



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Estudi dels mecanismes moleculars
de la regulació de la SUMOilació i
les seves implicacions biològiques**

Abraham Mas Garcia

Barcelona, 2017

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Biologia Vegetal, Biologia Animal i d'Ecologia

Programa de doctorat de Biologia i Biotecnologia Vegetal

Estudi dels mecanismes moleculars de la regulació de la SUMOilació i les seves implicacions biològiques

Tesi doctoral presentada per Abraham Mas Garcia per optar al títol de doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha sigut realitzat al Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) i ha estat finançat pel Ministeri d'Educació, Ciència i Cultura amb la beca per a la formació de personal universitari amb referència FPU 2012/05292.

La directora de tesi

Tutora de la Tesi

L'autor

Dra. L.María Lois Rojas

Dra. María Carmen Martínez Gómez

Abraham Mas Garcia



ÍNDEX

| | |
|--|-----|
| INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1. La importància de les modificacions postraduccionals..... | 1 |
| 2. La Ubiquitina i la superfamília de les UBLs..... | 1 |
| 3. La Ubiquitina i SUMO | 2 |
| 4. Les implicacions moleculars de la SUMOilació..... | 4 |
| 5. El cicle de SUMOilació | 6 |
| 6. Els components de la maquinària de conjugació en Arabidopsis | 9 |
| 7. La identificació de substrats de SUMO..... | 16 |
| 8. Les implicacions biològiques de la SUMOilació en les plantes | 19 |
| 9. La regulació del cicle de SUMOilació..... | 40 |
| 10. L'expressió del domini SAE2 ^{UFDct} com a eina molecular per a l'estudi de la SUMOilació..... | 44 |
| | |
| OBJECTIUS | 49 |
| | |
| CAPÍTOL 1. Caracterització molecular i funcional del processament del SAE2. | 50 |
| 1. Caracterització molecular del processament del SAE2 | 50 |
| 2. La localització subcel·lular de l'enzim activador de SUMO (E1) està regulada mitjançant el processament del extrem C-terminal del SAE2. | 57 |
| 3. Desenvolupament de eines moleculars per a l'estudi de la funció biològica del processament del SAE2..... | 79 |
| 4. Anàlisi de l'efecte de l'enriquiment citosòlic del SAE2 en el desenvolupament d'Arabidopsis..... | 89 |
| 5. Anàlisi de l'efecte de l'expressió de diferents variants del SAE2 en les respostes a estrès abiòtic. | 108 |

| | |
|---|----------------|
| CAPÍTOL 2. Noves perspectives en l'estudi de la SUMOilació i les seves implicacions biològiques..... | 115 |
| 1. Anàlisi de la regulació circadiària de la maquinària de SUMOilació | 115 |
| 2. El processament del SAE2 durant el desenvolupament de la flor..... | 119 |
| 3. Caracterització funcional de la SUMOilació en les respostes de defensa a patògens necròtrofs..... | 122 |
| DISCUSSIÓ..... | 128 |
| CONCLUSIONS..... | 145 |
| MATERIAL I MÈTODES | 146 |
| BIBLIOGRAFIA | 175 |
| ANEX 1. | |
| Quantitative Analysis of Subcellular Distribution of the SUMO Conjugation System by Confocal Microscopy Imaging..... | 197 |
| ANEX 2. | |
| <i>SUMOylation inhibition Mediated by Disruption of SUMO E1-E2 Interactions Confers Plant Susceptibility to Necrotrophic Fungal Pathogens</i> | <i>198</i> |

INTRODUCCIÓ

1. La importància de les modificacions postraduccionals

Els éssers vius utilitzen una gran varietat de modificadors químics per tal de controlar l'activitat de les proteïnes. De fet, l'estructura i funció de les proteïnes ve donada no únicament per l'estructura primària d'aminoàcids dictada per la seqüència aminoacídica dels gens, sinó també pels canvis químics que modifiquen les proteïnes un cop sintetitzades. Aquesta modificació de l'estructura de les proteïnes pot tenir lloc mitjançant l'adició de petites molècules (fosfats, metils, acetils, lípids, glúcids i petits polipèptids) en un procés conegut com a modificació postraduccional (PTM) (Kerscher et al. 2006; Vertegaal 2011). Totes aquestes modificacions resulten en diferents topologies i activitats de les proteïnes madures i per tant incrementen enormement tot el repertori de proteïnes cel·lulars diferents, la qual cosa permet una gran font de variació mes enllà del que ve determinada per l'ADN o la variació dels nivells d'ARN. Aquesta modulació de l'activitat proteica mitjançant PTMs és essencial per al funcionament dels organismes, particularment durant canvis sobtats dels factors ambientals, on les respostes fisiològiques sovint ocorren de forma ràpida i reversible (Kerscher et al. 2006; Vierstra 2012), la qual cosa ofereix una apassionant repte per als estudis que intentin caracteritzar i correlacionar molecular i fenotípicament aquestes modificacions (Elrouby 2015).

En aquest context, aquesta tesi es centra en l'estudi de la regulació i les implicacions biològiques de SUMO (en anglès *Small Ubiquitin-like MOdifier*), un polipèptid globular amb estructura similar a la ubiquitina que modifica covalentment altres proteïnes en les cèl·lules eucariotes.

2. La Ubiquitina i la superfamília de les UBLs

El concepte que descriu el fet que un polipèptid s'uneix covalentment a un altre després de la finalització de la traducció, va ser descrit per primer cop fa uns 40 anys amb els treballs de Hershko, Ciechanover, Rose i col·laboradors (Hershko et al. 2000) i

guardonat amb el premi nòbel de química l'any 2004. La ubiquitina, la primera proteïna identificada com a modificador postraduccional en eucariotes (Goldstein et al. 1975), està present en diferents teixits i organismes, per això el seu nom. La ubiquitina està altament conservada entre les espècies; consta de 76 aminoàcids i té un pes molecular d'uns 8.5kDa (figura 1). Aquesta modificació es reversible i resulta d'una cascada enzimàtica conservada, bioquímicament ben caracteritzada: la ubiquitinació. La unió de la ubiquitina, en general, determina la degradació dels seus substrats via proteosoma, la qual cosa permet la regulació de la vida mitjana de les proteïnes (Hershko et al. 2000). Des del seu descobriment, tota una família sencera de petites proteïnes relacionada amb la Ubiquitina ha sigut descrita i nomenada com "Ubiquitin like proteins" (UBLs). Fins a 12 proteïnes UBLs diferents han sigut caracteritzades i s'ha postulat que regulen diversos aspectes de l'activitat cel·lular mitjançant la modulació de la estructura i funció dels seus substrats (Hochstrasser 2009; Vierstra 2012). Tot i compartir una baixa similitud en les seves seqüències primàries aminoacídiques, les UBLs comparteixen la estructura tridimensional (plegament β -grasp), així com cascades enzimàtiques similars que permeten la seva conjugació i desconjugació als seus substrats, la qual cosa suggereix que molt probablement tenen un origen antic comú (Vierstra, 2012). De fet, es pensa que ja el primer ancestre comú dels eucariotes ja presetava aquests modificadors postraduccionals (Grau-Bové et al. 2015).

3. La Ubiquitina i SUMO

SUMO (Small-Ubiquitin related MOdifier) és una proteïna de la família de les UBLs que va ser descoberta en 1996 (Matunis et al. 1996). Va ser identificada en cèl·lules de mamífers quan s'estudiava el funcionament del transport nuclear actiu per mitjà de la proteïna RanGAP. Mitjançant l'ús d'anticossos específics que reconeixien la RanGAP, es van identificar dues formes d'aquest enzim que tan sols es diferenciaven en uns 20kDa. Les seqüències peptídiques obtingudes confirmaren que es tractava de la RanGAP més altres seqüències peptídiques no identificades fins aleshores. Aquestes seqüències peptídiques presentaven un 18% de similitud amb la ubiquitina (Matunis et al. 1996). L'experiment clau va ser la incubació de la proteïna recombinant RanGAP amb l'extracte cel·lular de les cèl·lules HeLa junt amb l'ATP; a l'hora d'analitzar el producte

obtingut, es va apreciar un canvi de massa molecular de la RanGAP, la qual cosa indicava que aquesta proteïna era modificada postraduccionalment per un altra i va ser batejada amb el nom de SUMO (Mahajan et al. 1997). Així va ser com es va donar a conèixer una nova proteïna, SUMO, que presenta una estructura i cicle de conjugació similar al de la ubiquitina, encara que difereixen en la seva funció. Mentre que la ubiquitina està relacionada amb la regulació de la vida mitja de les proteïnes, la funció de SUMO és variable i dependent de la proteïna modificada. SUMO s'ha associat a diferents processos: manteniment de la cromatina, reparació del DNA, transport subcel·lular, regulació transcripcional i senyalització cel·lular (Hay 2005).

Encara que tan sols presenten un 18% de similitud de seqüència, la ubiquitina i SUMO comparteixen una estructura terciària ben conservada denominada Ub-fold (UFD) caracteritzada per un plegament de fulles β entorn d'una hèlix α ($\beta\beta\alpha\beta\beta$) (Bayer et al. 1998). Aquest domini UFD, també anomenat β -grasp, està altament conservat entre les UBLs, per la qual cosa les estructures tridimensionals de SUMO i la ubiquitina es poden superposar (**Figura 1**).

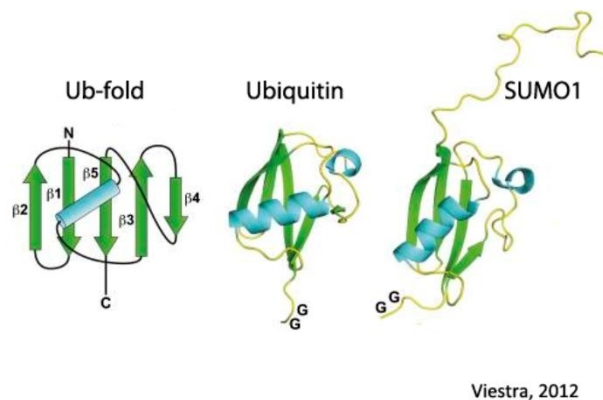


Figura 1. Diagrama de l'estructura tridimensional de la Ubiquitina y SUMO. A l'esquerra, es mostra l'estructura esquemàtica del domini Ub-fold (UFD), $\beta\beta\alpha\beta\beta$, en el qual les fulles β es disposen en torn a l'hèlix α orientada diagonalment. A continuació, es mostra l'estructura de la Ubiquitina y SUMO humans.

SUMO a diferència de la ubiquitina consta d'uns 20 aminoàcids addicionals en l'extrem amino terminal que dona lloc a un extrem N-terminal flexible. Ambdues proteïnes tenen un nucli hidròfob, mentre que la càrrega superficial de l'enzim es

diferència significativament en ambdues, el que pot influir en el seu mecanisme d'acció (Bayer et al. 1998). La unió a altres proteïnes ve donada per la formació d'un enllaç covalent que té lloc entre la glicina de l'extrem C-terminal de les UBLs i un residu de lisina del substrat; donant lloc a un enllaç peptídic. La conjugació de les UBLs es dona mitjançant una cascada enzimàtica similar a la ubiquitina, encara que cadascun dels enzims que participen són únics per cada sistema (Kerscher et al. 2006).

4. Les implicacions moleculars de la SUMOilació

Encara que les conseqüències funcionals de la unió de SUMO al substrat són difícils de predir, de manera general podem dir que la unió ocasiona almenys cinc efectes diferents no excluyents entre ells:

1. **La modificació per SUMO pot afectar la localització subcel·lular de la proteïna diana.** La proteïna RanGAP1, una proteïna associada al complex del porus nuclear, va ser el primer substrat de SUMO que va ser descrit (Matunis et al. 1996). Estudis d'import nuclear en cèl·lules de mamífer duts a terme per Matunis i col·laboradors van descriure com aquesta modificació direcciona RanGAP1 des del citosol cap al complex del porus nuclear on és requerit per l'import nuclear de proteïnes, activant l'activitat GTPasa de la proteïna transportadora citosol/nuclear Ran (Mahajan et al. 1997; Mahajan et al. 1998).
2. **La modificació per SUMO pot generar un nou lloc d'interacció** capaç de reclutar altres macromolècules, mitjançant interaccions no covalents amb SUMO mediades pels motius SIMs (SUMO interacting motifs). Els SIMs interactuen no covalentment amb SUMO i es caracteritzen per un nucli hidròfob flanquejat per aminoàcids àcids o que es poden fosforilar (majoritàriament serines, Ser) (Song et al. 2004). Per exemple, la sumoilació de la RanGAP promou la interacció amb RanBP2; RanBP2 té dos motius SIMs en l'extrem carboxi terminal que promou l'unió al complex SUMO-RanGAP i la relocalització d'aquest complex al porus nuclear (Werner et al. 2012).

3. **La SUMOilació del substrat pot interferir en la capacitat d'interacció amb altres enzims.** Per exemple, és la modificació per SUMO de la lisina 14 de l'enzim conjugador de la ubiquitina E2-25K, la que resulta en la inhibició de la interacció entre els enzims activador i conjugador de la ubiquitina i per tant disminuint la capacitat d'ubiquitinació dels substrats (Pichler et al. 2005).
4. **La SUMOilació pot donar lloc a un canvi conformacional de la proteïna diana.** Suposant que el substrat tingui un motiu SIM, es pot donar una interacció intramolecular entre SUMO i el motiu SIM de la proteïna modificada resultant en un canvi de conformació de la proteïna (Kerscher et al. 2006). Aquest és el cas de l'enzim TDG (thymine DNA glycosylase), que s'uneix al DNA amb la finalitat de reparar errors. La sumoilació de TDG dona lloc a un canvi conformacional d'aquesta proteïna mitjançant la interacció del SUMO unit covalentment i el motiu SIM de TDG, el que permeten l'alliberació de TDG del DNA per començar una nova reparació de DNA (Hardeland et al. 2002).
5. **La ubiquitinació dependent de SUMOilació.** Alternativament al reciclatge de SUMO a través de la desconjugació mitjançant les seves proteases específiques, es poden unir altres SUMO addicionals i formar cadenes de poli-SUMO que actuen com a dominis d'unió a un grup de lligases E3 de ubiquitina denominades STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases). (Uzunova et al. 2007; Xie et al. 2007; Tatham et al. 2008). Les STUbLs s'uneixen a les cadenes de poliSUMO de forma no covalent a través dels seus múltiples dominis d'interacció a SUMO la qual cosa permet la seva dimerització, una característica essencial per a la seva activitat i eventual poliubiquitinació tant de SUMO (Plechanovová et al. 2012; Y. Xu et al. 2014). Aquesta poliubiquitinació de SUMO pot ser després senyalitzada per la seva degradació a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Uzunova et al. 2007; Xie et al. 2007; Tatham et al. 2008). (**Figura 2**).

5. El cicle de SUMOilació

La conjugació de SUMO a un substrat es dona mitjançant una cascada enzimàtica denominada SUMOilació, similar a la de la ubiquitinació. Aquesta via consta de tres etapes on participen tres enzims: l'enzim activador de SUMO (E1) que catalitza la primera etapa d'activació, l'enzim conjugador de SUMO (E2) que és capaç de transferir SUMO al substrat, i l'enzim lligasa de SUMO (E3) que facilita l'etapa final de la lligació a la proteïna diana.

Com la ubiquitina, SUMO es sintetitza com a precursor i la seva maduració és necessària per que sigui actiu. Són les proteases específiques de SUMO (ULp, Ubiquitin like proteases) les que duen a terme la seva maduració, deixant exposat el motiu diglicina a l'extrem C-terminal, necessari per la conjugació de SUMO al substrat. Seguidament, SUMO és activat mitjançant una reacció depenent d'ATP catalitzada per l'enzim activador de SUMO, E1, un heterodímer format per dues subunitats, la subunitat gran SAE2 i la subunitat petita SAE1. En aquesta etapa l'enzim activador catalitza la hidròlisi de l'ATP per donar lloc a un SUMO adenilat (SUMO-AMP). A continuació l'AMP es alliberat del SUMO adenilat i es genera un enllaç tioèster entre el grup carboxil de la glicina de SUMO i el grup sulfhidril de la cisteïna activa de l'E1, situada a la subunitat gran SAE2 (SUMO-SAE2/SAE1)(Johnson 2004). En la etapa de conjugació, el SUMO activat es transferit des del SAE2 a una cisteïna de l'enzim conjugador, E2, mitjançant una reacció de transesterificació (SUMO-E2). Finalment, en el pas de lligació, SUMO s'uneix a la proteïna diana mitjançant un enllaç isopeptídic entre la glicina de l'extrem C-terminal de SUMO i la lisina del substrat del motiu consens, Ψ KXE/D (Ψ , residu alifàtic; L, lisina; X, qualsevol aminoàcid; E/D glutamat o aspartat) (Rodríguez et al. 2001). En l'etapa de lligació participen els enzims E3 ligases, els quals faciliten la transferència de SUMO des de l'E2 al substrat *in vitro* i *in vivo* (Johnson & Gupta 2001; Pichler et al. 2002); encara que s'ha demostrat que les proteïnes recombinants E1, E2 i SUMO són suficients per la conjugació *in vitro* (Castaño-Miquel et al. 2011; Bernier-Villamor et al. 2002). La modificació per SUMO és reversible i la desumoilació ve donada per l'acció de les mateixes proteases (ULPs) que intervenen en la maduració de SUMO. En aquesta etapa SUMO es recicla i torna a actuar com a modificador postraduccional (**Figura 2**).

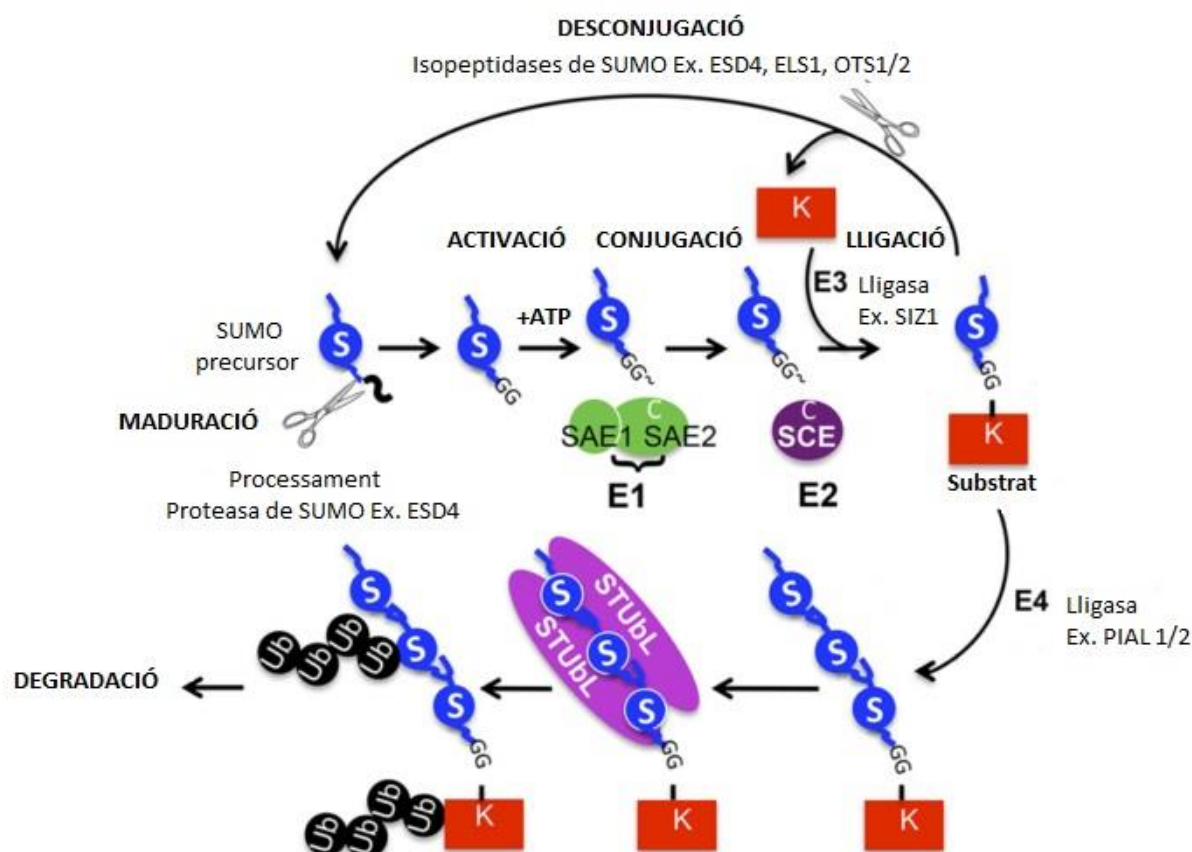


Figura 2. El cicle de SUMOilació i desumoiació. MADURACIÓ: SUMO es sintetitza com precursor amb una extensió C-terminal que és processada. Les proteases específiques de SUMO, també denominades ULPs (Ubiquitin-Like Proteases) tallen la cua C-terminal i deixen exposat el motiu glicina-glicina. ACTIVACIÓ (E1): SUMO és activat per l'heterodímer E1 o enzim activador (SAE1 i SAE2) que catalitza la hidròlisi d'ATP per formar SUMOAMP. Posteriorment, AMP és alliberat de SUMO amb la formació d'un enllaç tioèster d'alta energia entre el grup carboxil de la G terminal de SUMO i el grup sulfidril de la cisteïna catalítica del SCE1 (E2). CONJUGACIÓ (E2): SUMO és transferit a una cisteïna de E2 o enzim conjugador (SCE1) per transesterificació catalitzada per SCE1. LLIGACIÓ (E3): SUMO és transferit al grup ε-amino de la cadena lateral de la lisina (K) de la seqüència consens Ψ KXE/D (Ψ , residu gran i hidrofòbic, X, qualsevol aminoàcid, E/D, àcid glutàmic/àcid aspàrtic,) de la proteïna diana. En aquest procés pot participar una E3 lligasa de SUMO. DESCONJUGACIÓ: Una proteasa específica de SUMO amb activitat isopeptidasa trenca l'enllaç isopeptídic i SUMO és reciclat per al sistema de conjugació. DEGRADACIÓ DE SUMO: Alternativament, es poden formar cadenes de SUMO a partir del substrat sumoilat mitjançant les lligases de SUMO (E4), i aquestes cadenes recluten les STUbLs, les quals ubiquitinuen SUMO i el senyalitzen per la seva degradació via proteosoma 26S. S, SUMO; Ub, ubiquitina. Figura modificada de (Elrouby 2015)

A diferència d'altres modificadors postraduccionals similars a la ubiquitina, SUMO presenta cert grau d'especificitat en la seva conjugació i sovint s'uneix al motiu consens canònic [IV]KXE, però també pot ocórrer en motius alternatius o motius no consens (Hendriks & Vertegaal 2016). De fet, a més dels 4 aminoàcids canònics que conformen el motiu consens de SUMOilació s'han identificat altres: el motiu consens invertit (Matic et al. 2010), el motiu hidrofòb de sumoilació (Matic et al. 2010), i el motiu consens de SUMO depenent de càrrega negativa (Yang et al. 2006). La majoria d'aquests motius de SUMOilació es troben exposats a la superfície del substrat que facilita el seu reconeixement per l'enzim conjugador i les lligases de SUMO (**Taula 1**)

| | Seqüència consens |
|------------------------------------|--------------------------|
| Motiu canònic | [IV]-K-X-E |
| Motiu hidrofòb | [VIP]-X-[IV]-K-X-E |
| Motiu carregat negativament | K-X-E-X-[ED] *5 |
| Motiu invertit | [ED]-X-K |

Taula1. Motius consens de SUMOilació. Els residus hidrofòbics (en gris) i els carregats negativament (en vermell) optimitzen el motiu bàsic. Els parèntesis indiquen que qualsevol dels residus poden estar presents; s'indica la lisina modificada per SUMO (blau). *5, un tram de 5 residus de Glu i/o Asp, . Figura modificada de (Hendriks & Vertegaal 2016).

