: NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev Cell* 3 (2002) 291-7.
- Jonak, C., Ligterink, W. and Hirt, H.: MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55 (1999) 204-13.
- Kalbina, I. and Strid, A.: The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 29 (2006) 1783-93.
- Kaneko, M., Inukai, Y., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Izawa, T., Kobayashi, Y., Hattori, T., Miyao, A., Hirochika, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M.: Loss-of-function mutations of the rice GAMYB gene impair alpha-amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell* 16 (2004) 33-44.
- Kaneko, M., Itoh, H., Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M. and Matsuoka, M.: Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants?. *Plant J* 35 (2003) 104-15.
- Kende, H. and Zeevaart, J.: The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell* 9 (1997) 1197-1210.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. and Ecker, J.R.: CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72 (1993) 427-

41.

- Kim, C.Y., Liu, Y., Thorne, E.T., Yang, H., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, R.E. and Zhang, S.: Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15 (2003) 2707-18.
- Kim, J.I., Shen, Y., Han, Y.J., Park, J.E., Kirchenbauer, D., Soh, M.S., Nagy, F., Schafer, E. and Song, P.S.: Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* 16 (2004) 2629-40.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G. and Sheen, J.: Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 2940-5.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Zeng, W. and Sheen, J.: Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395 (1998) 716-20.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R. and Sussman, M.R.: An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* 14 (2002) 1109-20.
- Kumar, D. and Klessig, D.F.: Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 13 (2000) 347-51.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- León, J., Rojo, E. and Sanchez-Serrano, J.J.: Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52 (2001) 1-9.
- León, J., Rojo, E., Titarenko, E. and Sanchez-Serrano, J.J.: Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 258 (1998) 412-9.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F. and Giraudat, J.: *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264 (1994) 1448-52.
- Li, Q.H. and Yang, H.Q.: Cryptochrome Signaling in Plants. *Photochem Photobiol* (2006)
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A. and Davis, R.J.: cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72 (1993) 269-78.

- Liu, A.X., Zhang, S.B., Xu, X.J., Ren, D.T. and Liu, G.Q.: Soluble expression and characterization of a GFP-fused pea actin isoform (PEAc1). *Cell Res* 14 (2004a) 407-14.
- Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P.: Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* 38 (2004b) 800-9.
- Liu, Y. and Zhang, S.: Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (2004) 3386-99.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. and Solano, R.: JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (2004) 1938-50.
- Lorenzo, O. and Solano, R.: Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2005) 532-40.
- Lu, C., Han, M.H., Guevara-Garcia, A. and Fedoroff, N.V.: Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 15812-7.
- Luan, S.: Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54 (2003) 63-92.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D. and Somerville, C.: A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116 (2004) 109-19.
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H. and Deng, X.W.: Organ-specific expression of *Arabidopsis* genome during development. *Plant Physiol* 138 (2005) 80-91.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Markus Lange, B., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G. and Browse, J.: Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J* 46 (2006) 984-1008.
- Marcote, M.J. and Carbonell, J.: Transient expression of a pea MAP kinase gene induced by gibberellic acid and 6-benzyladenine in unpollinated pea ovaries. *Plant Mol Biol* 44 (2000) 177-86.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G.: Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54 (2003) 23-61.
- Matsuda, S., Kosako, H., Takenaka, K., Moriyama, K., Sakai, H., Akiyama, T., Gotoh, Y. and Nishida, E.: *Xenopus* MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO J* 11 (1992) 973-82.

- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K., Fukami, Y., Kikkawa, U. and Yasuda, T.: Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J* 29 (2002) 637-47.
- Mauch-Mani, B. and Mauch, F.: The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2005) 409-14.
- Mayrose, M., Bonshtien, A. and Sessa, G.: LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *J Biol Chem* 279 (2004) 14819-27.
- McConn, M. and Browse, J.: The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant. *Plant Cell* 8 (1996) 403-416.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. and Browse, J.: Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 5473-5477.
- Menke, F.L., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M. and Klessig, D.F.: Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (2004) 897-907.
- Meskiene, I., Bogre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstotter, M., Zwerger, K., Ammerer, G. and Hirt, H.: MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 1938-43.
- Meyer, K., Leube, M.P. and Grill, E.: A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264 (1994) 1452-5.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y. and Ellis, B.E.: RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ Pollut* 138 (2005) 230-7.
- Mishra, N.S., Tuteja, R. and Tuteja, N.: Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* 452 (2006) 55-68.
- Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H. and Shinozaki, K.: Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J* 5 (1994) 111-22.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K. and Shinozaki, K.: Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* 15 (1997) 15-9.

- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. and Shinozaki, K.: A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996) 765-9.
- Mockaitis, K. and Howell, S.H.: Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. Plant J 24 (2000) 785-96.
- Mori, I.C. and Muto, S.: Abscisic Acid Activates a 48-Kilodalton Protein Kinase in Guard Cell Protoplasts. Plant Physiol 113 (1997) 833-839.
- Morris, P.C., Guerrier, D., Leung, J. and Giraudat, J.: Cloning and characterisation of MEK1, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. Plant Mol Biol 35 (1997) 1057-64.
- Morrison, D.K. and Davis, R.J.: Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. Annu Rev Cell Dev Biol 19 (2003) 91-118.
- Murray, F., Kalla, R., Jacobsen, J. and Gubler, F.: A role for HvGAMYB in anther development. Plant J 33 (2003) 481-91.
- Nakagami, H., Pitzschke, A. and Hirt, H.: Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends Plant Sci 10 (2005) 339-46.
- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K. and Machida, Y.: Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). Plant J 12 (1997) 39-48.
- Nishihama, R., Ishikawa, M., Araki, S., Soyano, T., Asada, T. and Machida, Y.: The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. Genes Dev 15 (2001) 352-63.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S. and Palva, E.T.: Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. Mol Plant Microbe Interact 13 (2000) 430-8.
- Novikova, G.V., Moshkov, I.E., Smith, A.R. and Hall, M.A.: The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 474 (2000) 29-32.
- Oellers, N. and Hafen, E.: Biochemical characterization of rolledSem, an activated form of *Drosophila* mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 271 (1996) 24939-44.

- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.I. and Choi, G.: Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J* 47 (2006) 124-39.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D. and Hirt, H.: A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J* 22 (2003) 1282-8.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr and Kangasjarvi, J.: Ozone-sensitive *Arabidopsis* rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12 (2000) 1849-62.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A. and Feyereisen, R.: A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31 (2002) 1-12.
- Parker, J.E. and Coleman, M.J.: Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends Biochem Sci* 22 (1997) 291-6.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. and Sturgill, T.W.: Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10 (1991) 885-92.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22 (2001) 153-83.
- Pedley, K.F. and Martin, G.B.: Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2005) 541-7.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. and Harberd, N.P.: The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11 (1997) 3194-205.
- Perez-Amador, M.A., León, J., Green, P.J. and Carbonell, J.: Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130 (2002) 1454-63.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B. and Mundy, J.: *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103 (2000) 1111-20.

- Pitzschke, A. and Hirt, H.: Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol* 141 (2006) 351-6.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J.R.: Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353 (1991) 670-4.
- Raman, M. and Cobb, M.H.: MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* 13 (2003) R886-8.
- Ramirez, C., Testillano, P.S., Pintos, B., Moreno-Risueno, M.A., Bueno, M.A. and Risueno, M.C.: Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *Eur J Cell Biol* 83 (2004) 213-25.
- Ren, D., Yang, H. and Zhang, S.: Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277 (2002) 559-65.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H. and Knight, M.R.: OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427 (2004) 858-61.
- Robinson, M.J., Harkins, P.C., Zhang, J., Baer, R., Haycock, J.W., Cobb, M.H. and Goldsmith, E.J.: Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 35 (1996) 5641-6.
- Rojo, E., León, J. and Sanchez-Serrano, J.J.: Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 20 (1999) 135-142.
- Rojo, E., Solano, R. and Sanchez-Serrano, J.J.: Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J Plant Growth Regul* 22 (2003) 82-98.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. and Jones, J.D.: Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11 (1999) 273-87.
- Samaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bogre, L., Baluska, F. and Hirt, H.: Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* 21 (2002) 3296-306.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. New York, 1989.

- Samuel, M.A. and Ellis, B.E.: Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14 (2002) 2059-69.
- Samuel, M.A., Miles, G.P. and Ellis, B.E.: Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J* 22 (2000) 367-76.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W. and Goldberg, R.B.: The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12 (2000) 1041-61.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 5463-7.
- Segui-Simarro, J.M., Testillano, P.S., Jouannic, S., Henry, Y. and Risueno, M.C.: Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochem Cell Biol* 123 (2005) 541-51.
- Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.P., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Nambara, E.: Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* (2006).
- Seo, S., Sano, H. and Ohashi, Y.: Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11 (1999) 289-98.
- Seth, A., Gonzalez, F.A., Gupta, S., Raden, D.L. and Davis, R.J.: Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 267 (1992) 24796-804.
- Sharrocks, A.D., Yang, S.H. and Galanis, A.: Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* 25 (2000) 448-53.
- Shen, W.J. and Forde, B.G.: Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 83-85.
- Shen, Y., Kim, J.I. and Song, P.S.: NDPK2 as a signal transducer in the phytochrome-mediated light signaling. *J Biol Chem* 280 (2005) 5740-9.
- Shibata, W., Banno, H., Ito, Y., Hirano, K., Irie, K., Usami, S., Machida, C. and Machida, Y.: A tobacco protein kinase, NPK2, has a domain homologous to a domain found in activators of mitogen-activated protein kinases (MAPKKs). *Mol Gen Genet* 246 (1995) 401-10.