6. Els components de la maquinària de conjugació en *Arabidopsis thaliana*

Per tal d'entendre la regulació i la rellevància biològica de la SUMOilació en plantes, s'ha escollit com a model d'estudi *Arabidopsis thaliana*. Treballs anteriors fent servir *Arabidopsis thaliana* com a model, han permès l'estudi bioquímic dels enzims implicats en aquesta via i dur a terme estudis de guany o pèrdua de funció, permetent caracteritzar els mecanismes de regulació d'aquesta modificació i les seves implicacions biològiques.

SUMO

En llevat, dípters y nemàtodes existeix tan sols un gen que codifica per SUMO, mentre que en vertebrats i plantes hi ha una família de gens que codifiquen per a SUMO. En el genoma d'*Arabidopsis thaliana* hi ha fins a vuit gens que codifiquen per les diferents isoformes de SUMO. Encara que tan sols s'han detectat nivells d'expressió significatius per AtSUMO1,2,3 i 5. AtSUMO1 i AtSMO2 estan altament conservats, presenten un 89% d'identitat de seqüència; mentre que AtSUMO3 i AtSUMO5 presenten un 42% i 30% d'identitat de seqüència amb AtSUMO1, respectivament (Kurepa et al. 2003)

Els alineaments de seqüència amb els seus ortòlegs humans, llevat i *Drosophila*, mostren que la regió més conservada es troba en la regió UFD i la més divergent correspon al N-terminal de SUMO (Kurepa et al. 2003). L'expressió *in vivo* d'AtSUMO1/2 i AtSUMO3 s'ha demostrat mitjançant anticossos que reconeixien ambdós proteïnes (Kurepa et al. 2003; Lois et al. 2003) mentre que AtSUMO5 tan sols ha pogut ser detectat *in vivo* en plantes sobreexpressores de AtSUMO5 (Budhiraja et al. 2009)

L'estudi dels paràlogs de SUMO en *Arabidopsis* ha posat de manifest que han adquirit distintes propietats moleculars i funcionals. En plantes, AtSUMO1 i 2 son capaces de formar cadenes de SUMO mentres que AtSUMO3 i 5 no contenen el motiu de SUMOilació (Colby 2006; Budhiraja et al. 2009). A més, les proteases de SUMO presenten una baixa capacitat isopeptidasa davant AtSUMO3 i una alta capacitat de desconjugació de conjugats de AtSUMO1 i 2 (Chosed et al. 2006).

Mitjançant anàlisis genètics s'ha determinat el paper essencial d'AtSUMO1 i 2, el

doble mutant *atsumo1/atsumo2* és letal causant l'arrest del desenvolupament de l'embrió en les primeres etapes, la qual cosa indica que *AtSUMO3* i *5* no son capaces de complementar la funció biològica d'*AtSUMO1* i *2* (Saracco et al. 2007).

S'ha observat una acumulació diferencial de conjugats dels paràlegs de SUMO en resposta a diferents tipus d'estrès (estrès tèrmic, peròxid d'hidrogen i etanol), observant-se una ràpid augment de conjugats de *AtSUMO1* i *2* mentres que no s'observa amb *AtSUMO3* (Kurepa et al. 2003). Aquesta especialització diferencial dels paràlegs de SUMO en *Arabidopsis* es veu reforçada per una diferent localització i abundància de les proteïnes espacial-temporal (van den Burg et al. 2010). *In vitro*, *AtSUMO1*, *2*, *3* i *5*, presenten una taxa de conjugació diferencial. Així, *AtSUMO1/2* són les isoformes que es conjuguen amb una major eficiència, mentre que *AtSUMO3* ho fa amb una taxa quatre vegades inferior i, per *AtSUMO5*, presenta una conjugació molt ineficient (Castaño-Miquel et al. 2011)

La interacció no covalent entre SUMO i el seu corresponent enzim conjugador és característica del sistema de SUMOilació. Aquest fet és important si tenim en compte que les diferents isoformes de SUMO també es diferencien en la seva capacitat per interaccionar de manera no covalent amb l'enzim conjugador de SUMO *AtSCE1*. Les isoformes amb una major taxa de conjugació, *AtSUMO1/2*, són competents per interaccionar amb *AtSCE1* en assajos de doble híbrid, però aquesta capacitat no està conservada ni en *AtSUMO3* ni *AtSUMO5* (Castaño-Miquel et al. 2011).

L'enzim E1 activador de SUMO

L'enzim activador de SUMO és l'encarragat de dur a terme la reacció d'adenilació, que permet l'activació de SUMO i la seva posterior transferència a l'enzim conjugador. La cristal·lització de l'enzim activador de la ubiquitina, SUMO i Nedd8 ha revelat que existeix un model estructural conservat per l'enzim E1 (Lois & Lima 2005; Lee & Schindelin 2008; Walden et al. 2003). En contrast amb l'enzim activador de la ubiquitina que és un monómer, la del SUMO es un heterodímer que conserva els dominis estructurals i funcionals de l'enzim activador de la ubiquitina. Aquest heterodímer està formada per dos subunitats: la subunitat gran (SAE2) i la subunitat petita (SAE1).

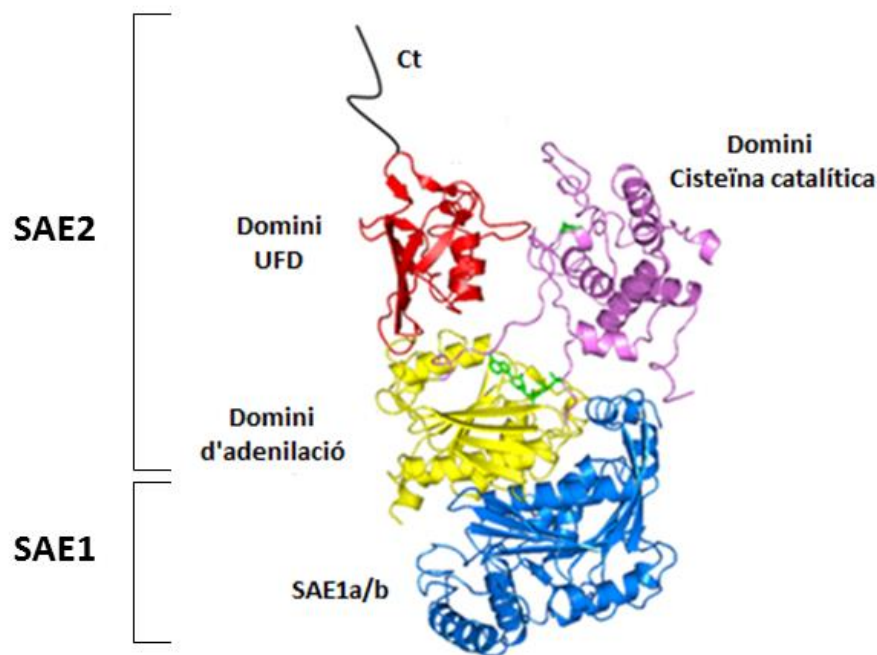


Figura 3. Estructura de l'enzim activador de SUMO. Diagrama del complex SAE1/SAE2-SUMO-Mg-ATP. Els dominis del SAE2 es troben representats en diferents colors: roig per al domini UFD, magenta para el domini de la cisteïna catalítica y rosa pàlid per al domini d'adenilació. La cisteïna catalítica activa esta ressaltada en groc. La subunitat petita SAE1 es troba representada en blau y finalment SUMO en groc. Figura modificada de (Lois & Lima 2005).

La subunitat gran (SAE2) consta de 4 dominis funcionals: el domini d'adenilació, el de la cisteïna catalítica, el ubiquitin-fold domain (UFD) i un domini C-terminal (**Figura 3**). Tots ells juguen un paper essencial en la primera etapa del cicle de SUMO. El domini d'adenilació és el responsable del reconeixement i adenilació del C-terminal de SUMO. Aquest domini es troba flanquejat per el de la cisteïna catalítica i l'UFD (**Figura 3**). El domini de la cisteïna catalítica és necessari per la formació de l'enllaç tioèster E1-SUMO, que va acompanyat d'un canvi conformacional de l'E1 per tal d'aproximar el SUMO adenilat a la cisteïna catalítica (Olsen et al. 2010). La transferència de SUMO desde l'enzim activador al conjugador, es dona per un previ reconeixement de l'E2 per l'E1, per mitjà del domini UFD; aquest domini tal i com indica el seu nom té una estructura tridimensional similar a la ubiquitina, i és imprescindible per al reconeixement del E2 (Lois & Lima 2005). En aquest reconeixement participa també el domini de la cisteïna catalítica, apropant els dos residus de cisteïna de l'E1 i l'E2, procés essencial per la

transferència de SUMO des de l'E1 a l'E2 (Wang et al. 2007).

Estudis estructurals i bioquímics han determinat que el domini UFD de l'E1, el qual s'uneix a una regió d'unió al E2, està conservat entre espècies filogenèticament properes. Més concretament s'observa un alt grau de conservació en la regió que interacciona amb l'E2 que en la resta del domini UFD. Aquest fet suggereix que les diferents estratègies d'interacció entre l'E1 i l'E2 mitjançant el domini UFD podrien ser conseqüència d'una pressió altament selectiva per tal d'assegurar l'especificitat de cada sistema de conjugació (Liu et al. 2017).

En *Arabidopsis*, el SAE2 és essencial, ja que la inactivació de l'etapa d'activació mitjançant els mutants *atsae2* són letals, impedit el desenvolupament de l'embrió (Saracco et al. 2007).

Existeixen dues formes de l'enzim activador, l'E1a i l'E1b, que difereixen en la composició de la subunitat petita de l'E1, AtSAE1A i AtSAE1B, i presenten un 81% de similitud de seqüència. Aquestes dues isoformes determinen diferents taxes de conjugació de SUMO in vitro, sent AtSAE1a la que confereix un nivell de conjugació més alt; així, la capacitat de conjugació in vivo podria estar regulada pels nivells relatius de les isoformes AtSAE1a/b presents en un determinat moment i/o teixit. A més la isoforma AtSAE1a és més estable que AtSAE1b in vivo e in vitro, ja que AtSAE1a pot existir en forma lliure, no acomplexat amb AtSAE2, suggerint que, en situacions de nivells limitants de AtSAE2, el complex AtSAE2/AtSAE1a podria estar afavorit respecte el complex AtSAE2/AtSAE1b. Pel que fa a les anàlisis dels mutants, els mutants nuls per a la subunitat AtSAE1a son viables però presenten una capacitat de sumoilació reduïda en condicions d'estrès (Castaño-Miquel et al. 2013).

L'enzim E1 d'*Arabidopsis* mostra una localització nuclear com així ocorre en els ortòlegs d'humà i de lleuat (Castaño-Miquel et al. 2013). Aquest fet és consistent amb l'enriquiment de substrats nuclears descrits en els estudis de proteòmica d'identificació de substrats de SUMO (Miller & Vierstra 2011; Miller et al. 2013). El domini C-terminal del SAE2 d'*Arabidopsis* presenta un senyal canònic de localització nuclear, NLS, que és necessària per la localització nuclear de l'E1 (Castaño-Miquel et al. 2013). Pel que fa a mamífers, curiosament i a diferència d'*Arabidopsis* les dues subunitats de l'E1 presenten

diferents NLSs funcionals, tanmateix diferents experiments in vitro han demostrat que el NLS de la subunitat gran de l'E1 es la única necessària per importar de forma eficient l'enzim al nucli (Moutty et al. 2011). A més, la regulació de la localització de l'enzim HsE1 és també dependent de la modificació postraduccionals de SUMO en el seu domini C-terminal, necessari per la seva retenció nuclear (Truong, Lee, Li, et al. 2012).

L'enzim E2 conjugador de SUMO

L'enzim conjugador de SUMO (E2) té un paper central en el cicle de SUMOilació, ja que interactua amb tots els enzims de la via. Aquest enzim és inicialment reconegut pel domini UFD i la cisteïna catalítica de l'E1, i facilita així la transferència de SUMO des de l'E1 al E2. Un cop format l'enllaç tioèster entre la glicina del C-terminal de SUMO i la cisteïna catalítica de l'E2, aquest catalitza la unió de SUMO al substrat directament o mitjançant les E3 lligases.

Aquest enzim confereix especificitat de substrat reconeixent mitjançant interaccions no covalents el motiu consens de SUMOilació del substrat, apropant la proteïna diana al SUMO unit covalentment a l'E2 (Lin et al. 2002). La superfície responsable d'aquest reconeixement es troba adjacent a la cisteïna catalítica de l'E2 (Gareau & Lima 2010).

A més de formar l'intermedi tioèster amb SUMO, l'enzim conjugador de SUMO és capaç de formar un complex amb SUMO mitjançant interaccions no covalents. En mamífers, la interacció no covalent entre E2 i SUMO promou la formació de cadenes de SUMO (Knipscheer, van Dijk, Olsen, Mann & Sixma 2007).

A diferència del sistema de la ubiquitina, en el qual s'han identificat diferents enzims E2, tan sols existeix una per al SUMO de mamífers, llevats i plantes, la qual cosa suggereix que l'enzim conjugador de SUMO juga un paper en l'especificitat de substrat junt amb les E3 lligases (Gareau & Lima 2010). El genoma d'*Arabidopsis thaliana* conté un pseudogen i un gen actiu que codifiquen per l'enzim conjugador de SUMO, AtSCE1b i AtSCE1a respectivament. Existeix tan sols una isoforma de l'E2 codificada per AtSCEa i la inactivació d'aquest gen és letal (Saracco et al. 2007). S'ha detectat l'expressió de l'E2 en tots els teixits d'*Arabidopsis*, i mostra una colocalització nuclear junt amb AtSUMO1/2 (Lois et al. 2003).

Els enzims lligasa de SUMO, E3

Aquests enzims presenten tres propietats: interaccionen amb l'enzim conjugador de SUMO, amb el substrat i faciliten la transferència de SUMO des de l'E2 a la proteïna diana. Les E3 lligases de SUMO identificades en eucariotes es caracteritzen per la presència del domini SP-RING, similar al domini RING que conté la majoria de les lligases E3 de la ubiquitina (Johnson 2004). Aquest domini és essencial per a la interacció amb l'enzim conjugador de SUMO i té activitat lligasa.

Les PIAS (protein inhibitor of activated STAT) són les lligases E3 de SUMO millor caracteritzades i més abundants. Cinc dominis diferents han sigut identificats: SAP, PINIT, SP-RING, SIM i el domini C-terminal ric en serina i treonina. El domini SAP (Scaffold Attachment Factor (SAF)-A/b, Acinus, PIAS) de l'extrem amino terminal és necessari per la unió al DNA. El domini PINIT és requerit per la localització nuclear de la proteïna i a més té activitat E3 lligasa. I finalment, el domini SIM (SUMO interacting motif) permet la interacció no covalent amb SUMO (Sharrocks 2006; Rytinki et al. 2009). La classe d'E3 lligases que no contenen el domini PINIT i SAP es denominen Mms21 (Methyl methanesulfonatesensitive).

Inicialment es van identificar dos SUMO E3 lligases en *Arabidopsis*. La primera en ser identificada va ser SIZ1 (PIAS SUMO E3 lligasa) que pertany a la família de les PIAS. AtSIZ1 conserva els quatre dominis funcionals de les PIAS i conté a més el domini PHD (plant homeodomain), el qual interacciona amb el SCE1 i té activitat lligasa (Garcia-Dominguez et al. 2008). La segona SUMO E3 lligasa va ser identificada per dos grups independents i denominada MMS21 i Hpy2 (Methyl Methanesulfonate-Sensitivity protein 21, High Ploidy 2), respectivament (Huang et al. 2009; Ishida et al. 2009) a la que ens referirem com HPY2. Els mutants de les lligases E3 de SUMO no són letals i han contribuït a elucidar el paper de la sumoilació en les plantes. Els mutants de pèrdua de funció de SIZ1 i HYP2 causen un fenotip nan, el fenotip *athyp2-1* no és complementat amb l'expressió de SIZ1 i el doble mutant és letal. Aquest resultat suggereix que SIZ1 i HYP2 no són redundants i funcionen independentment, la combinació de les quals és essencial per a un correcte desenvolupament de la planta (Ishida et al. 2012).

Els enzims E4 lligasa de SUMO

Recentment s'han descrit dues ligases més en *Arabidopsis*, PIAL1 i 2 (Protein Inhibitor of Activated STAT Like) que promouen la formació de cadenes de SUMO. L'anàlisi dels mutants suggereix que PIAL1 i 2 contribueixen a la regulació de l'estrés salí i les respostes osmòtiques a més d'estar implicades en l'assimilació del sulfat i el metabolisme del sulfur. Les seves funcions solapen, però no mostren redundància amb el que prèviament havia sigut caracteritzat amb la ligasa SIZ1, la qual cosa seria consistent amb el model que SIZ1 promou preferentment la SUMOilació dels substrats de SUMO, mentre que les PIALs extendrien les cadenes de SUMO unides als substrats (Tomanov et al. 2014).

Proteases específiques de SUMO, les ULPs

L'equilibri entre el SUMO lliure emmagatzemat i el conjugat està regulat per les proteases específiques de SUMO, també anomenades ULPs (Ubiquitin-like Proteases). Aquestes proteases faciliten la maduració de SUMO amb la seva activitat endopeptidasa així com la desconjugació de SUMO dels seus substrats a través de la seva activitat isopeptidasa (Yates et al. 2016). Des d'un punt de vista estructural presenten un extrem amino-terminal que normalment regula la localització subcel·lular de l'enzim i un extrem carboxil-terminal conservat amb activitat proteasa (Li & Hochstrasser 2003).

Les proteases de SUMO formen la família més extensa dels diferents components de la maquinària de conjugació. Encara que en *Arabidopsis thaliana* sols s'ha detectat nivells d'expressió significatius per a 5 isoformes: EARLY IN SHORT DAYS 4 (ESD4), ESD4 LIKE SUMO PROTEASE (ELS1), OVERLY TOLERANT TO SALT 1 i 2 (OTS1, OTS2) i ARABIDOPSIS SUMO PROTEASE 1 (ASP1) (Kurepa et al. 2003; Murtas et al. 2003; Colby 2006; Augustine et al. 2009; Hermkes et al. 2011; Kong et al. 2017). Totes elles mostren activitat peptidasa o isopeptidasa davant AtSUMO1 i 2, mentre que tan sols ELS1 té activitat peptidasa davant AtSUMO3 i ninguna d'elles per AtSUMO5 (Chosed et al. 2006; Colby 2006) No s'ha pogut detectar activitat peptidasa endògena per AtSUMO3/5 en *Arabidopsis*, la qual cosa suggereix que AtSUMO3/5 deuen ser madurats a un nivell baix o en circumstàncies específiques (Lois 2010).

La localització subcel·lular de les proteases de SUMO sembla ser un mecanisme clau per determinar la especificitat dels seus substrats. (Nayak and Müller 2014). Per exemple ESD4 localitza principalment en la envoltura nuclear, ELS1 localitza en el

citoplasma, i OTS1, OTS2 i ASP1 localitzen exclusivament en el nucli (Murtas et al. 2003; Conti et al. 2008; Hermkes et al. 2011; Kong et al. 2017).

Sorprenentment, la pèrdua de funció de les proteases de SUMO genera efectes fisiològics similars a la pèrdua de funció de les lligases E3, encara que tinguin efectes moleculars diferents. Així mentre el mutant *siz1* mostra una reducció de la conjugació, el doble mutant *ots1 ots2* i el mutant *esd4* presenten una acumulació major dels conjugats de SUMO. Aquest fet suggereix que el balanç entre la conjugació de SUMO i la seva desconjugació està fortament regulada, i una disminució o augment dels conjugats de SUMO pot desregular diferents processos cel·lulars (Yates et al. 2016).

7. La identificació de substrats de SUMO

La identificació de proteïnes sumoilades es un dels principals objectius de la recerca actual en el camp de la sumoilació ja que proporciona el coneixement necessari per relacionar molecularment la funció de SUMO i els diferents efectes fisiològics que mostren les mutacions dels diferents component de la maquinària de conjugació.

En plantes, les aproximacions inicials es basaren en la hipòtesi inicial de *generar gens candidats basats en les evidències fenotípiques i en la literatura*. El resultat va ser la identificació de nou proteïnes que eren SUMOilades. (Miura et al. 2005; Miura et al. 2009; B. S. Park et al. 2011; Castaño-Miquel et al. 2011; Jin et al. 2008; Okada et al. 2009; Cohen-Peer et al. 2010). Es van identificar 5 conjugats relacionats amb l'estrès abiòtic (ICE1, ABI5, MYB30, HSFA2, CAT3), tres relacionades amb el metabolisme del nitrogen (PHR1, NIA1; NIA2) i una amb el desenvolupament (FLD). Aquests candidats van ser validats a través d'estudis desenvolupats en bacteris, plantes o en condicions in vitro. La majoria de les proteïnes identificades juguen un paper en la regulació de la expressió gènica, la qual cosa era consistent amb la funció tradicional descrita per a SUMO com a regulador transcripcional (Gill 2005; Garcia-Dominguez & Reyes 2009) A més, moltes de les proteïnes descrites estaven implicades en respostes a estrès abiòtic i per tant validava la informació fisiològica i funcional de la importància de la SUMOilació en la resistència a estrès abiòtic.

El descobriment de nous conjugats fent servir una aproximació basada en gens

candidats es molt lenta si ho comparem amb el nombre d'hipotètics conjugats en el conjunt del proteoma de tota la planta. Aquesta limitació va portar a l'aparició de noves aproximacions per identificar els conjugats de SUMO, com per exemple la realització de cribatges en planta fent servir un SUMO fusionat a un pèptid que permetés la purificació de conjugats mitjançant cromatografia d'afinitat i posterior anàlisi mitjançant espectrometria de masses (Budhiraja et al. 2009; Miller et al. 2010; H. C. Park et al. 2011; Miller & Vierstra 2011; López-Torrejón et al. 2013). Altres grups van optar per un altra aproximació basada en la identificació d'interaccions proteïna-proteïna amb els components de la maquinària de SUMOilació (Garcia-Dominguez et al. 2008; Nigam et al. 2008).

La primera identificació de conjugats de SUMO en plantes fent servir l'espectrometria de masses va ser realitzada mitjançant l'expressió *in vivo* de SUMO1, SUMO3 i SUMO5 marcats amb una cua de histidines (Budhiraja et al. 2009). Dels 14 conjugats de SUMO identificats, 5 es van demostrar estar sumoilats *in vitro*. La majoria dels candidats estaven implicats amb processos relacionats amb l'ADN i l'ARN, com per exemple processos de regulació de la estructura de la cromatina, l'esplicing, la transcripció però també l'ensamblatge de proteïnes (Budhiraja et al. 2009).

Com que els SUMOs marcats poden competir amb el SUMO natiu, Miller i col·laboradors (Miller et al. 2010) van utilitzar com a background les plantes mutants (*sum1-1 sum2-1*). Com a conseqüència es van arribar a identificar fins a 357 proteïnes conjugades a un SUMO marcat amb histidines en Arabidopsis. A més com que es coneixia la implicació de SUMO en les respostes a estrès abiòtic, les plantes d'Arabidopsis es van tractar amb estrès tèrmic i oxidatiu. Una vegada més, la majoria dels conjugats identificats consistien en proteïnes nuclear implicades en el remodelatge i reparació de la cromatina, la transcripció, el metabolisme de l'ARN, i el tràfic de proteïnes. A més, cal remarcar que molts dels conjugats identificats eren específics de les condicions d'estrès utilitzades, la qual cosa recolça la modulació específica de l'estrès del conjunt de conjugats de SUMO. D'altra banda el grup de recerca de Park i col·laboradors van fer servir un gel electroforètic de dos dimensions (2D) amb l'objectiu de fer un cribatge de conjugats de SUMO després de realitzar un estrès tèrmic. En total van identificar 27 proteïnes implicades en el metabolisme de l'ADN i l'ARN i en diferents

vies metabòliques i de senyalització (H. C. Park et al. 2011).

Pel que fa a l'aproximació d'identificar les proteïnes que interaccionen amb la maquinària de SUMOilació, els primers en desenvolupar aquesta estratègia foren Elrouby i Coupland els quals van fer servir un sistema de doble híbrid on van identificar 238 interactors del conjugador SCE1 i la proteasa ESD4. A continuació i mitjançant un sistema de SUMOilació basat en *Escherichia coli* van validar un bon nombre de conjugats (Elrouby & Coupland 2010). Cal destacar, que entre els interactors millors representats, es van trobar proteïnes implicades en les respostes a estrès. Un criatge similar fent servir SIZ1, va resultar en la identificació de GTE3 i GTE5, el qual es tracta d'un factor de transcripció que possiblement estigui implicat en la unió a histones acetilades (Garcia-Dominguez et al. 2008).

L'avaluació del *Gene Ontology* del total de conjugats de SUMO en *Arabidopsis*, relaciona SUMO amb un ampli ventall d'activitats moleculars i biològiques (Castro et al. 2012). Moltes de les categories funcionals identificades a nivell molecular eren similars a les avaluades en humans (Elrouby 2015), la qual cosa suggereix el grau de conservació d'aquestes funcions en els organismes eucariotes. Per exemple, el SUMOiloma de plantes i humans està enriquit en proteïnes relacionades amb el metabolisme del DNA, l'ARN com són les proteïnes d'unió a la cromatina, on s'inclouen factors de transcripció activadors i repressors, modificadors d'histones (concretament modificadors de les metilacions) així com helicases. L'avaluació del SUMOiloma d'*Arabidopsis* segons els processos biològics implicats va revelar que SUMO participa en un gran nombre d'activitats que inclouen les hormones vegetals (auxines, brassinosteròids i àcid abscísic), transport i senyalització, desenvolupament d'òrgans (flors, arrel, meristemes, llavor, fruit i embrió), la dormància de la llavor així com en un gran ventall a respostes en diferents condicions de creixement com la radiació, la llum, la temperatura, la calor, el fred i la congelació, l'estrès osmòtic, la sequera, i les respostes a l'estrès biòtic. Moltes d'aquestes activitats estan regulades per proteïnes nuclears, tanmateix hi ha altres proteïnes que estan presents en altres compartiments cel·lulars com el citosol i el citoesquelet, la vacuola, els cloroplasts o la paret cel·lular. (Elrouby 2015). Adicionalment, l'anàlisi del SUMOiloma avaluant l'enriquiment en rutes metabòliques específiques fent servir l'Enciclopèdia de Gens i Genomes de Kyoto (KEGG) va mostrar

que a més de les vies implicades en el metabolismes de l'AND i l'ARN, també hi estaven incloses les vies de la fotosíntesi, la endocitosi, el cicle dels àcids tricarbòxílics, i el metabolisme del nitrogen.

En resum, diferents laboratoris han identificat de forma sistemàtica els conjugats de SUMO fent servir com a model *Arabidopsis* (Budhiraja et al. 2009; Elrouby & Coupland 2010; Miller & Vierstra 2011; H. C. Park et al. 2011; Miller et al. 2013; López-Torrejón et al. 2013). Aquests esforços han permès identificar fins a un total de 653 proteïnes utilitzant diferents estratègies i condicions experimentals. Totes aquestes proteïnes d'*Arabidopsis* son un bon punt per començar a estudiar com SUMO pot regular els diferents processos cel·lulars i fisiològics en plantes. Tanmateix encara queden per identificar molts més conjugats de SUMO, més si tenim en compte que en la majoria dels cribatges realitzats no hi ha una superposició dels substrats identificats i es proposa que les proteïnes que presumiblement poden ser SUMOïlades poden arribar a ser del nombre de milers. A més, moltes de les estratègies, metodologies i condicions que s'han fet servir pels diferents grups varien considerablement.

8. Les implicacions biològiques de la SUMOïlació en les plantes

Són molts els estudis que han tractat de caracteritzar la funció biològica de SUMO en plantes fent servir les dicotiledònies i les monocotiledònies. En ambdós models, SUMO té un paper rellevant en les respostes a estrès abiòtic i biòtic a més d'estar implicat en una ampla gamma de processos relacionats amb el desenvolupament de les plantes (Chaikam & Karlson 2010; Lois 2010; Miura & Hasegawa 2010; H. J. Park et al. 2011; Thangasamy et al. 2011; Wang et al. 2011a; Srivastava et al. 2016; Augustine et al. 2016) (**Figura**).



Figura 4. Efectes de la SUMOilació en les plantes. Es representa les diferents funcions descrites de SUMO en plantes. En verd, violeta i vermell els processos de desenvolupament, les respostes a estrès abiòtic i biòtic respectivament, en els que SUMO juga un paper important.

Actualment i malgrat l'elevat nombre d'evidències del paper essencial de la SUMOilació en el desenvolupament dels organismes eucariotes, aproximadament després de dues dècades del seu descobriment i amb més de 3.000 articles de recerca publicats, encara sabem molt poc sobre com SUMO regula activitats cel·lulars i fisiològiques en els organismes (Elrouby 2015).

Tots els components del sistema de SUMOilació existeixen en les plantes i alguns han sigut caracteritzats a partir de la identificació de mutants o mitjançant diferents estratègies bioquímiques en *Arabidopsis thaliana* (Taula 2). Aquestes aproximacions han permès demostrar que la SUMOilació és essencial per al desenvolupament de les plantes (Saracco et al. 2007; H. J. Park et al. 2011). Tanmateix, l'estudi de la SUMOilació en el desenvolupament de les plantes encara es troba en una fase primerenca ja que els mutants *atsae2*, *atsce* i *atsumo1/2* són letals i l'embrió no es desenvolupa correctament.

Malgrat la letalitat de l'embrió en els mutants dels components essencials de la maquinària de SUMOilació, estudis recents han fet servir altres mutants que tenen

afectada la conjugació de SUMO i han permès millorar el nostre coneixement del paper de SUMO en el creixement i el desenvolupament de les plantes. Per exemple, el mutant knockdown *sumo1sumo2* és parcialment estèril i mostra fenotips d'enanisme, floració primerenca, afectacions en la inflorescència així com una senescència avançada. A més, SUMO1 i SUMO2 no únicament actuen de forma redundant durant l'embriogènesi, sinó que de forma conjunta regulen diferents aspectes del desenvolupament de les plantes (van den Burg et al. 2010). De forma similar, plantes que sobreexpressen una versió mutant del SCE1 (E2) amb el lloc actiu de la Cys reemplaçada per una Ser, mostren una reducció en el creixement, floració primerenca, hipersensibilitat a l'àcid abscísic (ABA) i canvis en el patró de conjugació de SUMO (Lois et al. 2003; Tomanov et al. 2013).

D'altra banda s'ha de tindre en compte que a l'hora de regular i mantenir un balanç adequat de la SUMOilació, les proteases de SUMO juguen un paper molt important. La regulació dels nivells de conjugació resulta ser molt important per al correcte desenvolupament de la planta com mostren els defectes en el desenvolupament i respostes fisiològiques que presenten els mutants de les proteases. Per exemple, el mutant *esd4* té un increment d'acumulació de conjugats de SUMO i mostra diferents fenotips que inclouen la floració primerenca, enanisme, síliques i afectacions en la inflorescència (Murtas et al. 2003; Reeves et al. 2002). A més, encara que els mutants de les proteases OTS1 i OTS2 no presenten cap fenotip aparent en condicions normals de creixement, la sobre-expressió de SUMO1 en els doble mutant *ots1ots2* produeix una disminució de la grandària de la planta (Conti et al. 2008). Per tant, OTS1 i OTS2 connectarien el desenvolupament de la planta i les respostes a estrès salí. Més concretament la hipersumoilació de determinats conjugats actuarien endarrerint el creixement per tal d'afavorir la supervivència de la planta en períodes d'estrès abiòtic (Conti et al. 2009). Consistentment amb el paper dels nivells de SUMOilació i els seus components a un nivell funcional, trobem que els teixits amb creixement actiu durant el desenvolupament de la planta mostren alts nivells d'acumulació de conjugats de SUMO (Chaikam & Karlson 2010).

De manera oposada al que ocorre amb els mutants deficientes de les proteases de SUMO, les plantes mutants de les E3 lligasa de SUMO mostren una reducció en l'acumulació endògena de conjugats de SUMO (Catala et al. 2007; Ishida et al. 2009). Les

E3 lligasa de SUMO incrementen la taxa de conjugació i influeixen en l'especificitat de substrat (Gareau & Lima 2010). Tot i que en animals s'han descrit un nombre major d'E3 lligases de SUMO, en *Arabidopsis* tan sols s'han caracteritzat dues (AtSIZ1 i AtMMS21). Els mutants *knockout* de les lligases de SUMO, *siz1* o *mms21-1/hpy2* (*high ploidy 2*) no són letals però causen fenotips molt patents que permet analitzar els mecanismes i implicacions biològiques de la SUMOilació en plantes (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009).

Els mutants de la lligasa SIZ1 mostren un fenotip pleiotròpic i aquesta està principalment relacionada amb les respostes a estrès. Així per exemple la SUMOilació dependent de SIZ1 es crucial tan per les respostes a estrès biòtic i abiòtic, incloent les respostes a la manca de nutrients, a les altes i baixes temperatures, a salinitat i sequera, a la tolerància al coure i a les respostes dependents d'àcid salicílic de defensa a patògens (Miura & Hasegawa 2010; B. S. Park et al. 2011; Chen et al. 2011b; Castaño-Miquel et al. 2017). A més, el mutant *siz1* presenta un fenotip nan amb fulles petites, floració primerenca, amb gametòfits femenins defectuosos, desenvolupament anormal de les llavors, llavors dormants i durant la fotomorfogènesi presenta hipocòtils curts en diferents condicions de llum o en fosc, la qual cosa indicaria que AtSIZ1 també juga un paper important en el desenvolupament de la planta (Catala et al. 2007; Miura et al. 2010; Ling et al. 2012; Kim et al. 2016; Lin et al. 2016). A més, AtSIZ1 s'expressa en quasi totes les cèl·lules vegetals, on regula la expansió i la proliferació cel·lular mitjançant la senyalització d'àcid salicílic així com controlant de manera positiva la senyalització de giberel·lines (Miura et al. 2010; Ishida et al. 2012; S.-I. Kim et al. 2015). D'altra banda, els fenotips del mutant *siz1* son recuperats a fenotips silvestres amb l'aplicació d'amoni exogen, la qual cosa indica que AtSIZ1 regula la reducció del nitrat (B. S. Park et al. 2011). L'altra E3 lligasa de SUMO, AtMMS21/HPY2, vas ser identificada independentment per dos grups (Ishida et al. 2009; Zhang et al. 2010). De forma similar als mutants *siz1*, la manca de AtMMS21 provoca fenotips nans (Ishida et al. 2009; Miura et al. 2010). Tanmateix, AtMMS21 i AtSIZ1 probablement tinguin diferents funcions en el desenvolupament de la planta, ja que la expressió recíproca de AtMMS21 i AtSIZ1 no complementa el fenotip del mutant simple. El fenotip nan de *siz1* s'explica principalment per l'acumulació d'àcid salicílic, mentre que les plantes sense AtMMS21 no depenen de

l'acumulació d'aquesta hormona i les seves cèl·lules mostren una entrada prematura en la fase d'endocicle (Ishida et al. 2009; Ishida et al. 2012). D'altra banda, els mutants de l'AtMMS21 mostren un escurçament de l'arrel i tenen desregulats l'expressió de marcadors de divisió cel·lular (CYCB1, CDKB1 CDKB2) i gens induïts per citoquinines, la qual cosa indica que AtMMS21 regula el desenvolupament del meristem radicular mitjançant la regulació del cicle cel·lular i la senyalització de les citoquinines (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009). A més, AtMMS21 s'expressa en les cèl·lules meristemàtiques i la seva expressió i acumulació està positivament regulada per PLT (PLETHORA), que és el factor de transcripció clau que determina el patró del nínxol de les cèl·lules mare a l'arrel (Ishida et al. 2009; Aida et al. 2004). De fet, els nivells de proteïna de PLT1 i PLT2 estan dràsticament reduïts en les arrels del mutant *mms21-1*, la qual cosa suggereix una retroalimentació entre AtMMS21 i PLT en el manteniment del nínxol de cèl·lules mare de l'arrel (Xu et al. 2013). La implicació de AtMMS21 en el manteniment del nínxol de cèl·lules mare es demostra a més pel fet que els mutants *mms21-1* tenen organització irregular del QC, l'activació mitòtica de les cèl·lules del QC, la expressió aberrant de marcadors específics del QC i gens de factors de transcripció específics de QC així com l'aparició de grànuls de midó en la regió del QC. En definitiva, AtMMS21 actua en el nínxol de les cèl·lules mare per tal de regular el patró de les cèl·lules meristemàtiques de l'arrel tant en l'embriogènesi com en etapes del desenvolupament posteriors. Finalment, comentar que la protecció de les cèl·lules meristemàtiques davant de factors ambientals que puguin fer malbé l'ADN resulta crucial per al desenvolupament de la planta. En aquest sentit s'ha descrit que AtMMS21 està implicada en les respostes a danys de l'ADN durant el desenvolupament de l'arrel així com en el manteniment de la integritat del genoma (Xu et al. 2013).

| Components de la maquinària de SUMOilació | | Localització subcel·lular | Pèrdua o guany de funció | Fenotip de desenvolupament | Fenotip d'estrès abiòtic | Fenotip d'estrès biòtic | Referències |
|---|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|---|---|
| SUMO | SUMO1 (At4g26840) | Nucli/Citoplasma | sum1-1 | Silvestre | n.d. | n.d. | (Saracco et al. 2007) |
| | | | 35S::SUM1 | Floració primerenca i peciols curts | Resistència a la inhibició del creixement de l'arrel per l'ABA i termotolerància adquirida reduïda | Resistència a patògens fúngics necrotròfos | (Lois et al. 2003; Saracco et al. 2007; van den Burg et al. 2010; Cohen-Peer et al. 2010; Castaño-Miquel et al. 2017) |
| | SUMO2 (At5g55160) | Nucli/Citoplasma | sum2-1 | Silvestre | n.d. | n.d. | (Saracco et al. 2007) |
| | | | 35S::SUMO2 | Floració primerenca i peciols curts | Resistència a la inhibició del creixement de l'arrel per l'ABA | - | (Lois et al. 2003; van den Burg et al. 2010) |
| | | | sum1-1 sum2-1 | Letalitat a l'embrió | n.d. | n.d. | (Saracco et al. 2007) |
| | sum1-1 amiR-SUM2 | Pleiotròpic | Resistència a patògens bacterians | (van den Burg et al. 2010) | | | |
| | SUMO3 (At5g55170) | n.d. | sum3-1 | Floració tardana | n.d. | - | (van den Burg et al. 2010) |
| 35S::SUM3 | | | Floració primerenca | Resistència a patògens bacterians | | (van den Burg et al. 2010) | |
| SUMO5 (At2g32765) | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | (Saracco et al. 2007) | |
| E1 | SAE1a (At4g24940) | Nucli | sae1a-1 | Silvestre | n.d. | n.d. | (Saracco et al. 2007; Castaño-Miquel et al. 2013) |
| | SAE1b (At5g50580) | | n.d. | n.d. | | | (Saracco et al. 2007; Castaño-Miquel et al. 2013) |
| | SAE2 (At2g21470) | | sae2-1 | Letalitat a l'embrió | | | (Saracco et al. 2007; Castaño-Miquel et al. 2013) |
| E2 | SCE1 (At3g57870) | Nucli/Citoplasma | sce1-5, sce1-6 | Letalitat a l'embrió | n.d. | n.d. | (Saracco et al. n.d.) |
| | | | co-SCE1a | n.d. | Sensibilitat a la inhibició del creixement de l'arrel per l'ABA | | (Lois et al. 2003) |
| E3 | HPY2/MMS21 (At3g15150) | Nucli/Citoplasma | hpy2-1, hpy2-2, mms21-1 | Pleiotròpic | n.d. | n.d. | (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009) |
| | SIZ1 (At5g60410) | Nucli | siz1-1, siz1-2, siz1-3 | Pleiotròpic | Sensibilitat a temperatures extremes, sequera i excès de Cu, respostes anormals a la falta de P, elevada inhibició de la germinació i el creixement de l'arrel en presència d'ABA, metabolisme del Nitrogen afectat, i tolerància a la salinitat. | Resistència a patògens bacterians i sensibilitat a patògens fúngics necrotròfos | (Miura et al. 2005; Chen et al. 2011b) |
| E4 | PIAL1 (At1g08910) | n.d. | pial1-1, pial 1-3 | Silvestre | Resistència a l'estrès salí i osmòtic | n.d. | (Tomanov et al. 2014) |
| | PIAL 2 (At5g41580) | n.d. | pial2-1, pial 2-2 | | Sensibilitat a la inhibició del creixement de les plantes per l'ABA, acumulació anormal de sulfur | | |
| Proteases | ESD4 (At4g15880) | Porus nuclear | esd4-1, esd4-2 | Pleiotròpic | n.d. | n.d. | (Murtas et al. 2003; Reeves et al. 2002) |
| | | | 35S::ESD4 | Silvestre | | | |
| | | | esd4-1 35S::SUM1,2,3 | Pleiotròpic | | | |
| | | | esd4-1 35S::preSUM1,2,3 | Pleiotròpic | | | |
| | ULP1a/ELS1 (At3g06910) | Citoplasma | els1-1, els1-2 | Lleugerament petita | nd | n.d. | (Hermkes et al. 2011) |
| | ULP1c/OTS2 (At1g10570) | Nuclear | ots2-1 | Silvestre | n.d. | - | (Conti et al. 2008; Conti et al. 2009) |
| | | | ots1-1 | Silvestre | n.d. | - | |
| ULP1d/OTS1 (At1g09730) | Nuclear | 35S::OTS1 | | Tolerància a la salinitat | - | Resistència a patògens bacterians | |
| | | ots1-1 ots2-1 | Floració primerenca | Sensibilitat a la salinitat | n.d. | | |
| ULP2b/ASP1 (At1g09730) | Nuclear | 35S::SUM1 ots1-1 ots2-1 | Roseta petita | n.d. | n.d. | (Kong et al. 2017) | |
| asp1-1, asp1-2 | Floració tardana | n.d. | n.d. | | | | |

Taula2. L'expressió dels components de la maquinària de SUMOilació i les seves implicacions biològiques.

La SUMOilació i l'assimilació del nitrogen

El nitrogen es un dels nutrients inorgànics i un dels components principals dels àcids nucleics, les proteïnes, diversos cofactors i metabolits secundaris. A més el nitrogen serveix a les plantes com un potent senyal que regula el metabolisme del nitrogen i el carboni així com el creixement i desenvolupament de la planta (Crawford & Forde 2002). Es per això que l'assimilació del nitrogen és un procés biològic fonamental que determina la productivitat de les plantes. Més concretament, la nitrata reductasa (NR) es l'enzim que permet l'assimilació del nitrogen en la planta. En aquest sentit, curiosament un dels primers conjugats de SUMO en ser caracteritzats fou la nitrata reductasa. De fet, l'enanisme observat en *siz1*, la floració primerenca es revertida quan s'aplica de forma exògena l'ammoni. La qual cosa suggereix que la SUMOilació té un paper important en l'assimilació del nitrogen. De fet i més concretament, SIZ1 controla positivament l'assimilació del nitrogen mitjançant la SUMOilació de la NR millorant la seva activitat catalítica (B. S. Park et al. 2011).

La SUMOilació i la germinació

La germinació de la llavor es la primera fase del desenvolupament de la planta. La germinació comença amb la imbibició de la llavor seca i acaba amb la protusió de la radícula (Bewley & Black 1994; Bewley 1997) i aquest procés influeix el subseqüent creixement de la planta i el seu desenvolupament. Entre els factors interns que afecten la germinació de la llavor s'inclouen les hormones vegetals com les gibberel·lines (GA) l'àcid abscísic (ABA) l'etilé i les auxines. Entre aquestes, l'ABA i les GA constitueixen els principals reguladors d'aquest procés, i ambdues presenten funcions oposades durant la germinació (Holdsworth et al. 2008; Nambara et al. 2010). Els factors ambientals com per exemple la llum, la temperatura, l'aigua, i la disponibilitat de nutrients també afecten la germinació a través del seu efecte on diferents vies metabòliques (Holdsworth et al. 2008). D'altra banda les llavors de les plantes presenten dormància. Aquesta dormància de les llavors és una característica intrínseca que evita que les llavors germinen encara que es donin condicions de llum, humitat i temperatura favorables durant les estacions no favorables. La dormància s'indueix durant la fase de maduració i s'allibera quan la llavor seca passa per un cert període després de la maduració o després d'un període curt d'imbibició a baixes temperatures (estratificació) és un fenomen

ampliament observat en diverses espècies de plantes (Ali-Rachedi et al. 2004; Yamauchi et al. 2007; Bewley et al. 2013) Per tant, la dormància de la llavor controla la germinació i juga un paper crucial en la regulació del començament de cicle vital de la planta.