- Shiina, N., Gotoh, Y. and Nishida, E.: A novel homo-oligomeric protein responsible for an MPF-dependent microtubule-severing activity. *EMBO J* 11 (1992) 4723-31.
- Sopory, S.K. and Munshi, M.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1998) 245-318.
- Soyano, T. and Machida, Y.: [Regulation of plant cytokinesis: a role of kinesin-like proteins and a MAP kinase cascade]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 48 (2003) 1683-92.
- Staswick, P.E., Su, W. and Howell, S.H.: Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 6837-40.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. and Wasternack, C.: Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51 (2003) 895-911.
- Stintzi, A. and Browse, J.: The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 10625-30.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. and Farmer, E.E.: Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 12837-42.
- Swain, S.M., Muller, A.J. and Singh, D.P.: The *gar2* and *rga* alleles increase the growth of gibberellin-deficient pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134 (2004) 694-705.
- Tárrega, C., Blanco-Aparicio, C., Munoz, J.J. and Pulido, R.: Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP. *J Biol Chem* 277 (2002) 2629-36.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L. and Hirt, H.: The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 15 (2004) 141-52.
- Tena, G. and Renaudin, J.P.: Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. *Plant J* 16 (1998) 173-82.
- Thornton, T.M., Swain, S.M. and Olszewski, N.E.: Gibberellin signal transduction presents ellipsis to the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* 4 (1999) 424-428.

- Titarenko, E., Rojo, E., León, J. and Sanchez-Serrano, J.J.: Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 115 (1997) 817-26.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L.: Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8 (2005) 397-403.
- Tseng, T.S., Salome, P.A., McClung, C.R. and Olszewski, N.E.: SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell* 16 (2004) 1550-63.
- Turner, J.G., Ellis, C. and Devoto, A.: The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 Suppl (2002) 153-64.
- Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K. and Paszkowski, J.: Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J* 21 (2002) 6483-93.
- Ulm, R., Revenkova, E., di Sansebastiano, G.P., Bechtold, N. and Paszkowski, J.: Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15 (2001) 699-709.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G. and Thomashow, M.F.: Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J* 41 (2005) 195-211.
- Voronin, V., Aionesei, T., Limmongkon, A., Barinova, I., Touraev, A., Lauriere, C., Coronado, M.J., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Heberle-Bors, E. and Wilson, C.: The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS Lett* 560 (2004) 86-90.
- Vreugdenhil, D. and Sergeeva L.L.: Gibberellin and tuberization in potato. *Potato Research* 42 (1999) 471-481.
- Wang, Z., Liang, Y., Li, C., Xu, Y., Lan, L., Zhao, D., Chen, C., Xu, Z., Xue, Y. and Chong, K.: Microarray analysis of gene expression involved in anther development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58 (2005) 721-37.
- Whitehead, T.P.: *Clin. Chem.* 25 (1979) 1531-1546.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J.: Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23 (1998) 481-5.
- Wilson, C., Eller, N., Gartner, A., Vicente, O. and Heberle-Bors, E.: Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. *Plant Mol Biol* 23 (1993) 543-51.

- Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenon, A.R., Connolly, M.L. and Lerner, R.A.: The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37 (1984) 767-78.
- Xiao, S., Dai, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W. and Xie, D.: COS1: an *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16 (2004) 1132-42.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G.: COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280 (1998) 1091-4.
- Xiong, L. and Yang, Y.: Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15 (2003) 745-59.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. and Xie, D.: The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 (2002) 1919-35.
- Xu, Q., Fu, H.H., Gupta, R. and Luan, S.: Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10 (1998) 849-57.
- Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S.N., Bhatia, S. and Chattopadhyay, S.: A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* 17 (2005) 1953-66.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D. and Doke, N.: *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15 (2003) 706-18.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T. and Shinozaki, K.: Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiol* 42 (2001) 1012-6.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.: The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 7225-30.
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L. and An, L.: Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem* 44 (2006) 274-283.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.: GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136 (2004) 2621-32.