La regulació hormonal de la dormància, la seva inducció i manteniment mitjançant l'ABA i l'alliberament de la dormància mitjançant les GA, ha sigut observada en moltes espècies. De fet, la dormància i la germinació han sigut intensament estudiades fent servir els gens implicats en la biosíntesi de GA i l'ABA la qual cosa va revelar el seu antagonisme. (Koornneef et al. 1982; Giraudat et al. 1992; Léon-Kloosterziel et al. 1996; Lefebvre et al. 2006; Okamoto et al. 2006).

Entre els reguladors principals de dormància, DOG1 es el gen que determina el temps de l'alliberament de la dormància en les llavors acabades de recollir (Bentsink et al. 2006; Nakabayashi et al. 2012). Els estudis epigenètics han mostrat que les demetilases de histones LDL1 i LDL2, reprimeixen la expressió de gens relacionats amb la dormància que inclouen DOG1, ABSISIC ACID 2 (ABA2) and ABI3 (Zhao et al. 2015).

Pel que fa als principals reguladors de la germinació de la llavor, SLY1, és un regulador positiu de la via de senyalització de les GA (S.-I. Kim et al. 2015) mentre que les proteïnes DELLA, les GAI (GA INSENSITIVE), RGA (REPRESSOR OF GA1-3), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2 and RGL3, així com SPINDLY (SPY), inhibeixen la germinació mitjançant la el manteniment de la dormància (Lee et al. 2002; Peng & Harberd 2002; Cao et al. 2005; Piskurewicz & Lopez-Molina 2009). D'altra banda la repressió de gens del catabolisme de les GA com GA 2-ox (GIBBERELLIN 2-oxidase) inhibeixen la dormància (Yamauchi et al. 2007), mentre que la inducció de gens implicats en la biosíntesi de les GA GA3ox1 indueixen el trencament de la dormància (Footitt et al. 2013) A més, GID1s (GIBBERELLIN-INSENSITIVEDWARF1s), el qual permet la ubiquitinació i degradació de les proteïna DELLA, juntament amb SLY1 i en presència de GA, estimulen la via de transducció de les gibberelines (McGinnis et al. 2003; Sun & Gubler 2004; Ueguchi-Tanaka et al. 2007; Schwechheimer 2008). Es per això que els mutants deficients en GID1 or SLY1 mostren una reducció en les taxes de germinació (Griffiths et al. 2006; Iuchi et al. 2007)

Recentment s'ha descrit la regulació del trencament de la dormància per GA i la

germinació amb la SUMOilació (Kim et al. 2016). En aquest treball descriuen la baixa taxa de germinació després de la maduració de la llavor en el mutant de *siz1*. Tanmateix aquesta dormància es recuperada als nivells del fenotip silvestre amb l'aplicació exògena de GA. La qual cosa suggereix que la perduda de funció de SIZ provoca l'augment de la dormància i una afectació de la via de senyalització de GA durant la germinació. D'altra banda han descrit que SIZ1 estableix SLY1 durant la germinació, mentre que els nivells de missatgers no estaven afectats. Durant la imbibició, l'expressió de SLY estigué regulada negativament en els mutants *siz1*, mentre que l'expressió de DOG1, ABI3 i els gens DELLA estigueren regulats positivament, la qual cosa indica que SIZ1 suprimeix l'expressió dels gens associats a la dormància de la llavor. A més, els nivells transcripcionals de LDL1 i LDL2, que codifiquen per a demetilases de histona i regulen negativament a DOG1, estigueren igualment regulats negativament. S'ha de tindre en compte que recentment també s'ha descrit que la desmetilació del DNA mitjançant la cromometilasa CMT3 està estimulada per la SUMOilació mitjançant l'activat de la lligasa E3 SIZ1 (D. Y. Kim et al. 2015). Per tant aquests resultats suggereixen que l'activitat de SIZ1 participa directa o indirectament en la dormància de la llavor i la germinació com un regulador epigenètic.

En definitiva els resultats actuals mostren que la via de senyalització de les GA està positivament regulada per la SUMOilació durant la fase de germinació i suggereixen que la conjugació de SUMO té un paper important com una modificació postraduccional necessària per al control de la germinació.

La SUMOilació i la fotomorfogènesi

Com a fotoautòtrofs, les plantes són exquisidament sensibles a la llum del seu entorn. La llum afecta al seu desenvolupament i les respostes fisiològiques, incloent la germinació (Bentsink & Koornneef 2008), la floració (Alvarez-Buylla et al. 2010), i la direcció del creixement (Pedmale et al. 2010).

En *Arabidopsis*, hi ha quatre classes principals de fotoreceptors: els fitocroms (phy) que actuen predominantment en les longituds d'ona del vermell/vermell llunyà (Wang & Deng 2004), els criptocroms (cry) que responen al blau i la llum ultraviolada (Yu et al. 2010; Chaves et al. 2011), les fototropines (phot) responen al blau i més

recentment s'han identificats els fotoreceptors de llum ultraviolada B. (Rizzini et al. 2011)

Entre la germinació i el desenvolupament de les fulles no embrionàries, la plàntula travesa un període de temps crucial, ja que ha de determinar un mode d'acció apropiat per aconseguir l'èxit fotosintètic i eventualment l'èxit reproductiu. Si les condicions de llum són limitants, llavors la plàntula mostrarà un creixement etiolat, es a dir, presentarà un hipocòtil elongat amb cotiledons tancats i un creixement limitat del sistema radicular (escotomorfogènesi). Contràriament, si les plàntules d'*Arabidopsis* creixen en condicions de llum adequades, llavors presentaran hipocòtils curts i expandits, fotosintèticament actius (fotomorfogènesi) (von Arnim & Deng 1996; Arsoovski et al. 2012).

La E3 lligasa de la ubiquitina COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1), actua com a repressor central de la fotomorfogènesi i dirigeix la ubiquitinació i degradació de reguladors positius com son: HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5), HYH (HY5 HOMOLOGUE), LAF1 (LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1), HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR RED 1), STH3 (SALT TOLERANCE HOMOLOG 3)/BBX2 i el PIL1 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE1) (Deng et al. 2000; Luo et al. 2014). SPA (SUPPRESSOR OF PHYA-105) i els PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) interaccionen amb COP1, millorant la seva activitat E3 (Seo et al. 2003; Saijo et al. 2003; X. Xu et al. 2014). D'altra banda CSU1 (COP1 SUPPRESSOR1), una RING-finger E3 ubiquitin lligasa, regula la homeòstasi de COP1 mitjançant la ubiquitinació i degradació de COP1 in fosc (D. Xu et al. 2014). En resposta a la llum el phyA (phytochrome A), phyB (phytochrome B), CRY1 (crytochrome 1) i CRY2, inhibeixen la activitat de COP1 mitjançant la modulació del complex COP1-SPA1 (Saijo et al. 2003; Lu et al. 2015). Conseqüentment, la activitat reduïda de COP1 en condicions de llum provoca l'acumulació de HY5 i la reprogramació transcriptòmica dels gens que regula (Li et al. 2010; Jing et al. 2013).

Pel que fa a la implicació de la SUMOilació en la regulació de la fotomorfogènesi, recentment s'ha demostrat que la lligasa de SUMO SIZ1 regula la fotomorfogènesi, almenys parcialment, mitjançant la SUMOilació de COP1, afavorint la seva activitat lligasa de ubiquitina. Aquest fet incrementaria la ubiquitinació i degradació de HY5. A més COP1 modula la ubiquitinació i degradació de SIZ1, de manera que aquesta

retroalimentació negativa asseguraria un nivells normals per l'activitat de COP1 (Lin et al. 2016). D'altra banda també s'ha descrit que SUMO es conjuga amb el phyB reprimint la senyalització activada per la llum vermella. De fet, i almenys parcialment SUMO estaria inhibint la interacció entre el phyB i els PIFs (Sadanandom et al. 2015). L'impediment de la interacció entre aquestes proteïnes afectaria negativament les respostes fotomorfogèniques. Per tant, la SUMOilació actuaria de forma similar a com ho fa la fosforilació (Nito et al. 2013) desensibilitzant la senyalització mediada pel phyB. A més, OVERLY TOLERANT TO SALT 1 i 2 (OTS1 and OTS2) estarien implicades en la regulació de l'activitat del phyB ja que aquestes proteases permeten la desconjugació de phyB. D'altra banda,

La SUMOilació i la floració

La primera vinculació entre SUMO i el control de la floració, va ser descrita amb el mutant de la proteasa de SUMO AtESD4 (Murtas et al. 2003). Posteriorment també es va descriure la floració primerenca dels mutants *siz1-3* (Jin et al. 2008). Curiosament, ens tornem a trobar una situació on dos components que actuen antagonísticament, augmentant o disminuint els conjugats de SUMO ténen el mateix resultat fenotípic final. Ambdós mutants provoquen una reducció d'expressió i activitat del FLC (flowering locus C), factor de transcripció que regula negativament la transició floral. S'ha descrit que la expressió d'aquest factor, FLC, es sensible a l'estructura de la cromatina, la qual pot ser afectada per un augment de conjugats de SUMO (Novatchkova et al. 2004). D'altra banda, FLC es reprimint pel factor FLD, ja que la sumoilació de FLD (flowering locus D) dependent de SIZ1 dona lloc a la seva inactivació causant una activació del FLC i una repressió floral (Jin et al. 2008).

La SUMOilació i les respostes a estrès abiòtic de les plantes

La modulació de l'activitat proteica és essencial per als organismes especialment durant canvis ambientals que requereixen respostes ràpides i reversibles. Aquesta modulació de l'activitat proteica pot donar-se mitjançant l'addició de modificadors post-traduccionals (Kerscher et al. 2006; Vertegaal 2011).

Una de les característiques pròpies de sumoilació rau en el fet que diferents estressos ambientals indueixen una acumulació dràstica de conjugats de SUMO. Aquesta acumulació de conjugats durant les respostes a estrès ambiental sembla estar conservada en eucariotes (Kurepa et al. 2003; Zhou et al. 2004; Golebiowski et al. 2009). En plantes ha sigut observada en arròs, àlber i més freqüentment en *Arabidopsis* en resposta elevades temperatures (Kurepa et al. 2003; Miura et al. 2005; Lee et al. 2007; Cheong et al. 2009; Saracco et al. 2007; van den Burg et al. 2010), baixes temperatures (Miura et al. 2007; Miura & Ohta 2010), sequera (Catala et al. 2007), salinitat (Conti et al. 2008), sucres (Castro et al. 2015), exposició a coure (Chen et al. 2011a), i incubació a peròxid d'hidrogen, etanol i cannavanina (Kurepa et al. 2003). La elevada conjugació es acompanyada per una disminució de SUMO lliure i correlaciona amb la duració i la intensitat de l'estrès (Kurepa et al. 2003; Miller & Vierstra 2011). Un cop finalitzat l'aplicació de l'estrès, els nivells de conjugació disminueixen a les poques hores o inclús minuts, suggerint que la sumoilació actua transitòriament (Kurepa et al. 2003; Golebiowski et al. 2009).

La SUMOilació i l'estrès tèrmic

La primera evidència que relacionava l'estrès tèrmic amb la SUMOilació va ser observada per Kurepa i col·laboradors (Kurepa et al. 2003), els quals van descobrir un augment de conjugats de SUMO davant diferents estressos abiòtics (estrès tèrmic, peròxid d'hidrogen i etanol). Es va estudiar en detall la resposta al estrès tèrmic, en plàntules d'*Arabidopsis* exposades a 37 graus de temperatura, les quals mostraren un ràpid i dramàtic augment de conjugats de SUMO1 i 2 on es consumia quasi tot el pool de SUMO lliure (Kurepa et al. 2003). Aquesta modificació és reversible i al cap d'unes hores el pool de SUMO lliure era regenerat.

L'estrès per temperatures elevades afecten als organismes afectant la integritat

de les membranes, la producció d'espècies reatives d'oxigen (ROS), la inactivació i desnaturalització de proteïnes, desequilibris metabòlics i cel·lulars, que en conjunt poden dur a la mort cel·lular. Les plantes tenen una capacitat innata per sobreviure a l'estrès per altes temperatures (termotolerància basal) mitjançant ajustaments metabòlics i cel·lulars que els capacita per tolerar temperatures extremes que prèviament haguessin sigut letals (termotolerància adquirida) (Cohen-Peer et al. 2010). Entre els mecanismes de regulació de la termotolerància adquirida s'ha descrit que la SUMOilació juga un paper important. Així, s'ha descrit que la sobreexpressió de SUMO1 redueix la tolerància adquirida, la qual cosa suggereix que la conjugació de SUMO actua negativament sobre la termotolerància adquirida (Cohen-Peer et al. 2010). HsfA2 (Arabidopsis heat shock), és un factor de transcripció que davant les altes temperatures senyalitza per la transcripció de gens en resposta a l'estrès tèrmic, com les heat shock proteïnes (HSP) (Kotak et al. 2007). La SUMOilació de HsfA2 redueix la seva activitat, i per tant la termotolerància adquirida de la planta (Cohen-Peer et al. 2010). Per el contrari, els mutants *siz1-3* presenten sensibilitat a l'exposició a temperatures altes, indicant que SIZ1 regula positivament la termotolerància basal (Yoo et al. 2006). És un clar exemple de la complexitat de la SUMOilació, on diferents components de la maquinària poden actuar antagonisticament en resposta a diferents tipus d'estrès tèrmic, la qual cosa indicaria la importància de la regulació de l'estat cel·lular dels conjugats de SUMO i el seu dinamisme. Estudis proteòmics han identificat diferents substrats de SUMO davant diferents substrats de SUMO en front a l'estrès tèrmic, molts d'aquests relacionats amb el manteniment de la homeòstasi de l'ARN, suggerint el paper de SUMO com a regulador del transcriptoma. A més, moltes de les proteïnes modificades per SUMO en resposta a estrès tèrmic també són sumoilades durant l'estrès oxidatiu i en etanol, indicant que la seva modificació és crucial en respostes a estrès (Miller et al. 2013). A més del paper de SUMO davant l'estrès tèrmic, també s'ha descrit la importància de la E3 lligasa de SUMO SIZ1 en el control de l'adaptació de les plantes a baixes temperatures. La SUMOilació dependent de SIZ1 activa i estabilitza la proteïna ICE1 (Inducer of CBF Expression 1), que controla la expressió dels factors de transcripció CBF3/DREB1A (*C-repeat binding factor 3/Dehydration Responsive Element binding factor 1a*) en resposta al fred. La SUMOilació de ICE1 estabilitza la proteïna bloquejant així la seva ubiquitinació. A més, la modificació de ICE1 per SUMO regula negativament MYB15, repressor de CBF3/DREB1A mitjançant

la seva unió a elements MYB del promotor (Miura et al. 2007) De manera que SIZ1 regularia positivament la resposta a baixes temperatures.

La sumoilació i la deficiència en fòsfats

El mutant *siz1-2* és hipersensible a les limitacions de fòsfor (Pi) com va rebel·lar el seu fenotip d'arrels primàries curtes, més arrels laterals i pels radiculars i un increment del ratio arrel/part aèria, nivells elevats d'antocianines i una reducció dels nivells de transcrit de *AtIPS1* i *AtPNS1* (QUÈ SÓN??). De fet, SIZ1 sumoila el factor de transcripció Myb TF *AtPHR1* implicat en la resposta a la deficiència en fòsfor i regula la transcripció d'altres gens de resposta com *AtIPS1*, i *AtPNS1*. (Rubio et al. 2001; Miura et al. 2005; Duan et al. 2008). Tanmateix, al sumoilació de PHR no sembla ser la via principal (DE QUÈ?) ja que el fenotip del mutant *phr* difereix de les plantes que tenen una resposta típica a la deficiència en fòsfor, on no s'observa la canvis en els nivells de conjugats ni en l'arquitectura de l'arrel (Rubio et al. 2001). D'altra banda, Miura i col·laboradors (Miura et al. 2011) han demostrat que els canvis fenotípics en l'arquitectura de l'arrel com a conseqüència de la deficiència de fòsfor es degut a que el mutant *siz1-2* sembla estar implicat en l'acumulació d'auxina. (però només en absència de P. Aquest grup a més descriu que en condicions de deficiència de fòsfor, la auxina s'acumula de manera primerenca en la punta de l'arrel primària i de les arrels laterals en el mutant *siz1-2* i presenta incrementada l'expressió de gens induïts per auxina. Aquests resultats suggereixen que SIZ1 regula negativament el patró d'auxines en les arrels en resposta al deficiència de fòsfor. Per tant, la sumoilació dependent de SIZ1 regularia la assimilació del fòsfor en un ambient deficient en aquest nutrient (mitjançant la regulació de l'arquitectura de l'arrel en absència de P?)

La SUMOilació i la tolerància als metalls pesats

La implicació de la SUMOilació en el control dels nivells de (Cu) i la seva distribució en la planta va ser suggerida per (Chen et al. 2011b). Aquests autors van mostrar que quan les plantes estan exposades al coure, la conjugació de SUMO dependent de SIZ1, s'incrementa ràpidament en els primers 30 minuts i fins a 3 hores després no disminueix. A més, en condicions d'excès de Cu, el mutant *siz1* va acumular aquest nutrient en els òrgans aeris així com va mostrar una hipersensibilitat a aquest

metall. Aquests fenotips podrien ser explicats parcialment si tenim en compte que el mutant *siz1* presenta induïda l'expressió dels transportadors de metalls Yellow Stripe-Like 1 i 3 (YSL1/3).

La SUMOilació i la senyalització de l'àcid abscísic (ABA)

L'hormona de l'àcid abscísic (ABA) regula diversos processos implicats en el creixement, el desenvolupament de les plantes i les seves respostes d'adaptació a l'estrès ambiental com per exemple el fred, la sequera i la salinitat (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006; Hirayama & Shinozaki 2007).

La primera evidència que relacionava l'ABA i la SUMOilació va ser descrita per Lois i col·laboradors (Lois et al. 2003). Les plantes sobre-expressores de SUMO1 i SUMO2 eren menys sensibles a ABA quan s'analitzà la inhió del creixement de l'arrel en presència d'ABA. A més, la reducció de l'expressió de AtSCE1a afectava a la sensibilitat de la germinació així com al creixement de l'arrel en presència d'aquesta l'hormona. D'altra banda, el fenotip hipersensible a ABA en els mutants de *siz1* es redueix en les línies ABI5 (ABA insensitive 5). De fet, la detecció de la SUMOilació de la lisina 391 en aquest substrat ha permès descriure en major detall que durant la germinació, el creixement de l'arrel i la inducció de gens en resposta a ABA, la sobreexpressora de ABI5^{K391R} en el mutant d'*abi5-4* genera un fenotip que és hipersensible a ABA quan es compara amb la sobreexpressió d'ABI5 en el mutant *abi5-4* (Miura et al. 2009; Miura & Hasegawa 2010). S'ha de tindre en compte que MYB30, el qual està implicat en la via de senyalització d'ABA durant la germinació de la llavor, també ha sigut identificat com a conjugat de SUMO (Elrouby & Coupland 2010; Zheng et al. 2012). Aquesta proteïna també és substrat de XopD, un effector T3E de *Xanthomonas* que funciona com a proteasa de SUMO (Canonne et al. 2011) i s'estabilitza mitjançant SUMOilació (Zheng et al. 2012). Tanmateix, la conjugació de MYB30 no afecta la seva localització nuclear o la seva activitat transcripcional. A més, la hipersensibilitat del mutant *myb30* al tractament amb ABA no es recupera mitjançant la mutació MYB30^{K293R}. D'altra banda, el doble mutant *siz1-2 myb30* mostra més hipersensibilitat que el mutant simple, la qual cosa suggereix que SIZ1 està implicat en la senyalització d'ABA o bé la via de resposta ve donada no únicament a través de MYB30 (Zheng et al. 2012). Finalment, comentar que recentment han sigut descrites dues noves lligases de SUMO (PIAL1 i PIAL2) implicades

en la formació de cadenes de SUMO en Arabidopsis (Tomanov et al. 2014). Quan es van analitzar els mutants d'aquestes lligases en un fons mutant de *siz1-2*, es va trobar que la hipersensibilitat a ABA es troba molt més agreujada.

La SUMOilació i la sequera

La conjugació de SUMO s'incrementa de manera significativa i accentuada davant d'un estrès hídric, el qual és un procés dependent parcialment de l'activitat lligasa de SIZ1 (Catala et al. 2007). De fet sembla que SIZ1 actua positivament on la tolerància a l'estrès per sequera desde que els mutants de *siz1* mostren una sensibilitat a períodes curts i llargs de deshidratació. A més, les dades aportades mitjançant microarray indiquen que un gran nombre de gens implicats en la resposta a la sequera estan desregulats in el mutant *siz* A més, l'expressió de RD29D, SAL1, els enzims biosintètics d'antocianines i les proteïnes de resposta a jasmonats es van trobar significativament reduïts durant les condicions de sequera en els mutants *siz1-3* (Catala et al. 2007). Pel que fa a la implicació de SIZ1 i la via de senyalització d'ABA hi ha suficients evidències que suggereixen que la SUMOilació està implicada en mecanismes dependents de ABA però també independents en la relació SUMOilació i sequera. Pel que fa al suport de l'existència dels mecanismes idependents d'ABA implicats en la resposta a la sequera, no s'han observat diferències significatives en els patrons de SUMOilació durant les condicions de sequera entre el mutant *aba2* (un mutant que te afectada la síntesi d'ABA) i el ecotip silvestre control (Catala et al. 2007). Els autors van suggerir que la SIZ1 podria estar participant de forma independent a les vies de senyalització d'ABA mitjançant la conjugació d'altres factors de transcripció implicats en els processos de deshidratació.

La SUMOilació i la salinitat

De forma contraria a la regulació positiva SIZ1 de les respostes a estrès per sequera, SIZ1 actua com a regulador negatiu de les resposte a elevada salinitat. De fet, SIZ1 va ser originalment identificat com a repressor del fenotip de *sos3* (salt overly sensitive 3 (Miura et al. 2005). Pel que fa a les proteases SUMO el doble mutant *ots1-1/ots2-1* de la famili (overly tolerant to sat11)/ULP1d i *OTS2/ULP1c* es sensible a la salinitat (Conti et al. 2008). A més la proteïna OTS1 es degrada en resposta a la salinitat, la qual cosa suggereix que l'estatus de la sumoilació i desumoilació està afectada per la

salinitat i per tant podria controlar d'una manera molt més fina la complexitat i la magnitud de la resposta a estrès salí. De fet, ha sigut descrit el paper central que tenen les proteases OTS en el control de la sumoilació de les proteïnes DELLA. Aquestes proteïnes actuen com a repressors de les vies moleculars regulades per gibberel·lines (GA) que controlen el creixement de la planta, de manera que la sumoilació de les DELLA contribueix a l'acumulació d'aquestes proteïnes que provoquen una inhibició del creixement de la planta que resulta beneficiós durant condicions d'estrès ambiental. La SUMOilació per tant actuaria com un inhibidor del creixement de forma ràpida durant les condicions d'estrès mentre que les gibberel·lines actuarien més a llarg termini (Conti et al. 2014).

D'altra banda i més recentment, el grup de Tomanov, Bachmair i col·laboradors (Tomanov et al. 2014) han descrit dues noves lligases de SUMO, PIAL1 i PIAL2 (Protein Inhibitor of Activated Stat Like) que tenen la capacitat de formar cadenes de SUMO i l'anàlisi dels mutants va revelar que en condicions salines aquests eren més resistents mentre que en condicions normals mostraven un creixement normal.

La SUMOilació i les respostes a estrès biòtic

Les plantes com a organismes sèssils estan exposats a una gran varietat de patògens microbians i herbívors. Per tal de protegir-se, les plantes han desenvolupat un mecanisme sofisticat per tal de percebre l'atac de patògens i parar la progressió de la infecció. Aquest sistema de vigilància està relacionat amb programes específics de resposta i defensa. La primera línia de defensa es activa per la percepció dels patrons moleculars associats a patògen (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) per receptors de reconeixement (PRRs, pattern-recognition receptors) localitzats en la superfície cel·lular. Aquesta via de senyalització es denomina com a immunitat activada per PAMP (PTI, PAMP-Triggered immunity) (Durrant & Dong 2004; Zipfel 2008). La via PTI dirigeix la inducció de la resistència basal protegint les plantes davant un ampli rang de patògens. Tanmateix, els patògens són capaços de suprimir aquesta resistència basal i infectar les cèl·lules vegetals. En aquest cas, les plantes han desenvolupat una segona línia de defensa denominada resposta hipersensible (HR, hypersensitive response). Aquesta HR es caracteritza per promoure la mort cel·lular mitjançant la

producció de espècies d'oxigen reactives (ROS, reactive oxygen species), per tal de limitar l'accès dels patògens a nutrients i aigua (Glazebrook 2005) La HR es típicament més específica de patògen que la resistència basal, degut a un reconeixement directe o indirecte d'efectors microbians tipus III (T3Es, type III effectors) (Mur et al. 2008) Una vegada la HR ha sigut activada a nivell local, el teixit vegetal comença a ser més resistent a un gran nombre de pathogens. Aquest fenomen es denomina resistència sistèmica adquirida (SAR, systematic acquired resistance) i necessita de l'acumulació de àcid salicílic per tal d'induir l'expressió de proteïnes relacionades amb la defensa envers el patògen (Durrant & Dong 2004; Stulemeijer & Joosten 2008). Altres respostes de defensa de les plantes fan servir les vies de senyalització del jasmonat i l'etilé. L'interacció entre ambdues vies de senyalització es complexa i activa diferents grups de gens que codifiquen per proteïnes antimicrobianes.

Els patògens de planta es classifiquen tradicionalment en dos grups principals: els biotrofos i els necrotrofos. Els biotrofos s'alimenten d'hospedadors vius mentre que les necrotrofos maten l'hospedador i s'alimenten dels restes. Les plantes responen diferent en front als organismes biotrofos i els necrotrofos. S'ha descrit per exemple que la mort cel·lular programada indueix una resposta hipersensible i promou la resistència en front als biotrofos mentre que afavoreix la infecció a necrotrofos. A més, diferents vies de senyalització promouen la susceptibilitat o la resistència depenent del tipus de patògen de la planta. Per altra banda, la inactivació de la via de resposta del jasmònic augmenta la susceptibilitat a la infecció de patògens necrotrofos. La qual cosa indicaria diferents vies de defensa dependents d'hormones. Així la via de l'àcid salicílic funcionaria envers a biotrofos mentre que la via del jasmònic i l'etilé promou la resistència envers a necrotrofos (Glazebrook 2005).

En els últims anys, l'estudi dels mecanismes de modificació post-traduccional com són la fosforilació, la ubiquitinació, la sumoilació, la nitrosilació i glicosilació, han revelat la seva importància i implicació en les respostes de defensa de les plantes envers a patògens. (Stulemeijer & Joosten 2008; Lois 2010). En aquest contexte s'ha descrit que la conjugació i/o la desconjugació de SUMO representa un dels mecanismes implicats en les respostes a la infecció per patògens en plantes (Hotson & Mudgett 2004; Beth Mudgett 2005). Els primers estudis que relacionaven la SUMOilació amb l'estrès

biòtic, identificaren la interacció entre l'enzim conjugador de SUMO i la proteïna iniciadora de la replicació, RepAC1, del TGMV (tomato Golden mosaic virus) i el virus TYCLSV (tomato yellow leaf curl Sardinia virus). Des de llavors han sigut diferents elicitors bacterians els que han sigut caracteritzats amb la capacitat de desconjugar els substrats de SUMO i manipular el sistema de modificació post-traducciona (Castillo et al. 2004) Es per això que els substrats de SUMO implicats en la via de senyalització de l'àcid salicílic així com les proteases de SUMO de fitobactèris han rebut un gran atenció en els últims anys (Park & Yun 2013).

Pel que fa a la caracterització dels mutants de la maquinària de SUMOilació en relació a l'estrès biòtic s'ha descrit que l'expressió dels gens de resposta a bacteris està incrementada en el mutant *siz1-2*. Aquests gens inclouen PR1 (pathogenesis related1) i PR5, una peroxidasa, EDS1 (enhanced disease susceptibility 1), PAD4 (phytoalexin deficient 4), EDS5/SID1 (enhanced disease susceptibility 5), i SID2 (salicílic acid induction-deficient 2). (Lee et al. 2007; Catala et al. 2007) De fet, SIZ1 funciona com a regulador negatiu de la via de síntesi de l'àcid salicílic, ja que el mutant *siz1-2* presenta nivells elevats de SA els quals aconseguixen reduir-se a nivells del ecotip silvestre en el doble mutant *nahG siz1-2* (Lee et al. 2007). Per tant la quantitat de SA produïda en la planta està regulada per la SUMOilació dependent de SIZ1. Com a conseqüència, aquestes plantes tenen constitutivament activada la resposta SAR, que juntament amb una major expressió de gens Pr en condicions basals, així com l'activació de l'expressió de NPR1 que és requerit per l'activació de la resposta sistèmica adquirida. Aquesta cascada promoguda pel SA dona lloc a una resistència d'aquest mutant davant la infecció del patògen bacterià *Pseudomonas syringae* (PstDC3000) (Lee et al. 2007). Aquesta elevada resistència al patògen ve donada per una deposició primerenca de calosa, la mort cel·lular espontània, i la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). A més, una major acumulació de SA en les plantes *siz1-3* resulta en un tancament dels estomes que redueix la invasió per patògens i confereix tolerància davant l'estrès hídric (Miura et al. 2011). Conforme a aquests resultats, s'ha descrit a més que els mutants *atsum1-1/amiR-SUM2*, els quals mostren un fenotip similar a *siz1-2*, presenten una elevada acumulació de SA, una expressió elevada de gens PR1 i resistència davant *PstDC3000* (van den Burg et al. 2010). D'altra banda, s'ha descrit que les plantes sobre-

expresores de SUMO1, SUMO2, SUMO3 tenen millorada la resistència a PstDC3000, probablement degut a que presenten igualment nivells elevats de SA. Tanmateix, únicament el transcrits de SUMO 3son reduïts en presència de SA i l'elictor Flg22, la qual cosa suggereix que SUMO3 actua per d'avall de la via de senyalització de SA i resulta en l'activació de l'expressió del gens PR (van den Burg et al. 2010).

Un altra evidència de la importància de la SUMOilació davant la infecció per patògens ve donada per l'existència de factors de patogen que interaccionen amb la maquinària de SUMOilació. Curiosament s'han identificat diversos factors virulents amb activitat cisteïna proteasa que tenen activitat peptidasa i isopeptidasa danvant de SUMO, actuant com proteases específiques de SUMO. Aquestos factors virulents desregulen l'equilibri de SUMO lliure i conjugat en la cèl·lula, compromentent el sistema de defensa del huèsped (Hotson & Mudgett 2004). Per entendre com els bacteris fitopatogènics aconseguen desregular la homesotasi i la funció de la maquinària de SUMOilació hem de tindre en compte que aquests utilitzen el sistema secretori de tipus III (TTSS), com per exemple en *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia*, o *Pantoea*. Aquests patògens injecten els efectors TTSS de tipus 3 o (T3Es) en la cèl·lula hospedadora. Aquestes proteïnes son determinants virulents crítics ja que manipulen les vies de senyalització de l'hospedador (Alfano & Collmer 2004). Més concretament, la família de la cisteïna proteasa T3E conté proteases de SUMO del tipus isopeptidasa, tot i que els bacteris no presenten el sistema de SUMOilació (Block et al. 2008). La primera cisteïna proteasa que va ser caracteritzada per tenir activitat específica envers a SUMO va ser YopJ. Aquet agent va ser identificat en *Yersinia pestis*, el bacteri causant de la peste negra en l'època medieval a Europa (Orth et al. 2000; Orth 2002). Aquesta proteïna funciona com una acetiltransferata i acetila residus serines i treonines de proteïnes implicades en la via de senyalització de les quinases MAPK (Mukherjee et al. 2006; Mukherjee et al. 2007). YopJ i altres membres de la seva família per exemple AvrBsT (Orth et al. 2000), AvrXv4 (Roden et al. 2004), AvrRxv (Bonshtien et al. 2005), and XopJ (Bartetzko et al. 2009) de *X. Camprestris* pv. *Vesicatoria* han sigut caracteritzats per tenir un centre catalític de His-Aps/Glu-Cys (Hotson & Mudgett 2004) L'expressió transitòria de mutants catalítics de AvrBsT (Orth et al. 2000) i AvrXv4 (Roden et al. 2004) en fulles de tabac elimina la inducció de la resposta hipersensitiva. A més, la inducció de

l'expressió de XopJ en *Arabidopsis* redueix els depòsits de cal·losa en les cèl·lules hospedadores que son infectades amb el patogen PstDC3000 que careix dels efectors T3E. Curiosament, la expressió transitòria de YopJ (Orth et al. 2000), AvrBsT (Hotson & Mudgett 2004) o AvrXv4 (Roden et al. 2004) en les cèl·lules vegetal disminueix els nivells de conjugats de SUMO. De fet, aquests efectors T3Es tenen activitat isopeptidasa de SUMO, ja que el patògens tenen la capacitat de manipular el sistema post-traducciona de l'hospedador. Tanmateix, les proteïnes diana de les cèl·lules hospedadores semblen ser específiques ja que els factors bacterians T3Es tenen localitzacions subcel·lulars similars a les de les proteases endògenes de SUMO. Així mentre que AvrXv4 localitza en el citoplasma (Roden et al. 2004), XopJ co-localitza en el complexe de Golgi (Bartetzko et al. 2009) , mentre que AvrRxv localitza en el citoplasma parcialment i entorn a la membrana nuclear (Bonshtien et al. 2005). D'altra banda XopD (Xanthomonas outer protein D) de *X. Campestris* es un altra cisteïna proteasa T3E (Hotson et al. 2003; Chosed et al. 2007) (Hotson et al. 2003; Chosed et al. 2007). Aquest efector bacterià interacciona amb el factor de transcripció MYB30, que regula positivament els mecanismes de defensa de la planta envers a patògens. Curiosament, la relocalització nuclear de MYB30 està regulada per la seva conjugació amb SUMO (Vailleau et al. 2002; Okada et al. 2009; Canonne et al. 2011; Zheng et al. 2012). Aquest factor de transcripció es un regulador positiu del de mort cel·lular programada durant la resposta hipersensitiva, en les respostes de la planta davant patògens així com de de la senyalització de l'àcid abscísic durant la germinació (Canonne et al. 2011; Zheng et al. 2012).

Finalment, cal comentar que recentment ha sigut descrita la SUMOilació de NPR1, un regulador essencial en la resistència basal i adquirida de les plantes, el qual confereix immunitat a través d'una cascada transcripcional, que inclueix activadors transcripcional (Ex. TGA3) i repressors (Ex., WRKY70) de gens antimicrobians (Saleh, Withers, Mohan, Marqués, et al. 2015). Es així que la SUMOilació de NPR1 per SUMO3 activa l'expressió de gens de defensa afavorint l'associació de NPR1 desde els repressors WRKY a els activadors transcripcionals TGA. A més, la SUMOilació de NPR1 activa la seva degradació permeten una inducció transitòria de la resposta immune. Conjuntament amb la fosforilació que inhibeix la modificació de NPR1 per SUMO, permeten un control postraducciona dinàmic i robust per controlar la resposta immune.

En resum, en els últims anys, s'ha descrit la importància de la SUMOilació durant les respostes de defensa de la planta envers als patògens bacterians tanmateix, a hores d'ara no s'han identificat alteracions en la subseptibilitat de les plantes mutants de la maquinària de SUMOilació davant patògens fúngics.

9. La regulació del cicle de SUMOilació

Com hem vist anteriorment, SUMO regula diferents funcions en les plantes. Per tal que les modificacions per SUMO siguin efectives, el cicle de sumoilació ha de ser regulat. Aquesta modulació de conjugats/desconjugats de SUMO es pot donar mitjançant la regulació de l'activitat i viabilitat dels components de la maquinària de SUMO com per un augment d'aquests o bé mitjançant canvis en la seva localització subcel·lular.

Regulació transcripcional de la maquinària de SUMOilació

Els nivells de transcrits d'alguns dels components de la maquinària de SUMO en mamífers es troben diferencialment expressats en funció del teixit, etapa de desenvolupament, estrès ambiental etc. (Watts 2013). D'altra banda, en plantes i concretament en arròs, s'ha descrit la regulació de l'enzim conjugadora de SUMO, OsSCE1 en resposta a diferents estresos. S'ha observat per exemple un augment del transcrit OsCSC1 en resposta a altes temperatures i una disminució del mRNA de OsSCE1 davant tractament amb PEG (polietilenglicol, utilitzat com agent osmòtic per generar un dèficit d'aigua en les plantes). La qual cosa indica que els transcrits d'aquest enzim estan regulats en funció de les condicions ambientals, en arròs (Nigam et al. 2008). No obstant, en *Arabidopsis*, s'observa una expressió a nivell de proteïna diferencial dels enzims de la maquinària de SUMO durant el desenvolupament de la planta que no es correlaciona amb canvis a nivell de mRNA, la qual cosa suggereix que deu estar regulat post traduccionalment (Manrique, no publicat).

La regulació de la localització subcel·lular de la maquinària de SUMOilació

La localització dels components de la maquinària de SUMO juguen un paper important en la regulació de la funció del sistema de sumoilació. La gran majoria dels

conjugats de SUMO presenten una localització nuclear, mentre que no tots els components de la maquinària de SUMO són nuclears; es per això que la relocalització dels enzims de la maquinària de SUMO podria jugar un paper molt important a l'hora de promoure la conjugació de SUMO en certs compartiments cel·lulars en determinades condicions. Així per exemple en *Saccharomyces cerevisiae* trobem que presenta dues proteases específiques de SUMO, Ulp1 i Ulp2, i ambdós mostren una localització diferent: Ulp1 es troba ancorada al NPC i Ulp2 és nuclear. Aquestes proteases tenen substrats diferents i aquesta especificitat de substrat ve donada en gran part per la localització dels enzims. Com que les formes truncades de la isoforma Ulp1 mostren una localització nuclear de l'enzim capaç de complementar el mutant *ulp2*; aquests resultats indicarien que la especificitat de substrat de Ulp1 ve donada en part per la seva localització (Li & Hochstrasser 2003). A més, Ulp1 es reclutat en el nuclèol en resposta a la toxicitat cel·lular induïda per alcohol donant lloc a un augment de conjugats cel·lulars. El segrestament de Ulp1 redueix la desconjugació de SUMO, pertorbant l'equilibri de conjugació-desconjugació resultant en un augment de conjugats de SUMO en resposta a aquest tipus d'estrès (Sydorsky et al. 2010). Encara queda per descriure quins factors i elements senyalitzen i regulen aquesta relocalització de l'enzim Ulp1.

S'ha descrit també un canvi de la localització cel·lular de la E3 lligasa de llevat durant el cicle cel·lular depenent de la fosforilació de l'enzim (Johnson & Gupta 2001). La qual cosa suggereix que en alguns casos la regulació del transport cel·lular dels enzims ve donada per modificacions post-traduccionals. A més, s'ha detectat la sumoilació de l'enzim conjugador i la lligasa de SUMO en llevat i en humans, encara que no està encara ben caracteritzada la rellevància biològica d'aquesta modificació.

En mamífers, no només està regulada la localització subcel·lular de l'E1 mitjançant la SUMOilació del seu domini C-terminal i la seva conseqüent retenció a nucli, sinó que la seva activitat enzimàtica pot ser igualment regulada mitjançant la unió de SUMO en diversos residus localitzats al voltant del domini cisteïna catalític, la qual cosa no afectaria la formació de l'enllaç tioèster E1-SUMO però sí que afectaria la interacció entre l'E1 i l'E2, ja que inhibiria la transferència del SUMO de l'E1 a l'E2. Més concretament es va trobar que durant un estrès de calor la SUMOilació del SAE2 es trobava reduïda, coincidint amb un augment de la conjugació. La qual cosa suggereix

que la SUMOilació del domini cisteïna catalític podria ser un mecanisme mitjançant el qual s'aconseguiria un emmagatzematge d'una reserva de SAE2 que pogués ser ràpidament activat davant diferents estressos ambientals (Truong, Lee & Chen 2012).

La regulació postraduccionals de l'activitat de la maquinària de SUMOilació

En els últims anys s'ha descrit a més la interacció de SUMO amb altres modificacions postraduccionals com un mecanisme important de regulació de la conjugació de SUMO als seus subtrats així com de la regulació global de la homeòstasi de SUMO a nivell cel·lular. En mamífers i llevat, la fosforilació, la ubiquitinació i la SUMOilació dels components de la maquinària de SUMO provoca diferents efectes.

En mamífers, no només està regulada la localització subcel·lular de l'E1 mitjançant la SUMOilació del seu domini C-terminal sinó que la seva activitat enzimàtica pot ser igualment regulada mitjançant la unió de SUMO en diversos residus localitzats al voltant del domini cisteïna catalític, la qual cosa no afectaria la formació de l'enllaç tioèster E1-SUMO però sí que afectaria la interacció entre l'E1 i l'E2, ja que inhibiria la transferència del SUMO de l'E1 a l'E2. Més concretament es va trobar que durant un estrès de calor la SUMOilació del SAE2 es trobava reduïda, coincidint amb un augment de la conjugació. La qual cosa suggereix que la SUMOilació del domini cisteïna catalític podria ser un mecanisme mitjançant el qual s'aconseguiria un emmagatzematge d'una reserva de SAE2 que pogués ser ràpidament activat davant diferents estressos ambientals (Truong, Lee & Chen 2012). En plantes, s'ha identificat la SUMOilació de SAE2, SIZ1 i SCE *in vivo*, encara que no s'ha caracteritzat el paper biològic d'aquestes modificacions postraduccionals (Miller et al. 2013; Elrouby & Coupland 2010)

Pel que fa a l'enzim conjugador s'ha postulat que la seva SUMOilació regula la especificitat de substrat, generant una nova superfície d'interacció amb un augment d'afinitat pel substrat (Knipscheer et al. 2008). Mentre que la SUMOilació de l'enzim conjugador de mamífers afectaria a la especificitat de substrat (Knipscheer et al. 2008) la modificació de l'Ubc9 de llevat per SUMO regularia negativament la SUMOilació de certs subtrats com les septines (Ho et al. 2011) necessari perquè es doni correctament el procés de meiosi (Klug et al. 2013).

S'han identificat també la ubiquitinació i acetilació d'alguns dels components de

la maquinària de SUMO. Diferents E3 lligases de SUMO de mamífers son reconegudes pel sistema de la Ubiquitina marcant aquesta proteïna cap a la degradació via proteosoma, regulant la disponibilitat de les E3 lligases de SUMO (Depaux et al. 2007).

D'altra banda els efectes de la interacció entre la fosforilació i la SUMOilació ha sigut ampliament estudiada en els últims anys (Wilkinson & Henley 2012). La presència de motius de SUMOilació dependents de fosforilació anomenats (PDSM), ha sigut descrit en diversos substrats de mamífers, suggerint una relació important entre la SUMOilació i la fosforilació (Bossis et al. 2006; Hietakangas et al. 2006). La fosforilació d'aquests motius pot regular regular positivament o negativament la SUMOilació d'un substrat (Muller et al. 2000; Bossis et al. 2005; Khan et al. 2014). En plantes i més concretament en Arabidopsis, aquesta interacció entre la fosforilació i la SUMOilació ha sigut descrita per exemple en el factor de transcripció CESTA (CES) que regula la resposta a brassinosteròids. La localització subcel·lular i l'estabilitat d'aquest factor de transcripció està regulada per l'antagonisme de la fosforilació i la SUMOilació envers a un motiu concret de SUMOilació (Khan et al. 2014). Més recentment, aquest antagonisme entre la SUMOilació i la fosforilació ha sigut descrit de forma similar en la regulació post-traducciona NPR1, un regulador essencial en la resistència basal i adquirida de les plantes. Mentre que la SUMOilació permet la interacció de NPR1 amb activadors transcripcionals de gens implicats en la defensa anti-microbiana així com la degradació d'aquesta proteïna reguladora, la fosforilació inhibeix la SUMOilació permetent la seva estabilitat (Saleh, Withers, Mohan, Nomoto, et al. 2015).

Pel que fa als estudis desenvolupats en el nostre laboratori i més concretament en relació a la regulació post-traducciona de la maquinària de SUMOilació, resultats anteriors al desenvolupament d'aquesta tesi van permetre identificar una nova modificació del SAE2 no caracteritzada en cap estudi anterior. Més concretament, es va observar durant l'anàlisi de l'acumulació del SAE2 en extractes de roseta i sílicua un canvi en la mobilitat de l'enzim (**Figura 5**). De fet, el SAE2 dels extractes de sílicua va mostrar una lleugera disminució en la seva grandària molecular aparent observada en experiments d'immunodetecció mitjançant western-blot.

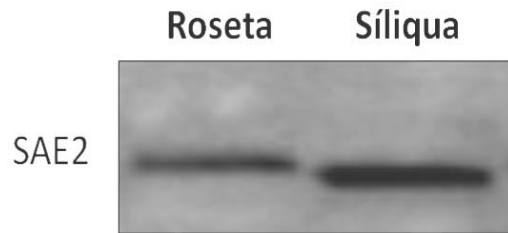


Figura 5. El SAE2 es processat postranscripcionalment en les síliques. Anàlisi per wester-blot de la proteïna SAE2. Els extractes de proteïna total de teixits de roseta i síliqua de plantes Col-0 van ser resoltes mitjançant gel SDS-PAGE i analitzades mitjançant un anàlisi d'immunodetecció amb l'anticòs anti-SAE2.

En aquest contexte, i tenint en compte el paper fonamental de la SUMOilació en el desenvolupament de la planta i més concretament de la llavor es va hipotetitzar sobre la possible existència d'un nou mecanisme de regulació fins ara no descrit que estaria basat en la regulació postraduccional del SAE2.

10. L'expressió del domini SAE2^{UFDct} com a eina molecular per a l'estudi de la SUMOilació

Molts dels processos regulats per la SUMOilació en plantes han sigut descrits mitjançant l'anàlisi dels mutants de les proteases o les E3 lligases de SUMO, els quals mostren defectes pleiotròpics en el creixement i una viabilitat reduïda de les seves llavors (Lois 2010; Ishida et al. 2012). Tanmateix, algunes d'aquestes mutacions han sigut proposades de tenir la capacitat de conferir respostes adaptatives a alguns estressos com per exemple a la salinitat, la sequera, la resistència als virus de plantes així com la immunitat mediada per l'àcid salicílic (Lee et al. 2007; Miura et al. 2011). Tanmateix i malgrat el creixement de l'interès per estudiar les característiques d'interès agronòmic regulades per SUMO, els esforços per estudiar aquest sistema de regulació en plantes ha sigut molt limitat i més concretament fent servir com a models de plantes, l'arròs i el blat de moro (Srilunchang et al. 2010; Wang et al. 2011b). Aquesta limitació en l'estudi de SUMO en altres plantes d'interès agronòmic ve donat pel fet de no tenir eines moleculars com els mutants knock-out. D'altra banda, s'ha de tenir en compte que molt probablement els efectes severos observats en el desenvolupament i creixement de plantes que tenen mutat algun dels components de la maquinària de SUMOilació com per exemple *siz1*, *mms21* o *esd4*, podrien emascarar el paper regulador de SUMO en

molts processos que puguin ocórrer en el desenvolupament tardà de les plantes o que estiguin amagats pels fenotips pleiotròpics. Per exemple, els defectes en el desenvolupament de *siz1* són dependents de l'acumulació d'àcid salicílic. En aquest context, desenvolupar noves eines que aconseguixin de manera específica i/o moderada inhibir la SUMOilació podrien contribuir a obtenir de manera significativa avanços en la comprensió acurada de la funció biològica de SUMO. Si considerem la universalitat del sistema de SUMOilació, la utilització d'aquestes noves eines podria ser extesa a altres eucariotes, incloent mamífers.

Per tal de desenvolupar un inhibidor específic i alternatiu de la conjugació de SUMO, els treballs desenvolupats en el nostre laboratori durant els últims anys i publicats recentment (Castaño-Miquel et al. 2017) ens ha permès aprofitar l'ampli coneixement disponible dels mecanismes moleculars implicats en la SUMOilació (Schulman 2011). Més específicament, hem fet servir la disrupció de les interaccions enzimàtiques entre l'enzim activador E1 i l'enzim conjugador E2, els quals són essencials en la cascada de conjugació de SUMO (Lois & Lima 2005). Curiosament, la regió del SAE2 implicada en les interaccions amb el SCE1 mostra un baix grau de conservació de dos a sis vegades menys respecte al grau de conservació de la resta del domini UFD o el domini cisteïna catalític quan es comparen els ortòlegs d'*Arabidopsis*, humans i llevat (Castaño Miquel 2015). Aquesta divergència localitzada suggereix, que aquesta regió que anomenada LHEB1 and 2 (Low Homology involved in E2 Binding 1 and 2), ha evolucionat per tal d'optimitzar les interaccions entre aquests dos enzims d'una forma intra-específica i com a resultat s'han generat superfícies d'interacció divergents entre espècies evolutivament distants (Liu et al. 2017) Entre les evidències que recolzen aquesta hipòtesi, trobem estudis previs desenvolupats pel nostre laboratori i altres autors on mostren que la eficiència del sistema de conjugació de SUMO en human *in vitro* és dràsticament reduïda quan l'enzim conjugador E2 és substituït pels ortòlegs d'*Arabidopsis* (Lois et al. 2003) o el de *Plasmodium* (Reiter et al. 2013). Pel que fa al E2, la regió implicada amb la unió al SAE2 està millor conservada entre espècies i a més participa en les interaccions no-covalents amb SUMO, les quals són necessàries per la formació de les cadenes de poli-SUMO (Knipscheer, van Dijk, Olsen, Mann, White, et al. 2007; Capili & Lima 2007; Castaño-Miquel et al. 2011). Es per això que per tal de

desenvolupar un inhibidor competitiu i específic de la conjugació de SUMO *in vivo*, s'ha fet servir el domini SAE2^{UFDct} el qual és essencial i no estableix múltiples interaccions durant la conjugació de SUMO.

La validació d'aquesta estratègia mitjançant assajos *in vitro* de conjugació de SUMO fent servir el domini SAE2^{UFDct} mostraren que la inhibició de la conjugació de SUMO està directament correlacionada amb la quantitat present d'aquest domini (Castaño Miquel 2015). La qual cosa indica que els mecanismes moleculars implicats en la transferència de SUMO de l'E1 a l'E2 estan conservats en Arabidopsis i que el domini SAE2^{UFDct} reté la capacitat inhibidora prèviament descrita per al domini SAE2^{UFDct} humà (Lois & Lima 2005). Paral·lelament, mitjançant experiments d'expressió transitoria, es va observar que el domini AtSAE2 Ubl i AtE2 interaccionen *in vivo*.

Un cop validada l'estratègia *in vitro*, es van generar plantes transgèniques que expressaven el domini SAE2^{UFDct} sota el control d'un fort promotor constitutiu, el CaMV 35S (**Figura 6**). En aquestes plantes, l'acumulació de conjugats de SUMO estan reduïts en relació directa als diferents nivells SAE2^{UFDct} que van ser seleccionats en diferents línies independents. Curiosament, els nivells de SCE1 en aquestes plantes estaven significativament augmentats mentre que les del SAE2 no estaven afectats. D'altra banda, les plantes sobreexpressores del SAE2^{UFDct} mostraren alteracions en el desenvolupament com nanisme i floració primerenca prèviament descrit en l'anàlisi del mutant la lligasa de SUMO AtSIZ1. A més, el grau d'afectació d'aquests fenotips està directament relacionat amb els nivells d'acumulació del domini SAE2^{UFDct}. Cal comentar a més, que estratègies prèvies per tal d'inhibir la SUMOilació *in vivo* mitjançant l'expressió d'una forma inactiva del SCE1 van fallar com a resultat de la inestabilitat d'aquest enzim recombinant (Lois et al. 2003; Tomanov et al. 2013). Contràriament, al nostre laboratori hem pogut desenvolupar una nova estratègia que ens permeti inhibir la conjugació de SUMO *in vivo*.

En resum, la disrupció de les interaccions entre l'E1 i l'E2 de SUMO mitjançant el domini SAE2^{UFDct}, constitueix una estratègia vàlida per inhibir la conjugació de SUMO *in vitro* i *in vivo*. És per això que la utilització del domini SAE2^{UFDct} com a competidor inhibitori de les interaccions E1-E2, constitueix una nova eina molecular que pot fer-se servir per estudiar la funció biològica de SUMO en organismes on els mutants de la

maquinària de SUMO il·lació no estan disponibles així com per poder inhibir de espacial i temporalment la conjugació de forma precisa mitjançant la utilització de promotors específics de teixits o estadis de desenvolupaments concrets.

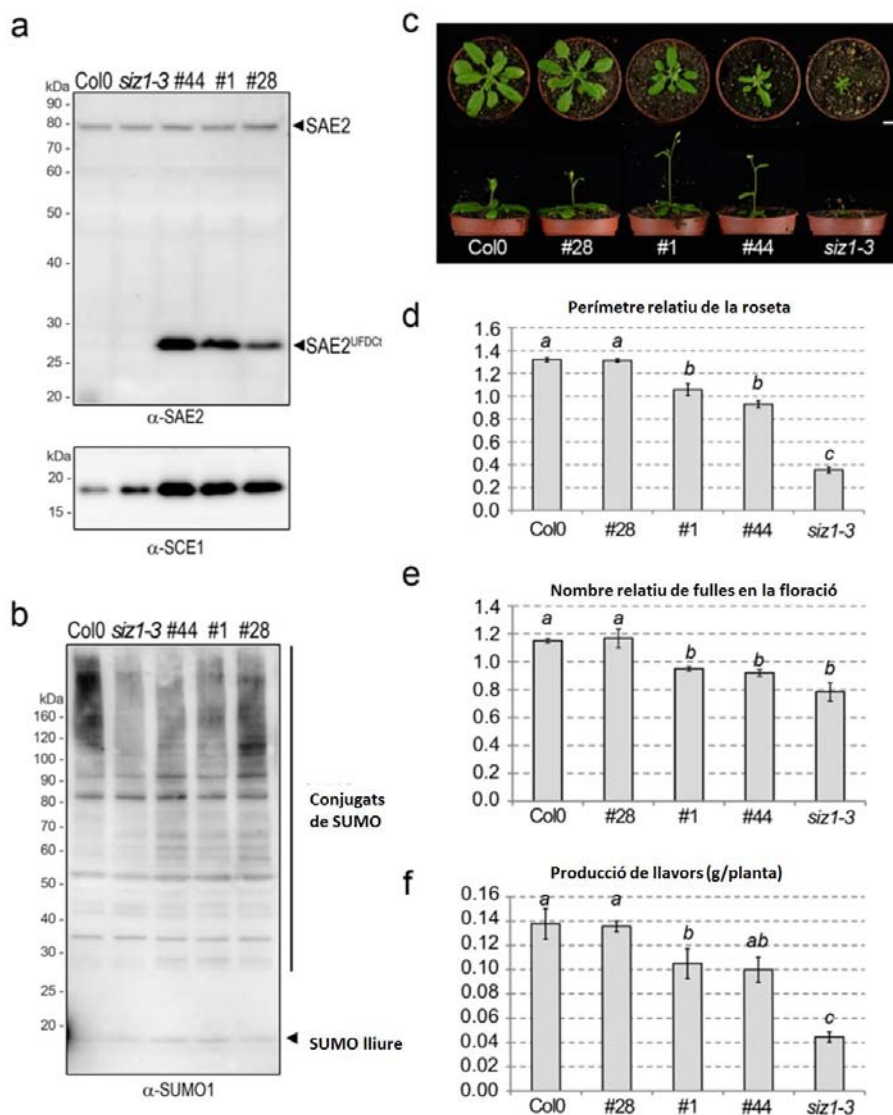


Figure 6. Efecte de l'expressió del domni SAE2^{UFDC1} en la conjugació de SUMO i el desenvolupament de la planta. (a, b) Efecte de l'expressió del domni SAE2^{UFDC1} en ELS nivells de conjugació de SUMO, el SAE2 i el SCE1. Extractes de proteïna total de plàntules de 4 dies es van resoldre en gel SDS-PAGE i analitzades mitjançant immunoblot. **a)** anticossos anti-SAE2, anti-SCE1 and **(b)** anti-SUMO1 **(c)** Plantes de 3 setmanes crescudes en condicions de dia llarg. La barra de l'escala representa 1 cm. S'ensenyen vistes superiors i laterals de plantes representatives. **(d)** Anàlisi del perímetre de la roseta segons el perímetre de l'el·lipse definida per les puntes de les tres fulles més externes per a cada roseta. Es representen els valors mitjos i les barreres d'error estàndard de valors relatius obtinguts de quatre rèpliques biològiques. **(e)** El nombre de fulles de la roseta durant la floració es van monitoritzar quan la inflorescència arribava a 1cm. El promig dels valors i l'error estàndard es representen en el graphic. **(f)** Les llavors van ser recollides de plantes individuals quan les plantes estaven seques i completament seques i a continuació es van pesar. Els valors promig i l'error estàndard dels valors relatius obtinguts de tres rèpliques biològiques es representen al gràfic.

OBJECTIUS

SUMO modula processos biològics tan importants com el desenvolupament i les respostes a estrès biòtic i abiòtic. La seva rellevància suggereix l'existència de processos biològics regulats per SUMO encara per descobrir. Tanmateix i malgrat la seva importància, els mecanismes que permeten la regulació de la SUMOilació *in vivo* són fins ara molt poc coneguts.

En aquest context, l'objectiu general d'aquesta tesi ha sigut estudiar nous mecanismes de la regulació de la SUMOilació *in vivo*, i avançar en el coneixement de les seves funcions biològiques. L'abordatge d'aquest objectiu general s'ha realitzat mitjançant els següents objectius concrets:

1. Caracteritzar les implicacions moleculars, cel·lulars i funcionals del processament de la subunitat gran del enzim activador de SUMO (SAE2).
2. Descriure noves funcions biològiques de SUMO: cicle circadià, desenvolupament de la flor i defensa de la planta davant de patògens fúngics.

CAPÍTOL 1. Caracterització molecular i funcional del processament del SAE2.

1. Caracterització molecular del processament del SAE2

Estudis anteriors en el nostre laboratori (Castaño Miquel 2015) van permetre identificar una nova modificació postraduccionals de l'enzim E1 activador de SUMO, fins ara no descrita (**Figura 5**). Més concretament, quan es va analitzar l'acumulació del SAE2 en siliques d'*Arabidopsis*, es va observar un canvi de mobilitat d'aquest enzim suggerint que el SAE2 estaria d'alguna manera modificat postranscripcionalment. Uns dels objectius d'aquesta tesi era caracteritzar aquest mecanisme de regulació i determinar les seves implicacions biològiques.

1.1. *El processament postraduccionals del SAE2 té lloc al seu domini SAE2^{Ct}.*

Quan es van avaluar els nivells endògens d'expressió del SAE2 i el domini recombinant SAE2^{UFD^{Ct}} en extractes proteics de roseta i síliques en plantes Col-0 i en plantes sobreexpressores del SAE2^{UFD^{Ct}} respectivament, mitjançant un anàlisi western-blot, es va observar una mobilitat diferent tant en el SAE2 com en el domini SAE2^{UFD^{Ct}} depenent de teixit (**Figura 7 A,B**). Aquest fet indicava l'existència d'una nova i desconeguda modificació postraduccionals que es donaria concretament al domini SAE2^{UFD^{Ct}}.

Per tal de discriminar entre el processament o altres modificacions postraduccionals, es va incubar el domini recombinant His::SAE2^{UFD^{Ct}} en presència d'extractes de síliques o roseta de plantes Col-0. La incubació es va realitzar a 30°C i es van extreure alíquotes de les reaccions a diferents temps per a un posterior anàlisi mitjançant immunodetecció. La (**Figura 7B**) mostra l'increment de la forma de SAE2^{UFD^{Ct}} de mobilitat més gran de manera proporcional al temps d'incubació en presència d'extractes de síliques. Aquests resultats suggerien que la mobilitat diferencial del domini SAE2^{UFD^{Ct}} és el resultat d'un processament proteolític. L'addició de diferents inhibidors de proteases d'ampli espectre (metaloproteases, quimiotripsina, tripsina, lisosomals, i proteases aspartiques, citeíniques i seríniques) en la reacció va tenir un efecte inhibitori

petit en el processament, però no el va abolir.

Per tal d'identificar el lloc precís de processament, es va realitzar una reacció preparativa amb 10µg del domini His::SAE2^{UFDct}. El domini recombinant His:: SAE2^{UFDct} es va incubar 60 minuts en presència d'extractes de roseta i síliqua de plantes Col-0, i es va purificar per cromatografia d'afinitat níquel. El producte de la reacció es va resoldre en gel SDS-PAGE, es va tenyir amb Coomassie i es va analitzar mitjançant espectrometria de masses. L'espectre obtingut indicava que el SAE2^{UFDct} era processat en el C-terminal en la Ser618, eliminant un pèptid de 8 aminoàcids (**figura 7D**). Aquest fragment de 8 aminoàcids presenta un enriquiment en residus bàsics, suggerint que podria tractar-se d'una senyal de localització nuclear no canònic, ja que no es correspon a cap consens de senyal de localització nuclear (Kosugi et al. 2009). Considerant què el domini SAE2^{UFDct} juga un paper essencial en l'activitat de l'E1 establint interaccions no-covalents amb l'enzim E2, així com determinant la seva localització nuclear mitjançant la presència d'un senyal de localització nuclear consens (NLS1) en el domini C-terminal (Lois & Lima 2005; Castaño-Miquel et al. 2013), el processament identificat afegiria un nivell addicional de la regulació de la funció de l'E1.

La nostra hipòtesi de partida es va basava en l'existència d'una possible modulació de la conjugació subcel·lular de SUMO mitjançant la regulació de la localització subcel·lular del enzim activador (SAE2) a través d'un processament postraduccional del domini C-terminal que escindiria una senyal de localització no canònica.

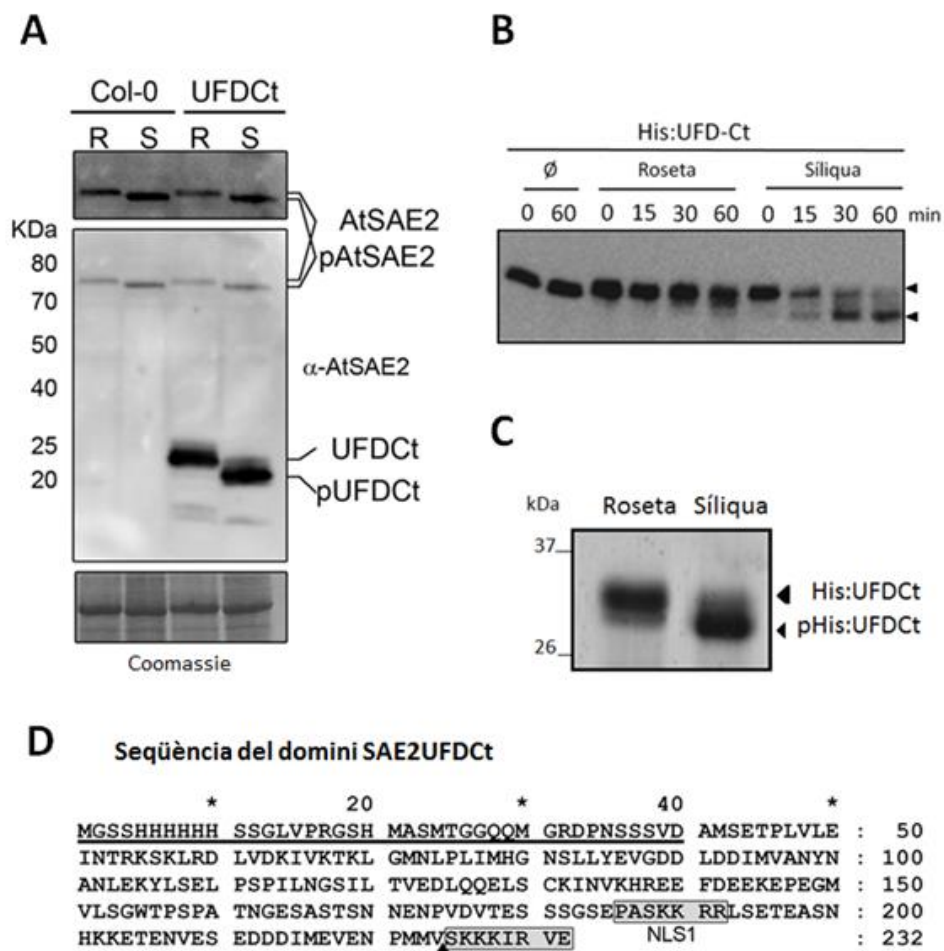


Figura 7. El domini SAE2^{UFDct} es processat postraduccionalment en les síliques. (A) Anàlisi per wester-blot de la proteïna SAE2. Els extractes de proteïna total de teixits de roseta i síliqua de plantes Col-0 i plantes sobre-expressores de SAE2^{UFDct} van ser resoltes mitjançant gel SDS-PAGE i analitzades mitjançant un anàlisi d'immunodetecció amb l'anticòs anti-SAE2. (B) El domini recombinant His:SAE2^{UFDct} va ser incubat a 30°C en presència d'extractes de roseta i síliqua procedents de plantes Col-0 suplementats amb ATP. En diferents temps puntuals es van agafar alíquotes i es van desnaturalitzar en presència de tampó de càrrega. Les proteïnes van ser resoltes en gel SDS-PAGE i analitzades mitjançant immunoblot amb l'anticòs anti-SAE2. (C) La forma no processada i processada del domini His:SAE2^{UFDct} generat per incubació en presència d'extractes de roseta i síliqua van ser purificats mitjançant una cromatografia d'afinitat de Níquel i els productes eluïts es van resoldre per SDS-PAGE. Els domini recombinant no processat i processat es van tenyir amb Coomassie, es van extreure del gel i es van analitzar per espectrometria de masses. (D) La seqüència aminoacídica del His:SAE2^{UFDct} mostra la identificació del lloc processat amb una fletxa i un quadre. S'indica la senyal de localització nuclear consens NLS1 descrita en (Castaño-Miquel et al., 2013).

1.2. La valina 617 és essencial per al processament del domini SAE2^{UFDct}

Per aprofundir en el coneixement de les bases moleculars del processament de SAE2, es va realitzar un estudi de mutagènesi dirigida dels residus que limiten el lloc de tall i es va analitzar el seu efecte en l'escissió del octapeptid C-terminal del domini SAE2^{UFDct}. Concretament, la valina 617 es va substituir per un aspàrtic i la serina 618 es va substituir per una alanina. Els dominis SAE2^{UFDct} Val617D i SAE2^{UFDct} Ser618A van ser produïts en *E. coli* i posteriorment purificats per cromatografia d'afinat a níquel amb una columna IMAC Sepharosa (**Figura 8**).

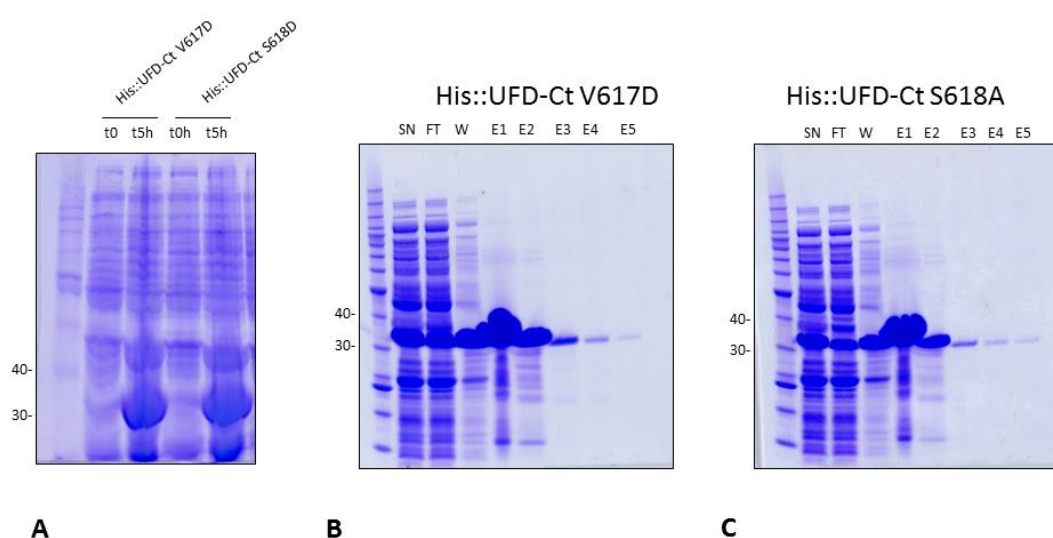


Figura 8. Expressió i purificació dels dominis SAE2^{UFDct} mutats. **A.** Tinció en Comassie de SDS-PAGE on es mostra la inducció amb IPTG de l'expressió del domini SAE2^{UFDct} V617D i el domini SAE2^{UFDct} S618A. Es van preparar extractes totals de proteïna provinents de cèl·lules de cultiu d'*E. coli* abans (t0) i cinc hores (t5) de la inducció de l'expressió de la proteïna recombinant i es va resoldre mitjançant electroforesis desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) en un gel de 12%. **B.** Tinció Comassie de SDS-PAGE on es mostra la purificació del domini His::SAE2^{UFDct} V617D. **C.** Tinció Comassie on es mostra la purificació del domini His::SAE2^{UFDct} S618A. SN (fracció del sobrenedant), FT (fracció *Flow through*), W (fracció del rentat o *Wash*). E1-E5 (les diverses fraccions de la proteïna eluïda).

El domini SAE2^{UFDct} V617D, el domini SAE2^{UFDct} S618A i el domini SAE2^{UFDct} nadiu van ser incubats en presència d'extractes de proteïna de siliques verdes de 10-15 dies de plantes Col-0 de set setmanes crescudes en condicions de dia llarg (16h de llum/8 h de foscor) a 22°C de temperatura. Les incubacions es van fer a 30°C i es va treure una

alíquota a temps 0 i a 30 minuts. Com a control, es van incubar els diferents dominis en el tampó d'extracció de proteïnes però sense cap extracte proteic. La incubació de la reacció es va realitzar en presència de diferents inhibidors de proteases, els quals estan dirigits a un ampli espectre de proteases. La **figura 9** mostra que el domini nadiu SAE2^{UFDct} i el domini mutat SAE2^{UFDct} Ser618A són processats en presència d'extractes de síliqua mentre que no s'observa processament en la forma mutada SAE2^{UFDct} Val617D.

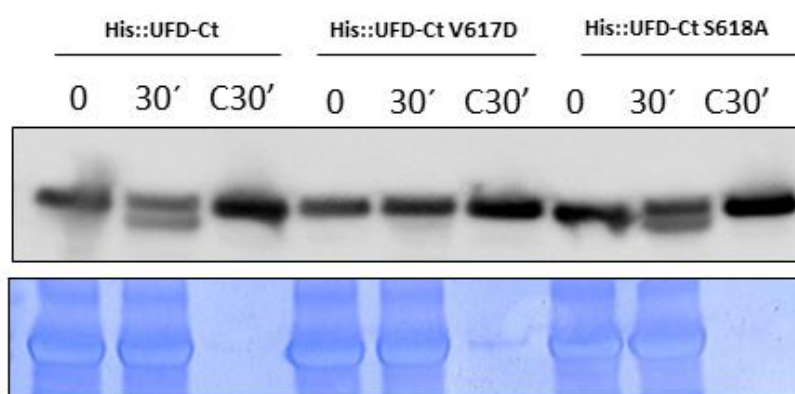


Figura 9. La valina 617 és essencial per al processament del SAE2^{UFDct} del SAE2. Anàlisi per *Western Blot* del processament de les diferents formes mutades del domini SAE2^{UFDct}. Es va incubar 2 µg de proteïna recombinant (His::SAE2^{UFDct}, His::SAE2^{UFDct} V617D, His::SAE2^{UFDct} S618A) en un volum total de 100 µl en presència d'extractes de proteïna (350µg de proteïna total de síliqua verda de plantes Col-0) a 30°C. Als 0 i 30 minuts es va treure una alíquota de 15 µl i es va desnaturalitzar en presència de tampó de càrrega. Es va carregar 0.2 µg de proteïna recombinant en cada carril. Les proteïnes es van resoldre mitjançant SDS-PAGE en gel de gradient i immunodetecció amb l'anticòs policlonal anti-SAE2. La part inferior mostra la tinció en Coomassie de la membrana com a control de càrrega.

1.3. *Distribució temporal i espacial del processament del SAE2.*

La formació de fruit és un procés altament regulat en el que es produeixen canvis moleculars, fisiològics i morfològics dramàtics. Els nostres resultats indicaven que l'enzim activador de SUMO experimentava un processament en algun moment de la formació del fruit.

Per tal d'ajudar a entendre la rellevància biològica del processament del SAE2, van procedir a determinar en quin moment del desenvolupament de la síliqua es dona aquest processament. Es van marcar els meristemes florals de les inflorescències de plantes d'*Arabidopsis thaliana* crescudes en condicions de dia llarg (16h llum/8 fosc)

a 22°C de temperatura i es van agafar mostres de meristemes florals com a punt 0. La primera marca es va realitzar posant un fil vermell a aquelles flors que encara no s'havien obert però comencen a deixar veure el primer pètal (dia 1). A partir d'aquest moment, es van agafar mostres que inclouen els períodes de 1 a 5 dies, de 6 a 10 dies, de 11 a 15 dies i de 16 a 20 dies. Com a controls del processament del SAE2 es va fer servir extractes de proteïna recombinant de la forma nadiua (N) i processada (P) del SAE2 expressada en *E. coli* i, com a control negatiu, extractes de roseta (R) de plantes de 7 setmanes. Els diferents extractes proteics es van resoldre mitjançant electroforesis desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) en un gel de 10%, i es van analitzar per immunoblotting amb anticossos anti-SAE2. Els resultats obtinguts van mostrar que el processament del SAE2 ocorre aproximadament a partir dels 10 dies post-antesi (10 DPA), coincidint amb el començament de la fase de maduració del fruit (**Figura 10 A,B**).

Amb l'objectiu de caracteritzar la distribució espacial del processament del SAE2 en la síliqua d'*Arabidopsis thaliana*, a partir de la dissecció de síliques verdes de 10-15 dies (S) de plantes de 7 setmanes crescudes en condicions de dia llarg (16h de llum/8 h de fosc) a 22°C de temperatura, es van obtenir diferents extractes proteics vegetals procedents de les diferents estructures que constitueixen el fruit; valves (V), septe (Sep) i llavors verdes (L) (**Figura 10 C,D**). Com a controls del processament del SAE2 es va fer servir extractes de proteïna recombinant expressada en *E. coli*, de la forma nadiua (N) i processada (P) del SAE2 així com extractes de roseta (R) i síliques de 10-15 dies (S) de plantes de 7 setmanes. Els diferents extractes proteics es analitzen de la manera descrita al paràgraf anterior. La (**figura 10B**) mostra que el processament del SAE2 no ocorre ni en la valva ni en el septe sinó que es presenta majoritàriament en les llavors verdes.

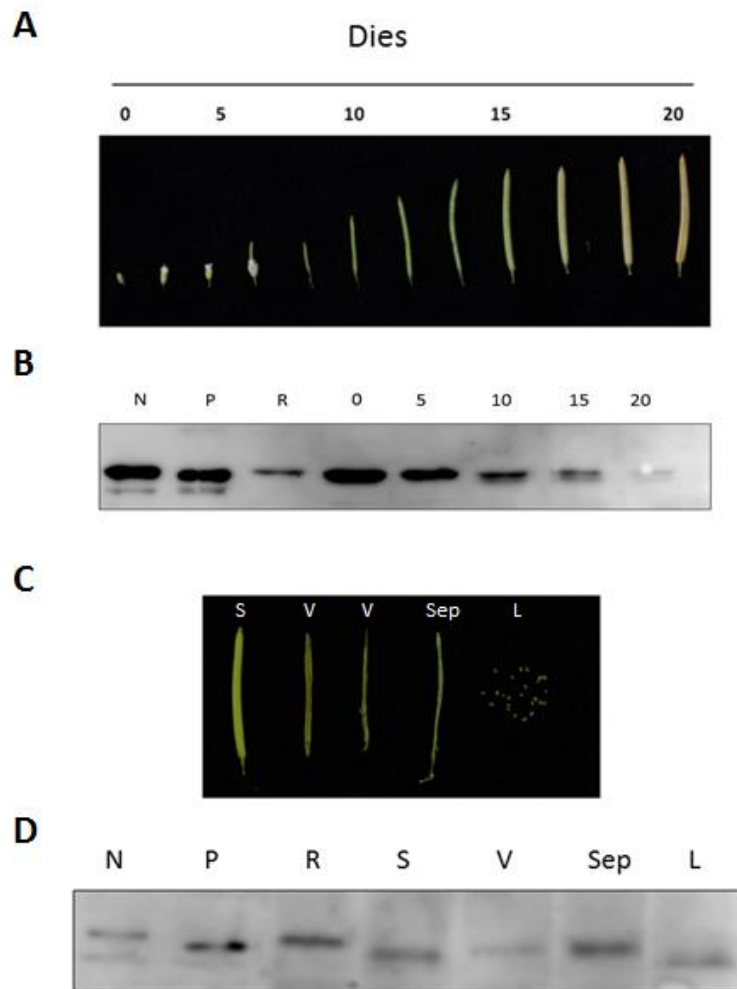


Figura 10. El SAE2 es processat en llavors formades. A. Imatges del desenvolupament de la síliqua d'Arabidopsis analitzats en B. **B.** Anàlisi per western-blot de l'expressió del SAE2 en extractes de proteïna total de diferents estadis de desenvolupament de les flors i síliques d'Arabidopsis. Les formes nadiua (N) i processada (P) del SAE2 que es van fer servir com a control del processament i van ser obtingudes mitjançant expressió i purificació de proteïna recombinant de E.coli. Es van analitzar extractes de proteïna total dels següents diferents teixits: rosseta (R), meristemes florals abans de que es doni la antesi (0 dies), flors de 1 a 5 dies, flors i/o fruits de 6 a 10 dies, fruits verds de 11 a 15 dies i fruits pròxims a la maduració de 16 a 20 dies (20DPA). **C.** Imatges dels diferents teixits de la síliqua d'Arabidopsis analitzats en D. **D.** Anàlisi per western-blot de l'expressió del SAE2 en extractes de proteïna total de diferents teixits de la síliqua: rosseta (R), síliqua (S), i valva (V), setpe (S) i llavors (L) resultat de la dissecció de síliques de 10-15 dies. En tots el casos de teixits de plantes, cada carril conté 18 µg de proteïna. Els extractes de proteïna van ser analitzats mitjançant SDS-PAGE i immunodetecció amb anticòs anti-SAE2.

2. La localització subcel·lular de l'enzim activador de SUMO (E1) està regulada mitjançant el processament del extrem C-terminal del SAE2.

El complex del porus nuclear (NPC) constitueix l'entrada i sortida del tràfic macromolecular entre el nucli i el citoplasma. El NPC està format per un complex multiproteic constituït per trenta nucleoporines (Nups) diferents que en conjunt generen una estructura similar a un canal (Tamura & Hara-Nishimura 2014). Les carioferines, també denominades importines i exportines, són receptors de transport nuclear i adaptadors que s'uneixen a motius peptídics específics presents en la proteïna transportada o càrrega. Aquests motius peptídics constitueixen els senyals de localització nuclear (NLS) o d'exportació (NES) (Görllich & Kutay 1999; Lange et al. 2007). Així, les Nups del NPC permeten l'entrada dels complexos receptor-càrrega al porus i, en conseqüència, l'accés selectiu al nucli o el citosol, respectivament (Tamura & Hara-Nishimura 2014). L'enzim Ran, amb activitat GTPasa, actua com a un interruptor molecular regulant la direcció del transport nucli-citoplasma. La localització citoplasmàtica de l'enzim RanGAP (Ran GTPase-activating protein) i nuclear de l'enzim RCC1 (factor intercambiador de Guanosina) permet una elevada concentració de RanGDP en el citoplasma i de RanGTP en el nucli, creant un gradient que facilita el transport entre els dos compartiments. Al nucli, l'enzim Ran acomplexat amb GTP, RanGTP, té dues funcions: durant la fase final d'importació al nucli, l'associació de la RanGTP amb les importines activa l'alliberament de la proteïna carregada dins dels nucli; mentre que durant l'exportació nuclear, RanGTP estabilitza la interacció entre les exportines i les proteïnes càrrega. Fora del nucli, la hidròlisi de la RanGTP a RanGDP facilitada per la unió a RanGAP resulta en l'alliberament de RanGDP de les exportines i, conseqüentment, es dissocia la proteïna carregada del complex d'exportació (Görllich & Kutay 1999; Merkle 2001; Pemberton & Paschal 2005; Meier & Somers 2011)(Figura 11).

En general, el transport nuclear de proteïnes s'inicia per la formació d'un complex ternari entre les importines α i β i la proteïna transportada o cargo. En aquest complex, la importina α interacciona amb el cargo i la importina β acobla el complex al NPC. La importina α reconeix principalment dos classes de NLSs, els senyals coneguts com a *monopartits*, els quals presenten un únic grup d'aminoàcids bàsics, i els senyals bipartits que tenen dos grups d'aminoàcids bàsic separats per una regió connectora de

10-12 aminoàcids (Lange et al. 2007). Dins dels senyals monopartits trobem dos tipus de NLSs; un que presenta almenys quatre aminoàcids bàsics consecutius que és exemplificat pel NLS de l'antigen T del virus SV40 (PKKKRKV)(Kalderon et al. 1984), mentre que l'altre tipus presenta tres aminoàcids bàsics, motiu que s'adapta a la seqüència consens $K(K/R)X(K/R)$, i està representat pel NLS del factor de transcripció c-Myc (PAAKRVKLD) (Dang & Lee 1988). Pel que fa a la seqüència consens del senyal *bipartit*, aquesta ha sigut definida com $(K/R)(K/R)X_{10-12} (K/R)_3/5$, on $(K/R)_3/5$ representa almenys tres residus de lisina o arginina en una seqüència consecutiva de cinc aminoàcids, i on la regió connectora s'ha descrit com a tolerant al grau de conservació dels aminoàcids que la constitueix (Dingwall & Laskey 1991; Robbins et al. 1991)

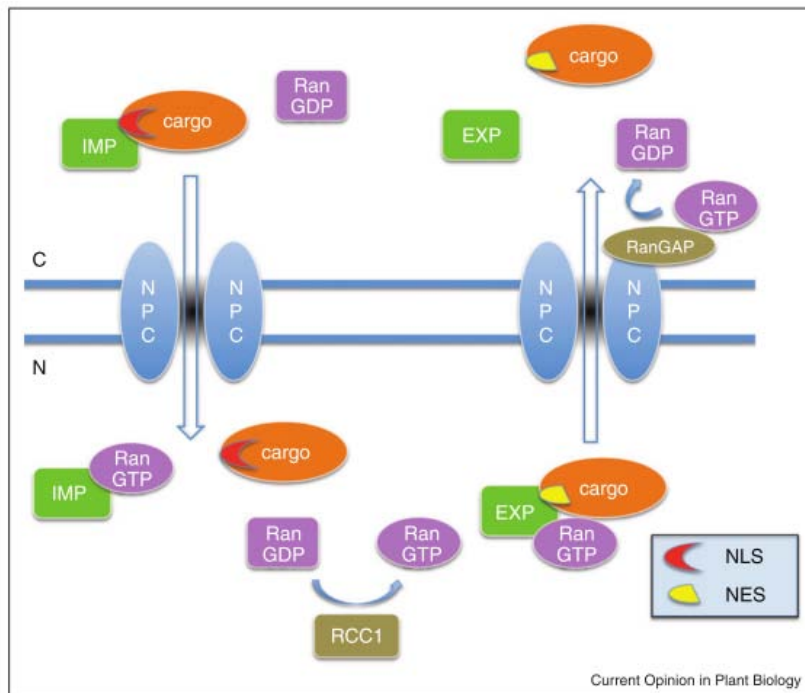


Figura 11. Mecanisme de transport nucli-citoplasma de proteïnes en eucariotes. Esquema simplificat del transport actiu de proteïnes entre el citoplasma i el nucli. El complex del porus nuclear (NPC) permet el trànsit entre en el citoplasma i el nucleoplasma. Les proteïnes transportades (carga) contenen almenys un senyal de localització nuclear (NLS) i aquest s'uneix en el citoplasma a receptors transportadors denominats importines (IMP). Les IMP consisteixen en una importina α que s'uneix al NLS, i un receptor d'importació (importina β) que s'uneix a l'adaptador d'importació (importina α) i al NPC. Les IMP poden travessar el NPC bidireccionalment. La unió de la RanGTP en el nucli dissocia l'IMP de la proteïna transportada (carga). Paral·lelament, la localització nuclear del factor RCC1 (factor d'intercanvi Ran guanosina) permet la generació de RanGTP, afavorint la formació del complex terciari constituït per la proteïna transportada (carga) que s'exporta, la exportina i la RanGTP. de manera que les

proteïnes que contenen senyals d'exportació (NES) formen un complex amb els receptors d'exportació denominats exportines (EXP) i la RanGTP en el nucli. En el citoplasma, la hidròlisi de la GTP per Ran és facilitada per la unió a RanGAP (Ran GTPase-activating protein). Figura extreta de (Meier & Somers 2011).

Malgrat que hagin definit les seqüències consens dels senyals NLS canònics, existeix un gran nombre de NLSs identificades experimentalment que no coincideixen amb les seqüències consens. De forma similar, hi ha igualment un gran nombre de seqüències NLS no funcionals que coincideixen amb les seqüències consens (Kosugi et al. 2009). Per tal d'entendre els mecanismes moleculars responsables d'aquestes observacions, Kosugi i col·laboradors van analitzar la capacitat de unió a importines de seqüències a l'atzar contingudes en una llibreria de pèptids, i que va resultar en la identificació de sis classes diferents de NLSs que s'uneixen de forma diferent a la importina α (**Taula 3**). Mentre que els NLSs de la classe 1 i 2 s'uneixen al solc major, les classes 3 i 4 (s'uneixen específicament al solc menor de la importina α), el que explica les diferències de seqüència observades. D'altra banda trobem la classe 5 que és específica de plantes, ja només interacciona de manera eficient amb la importina α d'arròs, i de la que no s'ha determinat el solc de la importina α amb el que interacciona forma preferent. Finalment trobem la classe 6 que inclou els senyals bipartits i que interaccionen de forma simultània amb al solc major i menor de la importina α .

| Classe de NLS | Seqüència consens |
|----------------------|----------------------|
| Classe 1 | KR(K/R)R, K(K/R)RK |
| Classe 2 | (P/R)XXKR(^DE)(K/R) |
| Classe 3 | KRX(W/F/Y)XXAF |
| Classe 4 | (P/R)XXKR(K/R)(^DE) |
| Classe 5 | LGKR(K/R)(W/F/Y) |
| Classe 6 (Bipartits) | KRX10–12K(KR)(KR)* |
| | KRX10–12K(KR)X(K/R)* |

Taula 3. Seqüències consens de sis classes de NLSs dependents de importina α . La representació de les seqüències és la següent: (^DE) representa qualsevol aminoàcid excepte Asp o Glu; X10–12, qualsevol grup de 10–12 aminoàcids. (*) En la regió connectora (linker) constituïda per 10-12 aminoàcids, els residus àcids haurien d'estar enriquits en la regió central, i la regió final hauria d'enriquir-se en residus de prolina, actuant com activadors del reconeixement de la importina α . Els residus hidrofòbics haurien de ser rars en la regió central ja que actuen com a repressors de la interacció. Taula extreta de (Kosugi et al. 2009).

2.1. El octapèptid processat de l'extrem C-terminal del domini SAE2^{UFDCt} constitueix un senyal de localització nuclear no canònic.

En estudis anteriors desenvolupats en el nostre laboratori van descriure que el AtSAE2 localitza preferentment en el nucli i que aquesta localització era facilitada pel domini C-terminal que conté un senyal de localització nuclear (NLS) consens que es va identificar bioinformàticament (Castaño-Miquel et al. 2013). Aquest NLS amb seqüència **KKRR** pertany al grup dels senyals monopartits i més concretament a la classe I (Kosugi et al. 2009).

Tot i que els estudis bioinformàtics anteriorment mencionats (Castaño-Miquel et al. 2013) no van identificar cap altra senyal de localització nuclear consens en l'extrem C-terminal del SAE2, durant la caracterització molecular del processament del SAE2 es va trobar que la seqüència aminoacídica processada (**SKKKIRVE**) es troba enriquida en aminoàcids bàsics, la qual cosa suggereix que podria tindre una funció de senyal de localització nuclear (NLS), tot i ser una seqüència no canònica.

Com ja s'ha mencionat, una seqüència consens que correspon a un NLS bipartit es caracteritza per la presència de dos agrupacions d'aminoàcids bàsics separades per una regió connectora de 10-12 aminoàcids, la qual cosa permet que les dues regions bàsiques s'uneixen al solc gran i petit de la importina α (Conti et al. 1998; Kosugi et al.

2009). Tanmateix i més concretament a la cua del domini SAE2^{Ct} d'Arabidopsis, trobem 32 aminoàcids en la regió connectora entre la NLS ja identificada i els 8 aminoàcids processats, la qual cosa suggereix que es tractaria de dues senyals de localització independents: una senyal de localització clàssica o canònica i una no-canònica, que denominarem NLS1 i NLS2 respectivament.

Per tal d'avaluar la funció dels vuit aminoàcids processats (NLS2) i els seu possible paper en la localització de l'E1 es van clonar les seqüències que codifiquen pel pèptids NLS1 i NLS2, i els dominis de SAE2 C-terminal, UFD i UFD^{Ct}, de manera individual, al vector pWEN25. D'aquesta manera es va obtenir les regions aminoacídiques indicades fusionades a l'extrem C-terminal de la proteïna fluorescent EYFP (**Figura 12**).

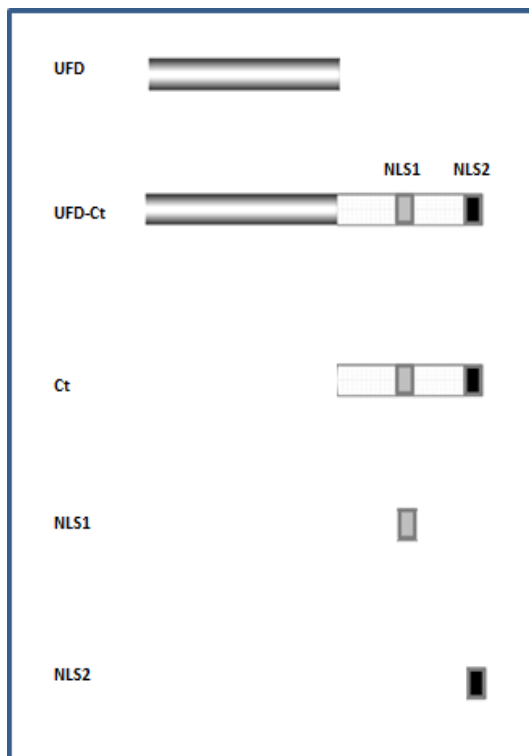


Figura 12. Representació dels diferents determinants funcionals del domini UFD^{Ct} fusionats a la eYFP. Esquema de les construccions emprades per a la realització de la transformació transitòria. En gris i blanc, es representa el domini SAE2^{UFD} i SAE2^{Ct} respectivament. Els rectangle gris representa la senyal de localització nuclear (NLS1) i en negre la (NLS2), que correspon al pèptid que es processa postraduccionalment. Els dominis UFD, UFD^{Ct}; Ct; i les senyals de localització nuclear NLS1 (PASKKRR) i la NLS2 (SKKKIRVE) van ser fusionades a la eYFP mitjançant el vector pWEN25.

A continuació, es va analitzar la localització subcel·lular de les diferents construccions mitjançant l'expressió transitòria en cèl·lules epidèrmiques de ceba. Com a control es va fer servir el vector buit pWEN25 que codifica únicament per la eYFP. Posteriorment, les cèl·lules epidèrmiques van ser observades i analitzades mitjançant microscòpia confocal i es va quantificar la localització citosòlica mitjançant un mètode desenvolupat prèviament durant el desenvolupament d'aquesta tesi (Mas et al. 2016) (**Annex 1**). Amb aquest mètode (**Figura 13**), es quantifiquen la fluorescència present a nucli i citosol, es calcula la intensitat integrada en ambdós compartiments i amb les dades resultants es calcula la proporció de fluorescència en el citosol (CFR-cytosol fluorescence ratio).

$$ID_{nucleus} = ROI1 \text{ area} \times (ROI1 \text{ mean intensity} - ROI3 \text{ background intensity})$$

$$ID_{cytosol} = ROI2 \text{ area} \times (ROI2 \text{ mean intensity} - ROI3 \text{ background intensity})$$

$$\text{Cytosol Fluorescence Ratio} = \frac{ID_{cytosol}}{ID_{nucleus} + ID_{cytosol}}$$

Figura 13. Càlculs de la intensitat integrada (ID) i la proporció de fluorescència en el citosol (CFR, Cytosol fluorescence ratio).

La **Figura 14** mostra el patró de localització trobat per a cadascuna de les construccions analitzades en cada cas. Com era d'esperar, la proteïna EYFP, utilitzada com a control de localització inespecífica, mostrava una distribució citosòlica i nuclear (CFR=0,92). A les cèl·lules transformades amb EYFP::UFDcT es va observar emissió de fluorescència únicament al nucli de la cèl·lula (CFR=0,02), mentre que les cèl·lules transformades amb EYFP::UFD mostraren una localització citosòlica i nuclear (CFR=0,93), equivalent a la observada per a la proteïna EYFP (**Figura 14B**). Aquests resultats indiquen que el domini SAE2^{Ct} és el principal responsable de la localització nuclear de la construcció eYFP::UFDcT i que el domini UFD no conté cap senyal de regulació subcel·lular.

Quan es va analitzar la construcció eYFP::Ct, com era d'esperar es va observar una localització principalment nuclear tot i que, sorprenentment, es podia observar una lleugera emissió de fluorescència al citosol (CFR=0,13) (**Figura 14B**). El fet que la

localització nuclear del domini Ct no sigui tant eficient com la del domini UFDcT, suggereix que el domini UFD, possiblement mitjançant la seva interacció amb l'enzim E2 conjugador de SUMO (SCE1) o amb altres proteïnes desconegudes, ajudaria a assolir la localització completament nuclear mostrada per a la construcció eYFP::UFDcT

Respecte les cèl·lules transformades amb la construcció eYFP::NLS1, es va observar una reducció de fluorescència al citosol (CFR=0,54), com era d'esperar pel fet de tractar-se d'un senyal de localització nuclear canònic descrit prèviament (Castaño-Miquel et al. 2013). Tanmateix el senyal NLS1 no és suficient per conferir una localització nuclear tant eficient com el domini C-terminal (**figura 14**).

Quan es va analitzar la construcció d'interès eYFP::NLS2, es va trobar una localització enriquida significativament en el nucli (CFR=0,82) respecte al control EYFP. Per tant aquests resultats indiquen que el motiu identificat NLS2 constitueix un senyal funcional de localització nuclear no canònic. D'altra banda, si comparem la eficiència de localització a nucli de la eYFP::NLS2 amb la eYFP::NLS1, queda de manifest que la eYFP::NLS2 és significativament menys eficient, sent la capacitat de la NLS2 de reduir l'acumulació de la EYFP en el citosol 1,5 vegades menor que la de la NLS1 (**figura 14**).

En resum, els resultats obtinguts de l'anàlisi de la localització subcel·lular indiquen que tant la NLS1 com la NLS2, funcionen com a senyals de localització nuclear, tanmateix la NLS2 és menys eficient que la NLS1. Tot i ser més eficient en l'enriquiment nuclear de la EYFP, la NLS1 no és suficient per aconseguir una localització completament nuclear i necessita de la presència de la NLS2, com suggereix la localització del domini C-terminal, que conté ambdós senyals (**Figura 14**). La reducció de l'eficiència observada a la NLS2 respecte a la NLS1 pot ser deguda en primer lloc al fet de que es tracta d'una senyal no consens i per tant aquesta seqüència aminoacídica podria interaccionar amb la importina α amb menys eficiència o especificitat, o bé al fet que la construcció que es va realitzar va tenir en compte tan sols el 8 aminoàcids processats i no es va considerar afegir la seqüència aminoacídica localitzada a l'extrem N-terminal del lloc de processament. Aquesta seqüència contigua es troba enriquida en residus àcids i podria tindre una funció important com activadors del senyal nuclear, com així ha sigut descrit als estudis de les NLSs (Kosugi et al. 2009).

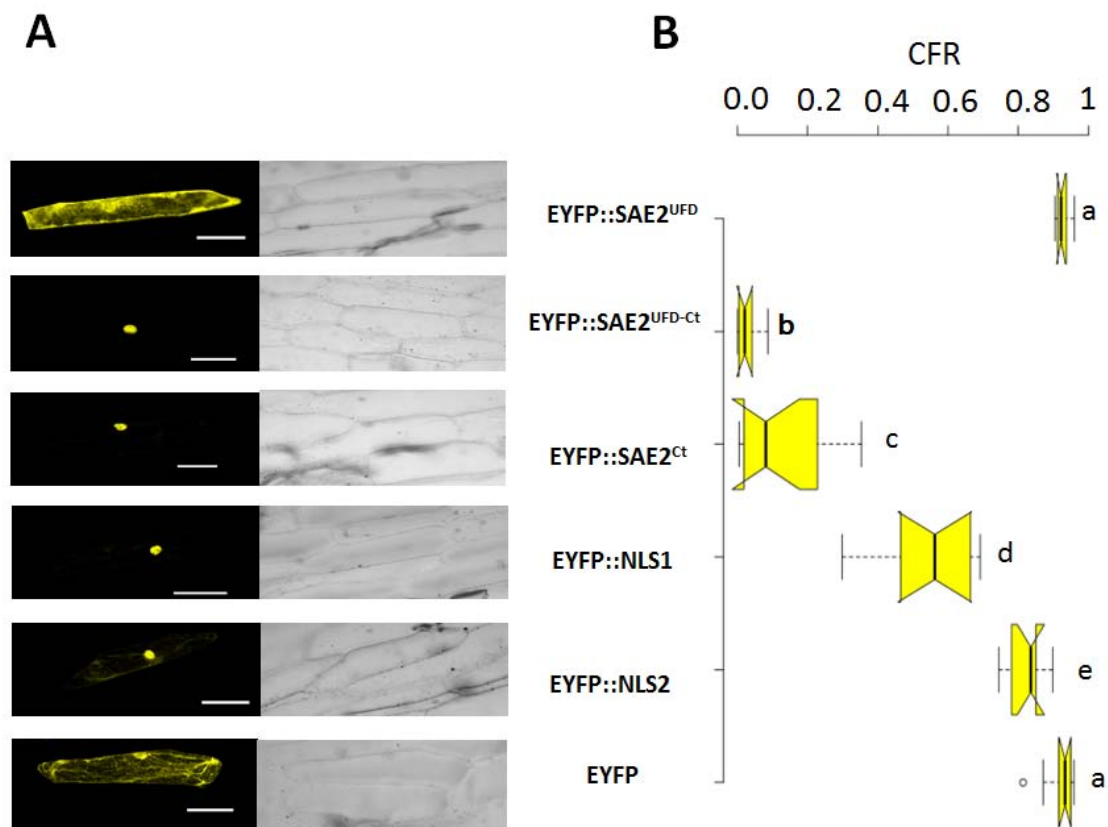


Figura 14. El octapèptid processat post-traduccionament al domini-C-terminal del SAE2 es comporta com un senyal de localització nuclear. A. Es van transformar transitòriament cèl·lules epidèrmiques de ceba amb el vector pWEN25 expressant les següents proteïnes de fusió: EYFP; EYFP::UFD; EYFP::SAE2^{UFD-Ct}; EYFP::SAE2^{Ct}; EYFP::NLS1 (PASKKRR) ; i la EYFP::NLS2 (SKKKIRVE) que correspon al pèptid processat al domini-C-terminal del SAE2. Les cèl·lules que expressaven la proteïna de fusió van ser analitzades mitjançant microscòpia làser confocal i es mostra la projecció màxima de la compilació d'imatges obtinguda de cèl·lules representatives. La fluorescència provinent de la eYFP es representa en color groc. La barra d'escala correspon a 100 μm . B. Es van quantificar els senyals de fluorescència del nucli i citosol, i es va calcular el CFR (Citosol Fluorescence Ratio) segons el mètode descrit previament (Mas et al. 2016). Les dades obtingudes es mostren en el diagrama de caixes. Les línies centrals mostren les medianes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3 - Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). Un total de 10 cèl·lules van ser analitzades per a cadascuna de les construccions avaluades. Els grups que no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$), s'indiquen amb la mateixa lletra al costat de les caixes.

2.2. Anàlisi de la interacció dels senyals de localització nuclear del SAE2 amb la importina α .

La importina α conté dos llocs d'unió als NLSs, el solc major i el solc menor. Les repeticions aminoacídiques tipus armadillo (Arm 2-4) en l'extrem N-terminal constitueixen el solc major, i les repeticions (Arm 7-9) de l'extrem C-terminal constitueixen el solc menor. Aquestes regions contenen els residus conservats de triptòfan i asparagina (Trp195, Asn199, Trp405, i Asn409) essencials per la funció del solc major i menor (**figura 16A**).

Per tal d'identificar les bases moleculars de les diferències funcionals dels senyals NLS1 i NLS2 observades *in vivo*, es va analitzar si el NLS1 i el NLS2 mostren diferències qualitatives i quantitatives en la seva interacció amb la importina α , així com diferències en l'especificitat d'interacció amb el solc major o menor. Amb aquesta finalitat, es va procedir a caracteritzar les interaccions dels senyals NLS1 i NLS2 amb la importina α de llevat mitjançant un assaig d'interacció *in vitro* descrit prèviament (Kosugi et al. 2008; Kosugi et al. 2009). Aquest assaig consisteix en una incubació de la importina α amb diferents senyals de localització fusionades a una proteïna fluorescent i l'anàlisi de la formació de complexos per electroforesi de proteïnes en condicions natives. Per realitzar l'assaig, es va produir proteïna recombinant del NLS1, el NLS2 i el domini SAE2^{Ct}, tots tres fusionats a l'extrem C-terminal de la eYFP (**Figura 15**). Paral·lelament es van purificar diferents variants de la importina α (Kap60p Δ IBB) de llevat fusionades a GST per afinitat amb columnes de glutatió, generades i descrites prèviament (Kosugi et al. 2008; Kosugi et al. 2009). Les variants estudiades eren la forma nativa, Kap60p Δ IBB (forma no mutada), i les formes mutades del solc major, Kap60p Δ IBB W195A/N199A (mut1, M1), i del solc menor, Kap60p Δ IBB 405A/N409A (mut2, M2), de reconeixement de NLS (**figura 15 i 16A**).

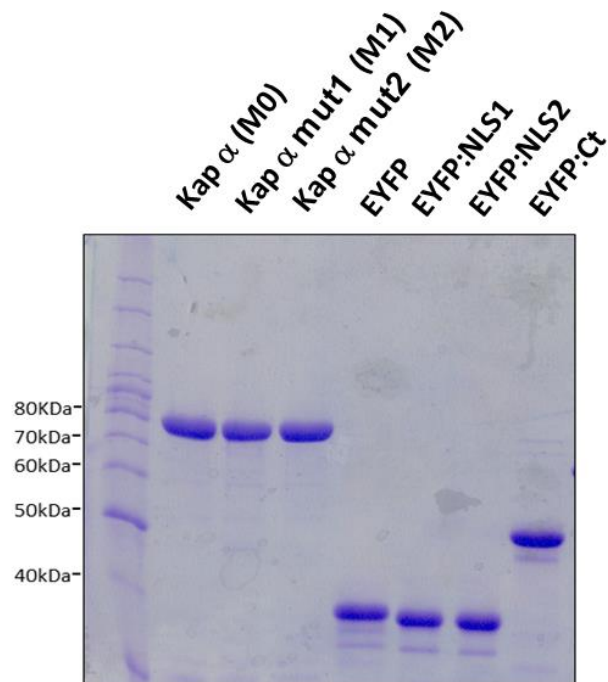


Figura 15. Expressió i purificació de les diferents proteïnes utilitzades en l'assaig d'interacció amb les diferents formes d'importina α . Components dels assajos d'interacció *in vitro* purificats. Tinció Coomassie de SDS-PAGE on es mostren els diferents proteïnes recombinants purificades, utilitzades als assajos d'interacció: la forma no mutada de la importina α (GST::Kap60p Δ IBB), la importina α mutada en el solc major, GST::Kap60p Δ IBB W195A/N199A (Kap α mut1), la importina α mutada en el solc menor GST::Kap60p Δ IBB 405A/N409A (Kap α mut2), com a control negatiu d'interacció la His::2xflag::eYFP, i les corresponents fusions dels pèptids corresponent al NLS1 i NLS2, i el domini SAE2^{Ct} (His::2xflag::EYFP::NLS1, His::2xflag::EYFP::NLS2, His::2xflag::EYFP::Ct).

L'assaig d'interacció *in vitro* es va realitzar incubant les diferents formes recombinants de la eYFP fusionades al domini SAE2^{Ct}, el NLS1 i NLS2 a una concentració constant de 1 μ M, amb concentracions creixents de les diferents variants de la importina α durant 60 minuts a temperatura ambient. Com a control negatiu es va incubar la eYFP amb la màxima concentració d'importina α emprada a l'assaig d'interacció (4 μ M) (**figura 16 B**). Un cop finalitzades les incubacions, es va analitzar la formació dels complexos en un gel de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants mitjançant electroforesis i a baixa temperatura (4^oC) per tal de no trencar les interaccions proteïna-proteïna que s'hagin establert. A continuació es va analitzar la fluorescència emesa per les diferents proteïnes de fusi a EYFP mitjançant una càmera CCD de captació de

fluorescència (LAS-4000) utilitzant el filtre específic per a GFP.

En primer lloc, quan es van analitzar el resultat de les incubacions de la eYFP fusionada al NLS1 i el NLS2 (**figura 16 B**), es va observar que totes dues interaccionen principalment amb el solc major (Kap α mut 2) i de forma residual amb el solc menor (Kap α mut 1). Els resultats obtinguts per a la NLS1 pel que fa a la seva preferència pel solc major era d'esperar si tenim en compte que constitueix una senyal de localització nuclear canònica de classe 1. Tanmateix la NLS2, tot i ser una senyal de localització no canònica, va mostrar el mateix comportament d'interacció amb la importina α que la NLS1 (**figura 16B**). Amb aquest d'assaig, tampoc es van observar diferències significatives des d'un punt de vista quantitatiu en la interacció entre les senyals de localització i la importina α .

Pel que fa a la interacció del domini SAE2^{Ct} amb la importina α , aquest domini també va interaccionar més eficientment amb el solc major de la importina (Kap α mut2) que amb el solc menor (Kap α mut1 i la forma no mutada) (**figura 16B**), la qual cosa suggereix que el domini C-terminal no presenta cap altre determinant molecular que faciliti la seva interacció amb el solc menor de la importina α .

En resum, tant la NLS1 com la NLS2 constitueixen dos senyals de localització nuclear funcionals i independents que interaccionen principalment amb el solc major de la importina α , no observant-se diferències significatives quantitatives ni qualitatives en l'especificitat d'aquesta interacció. D'altra banda, el fet que el domini SAE2^{Ct} interaccioni preferentment amb el solc major suggereix que la NLS1 i el NLS2 funcionen com dos NLSs independents i no formarien un senyal bipartit.

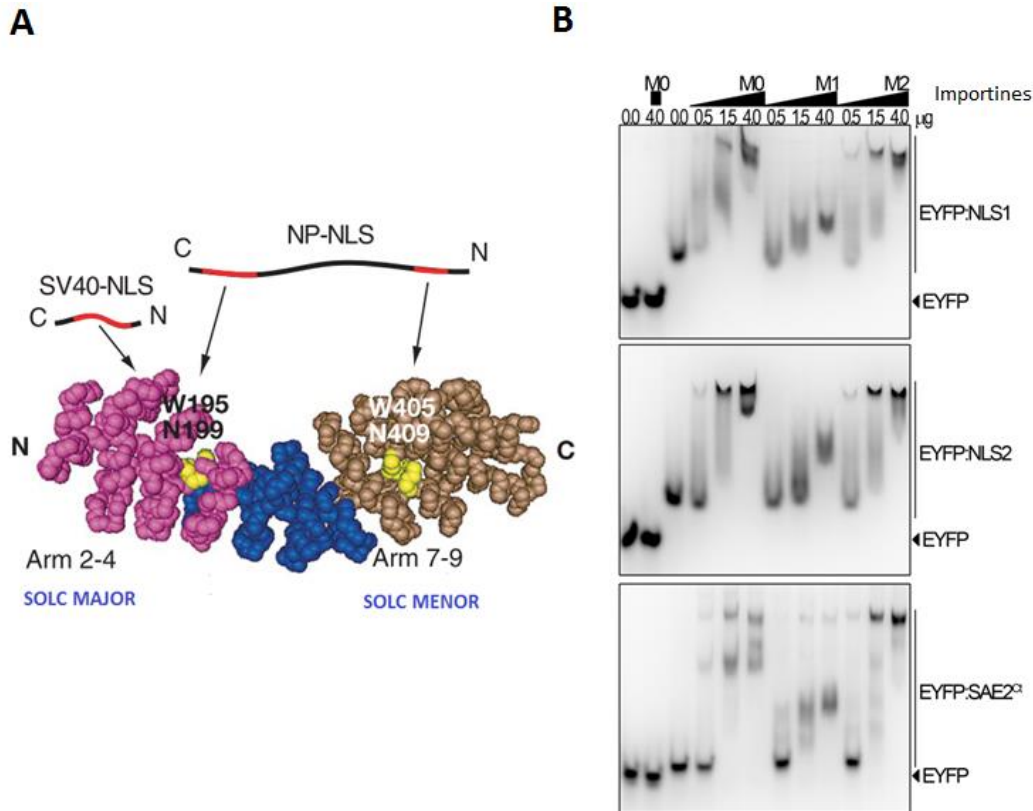


Figura 16. El NLS1 i el NLS2 interaccionen amb amb el solc major de la importina α .

(A) Representació de l'estructura de la importina α indicant la localització del solc major i menor d'interacció amb els NLSs. La NLS del virus SV40, una seqüència monopartida típica de la Classe 1 s'uneix al solc major de la importina α (Kap60p), mentre que la NLS de la nucleoplasmina, una seqüència típica bipartida s'uneix tant al solc major com el menor de la Kap60p localitzats a l'extrem N-terminal i C-terminal de la importina α , respectivament. Les agrupacions aminoacídiques bàsiques de les NLS estan representades en vermell. Les repeticions tipus armadillo (Arm 2-4) en l'extrem N-terminal constitueixen el solc major i està representat en violeta, i les repeticions (Arm 7-9) de l'extrem C-terminal constitueixen el solc menor i està representat en marró. Les regions que contenen residus conservats de triptòfan i asparagina (Trp195, Asn199, Trp405, i Asn409) essencials per la funció del solc major i menor estan marcats en groc. Figura modificada de (Kosugi et al. 2009). (B,C,D) Les proteïnes recombinants His::2xflag::EYFP::SAE2^{ct} (B) His::2xflag::eYFP::NLS1(C) His::2xflag::eYFP::NLS2 es van incubar amb les diferents variants de la importina α (Kap60pIBB) fusionades a GST en concentracions creixents i les mescleres es van analitzar en un gel de poliàcrilamida mitjançant electroforesi en condicions no desnaturalitzants. La fluorescència emesa per la EYFP lliure i fusionada es va analitzar amb l'equip LAS4000 (Fujifilm Life Science Product). Com a control, es va incubar la His::2xflag::EYFP amb la forma no mutada de la importina α (Kap60pIBB, M0). La Kap60pIBB W195A/N199A(M1) i la Kap60pIBB 405A/N409A (M2) són els mutants del solc major i menor respectivament.

2.3. La localització subcel·lular del SAE2 depèn dels NLS1 i NLS2.

Per tal d'avaluar la contribució del NLS1 i el NLS2 en el context de l'enzim heterodimèric SAE2 (E1), es van generar proteïnes de fusió entre diferents variants de SAE2 i l'extrem C-terminal de la eYFP (**Figura 17**).

Aquestes variants inclouen la forma nadiua del SAE2 denominada FULL (SAE2 Met1-Glu625) que, consegüentment, presenta ambdós senyals NLS1 i el NLS2 a l'extrem C-terminal, i la forma processada del SAE2 denominada $\Delta 2$, que es va generar per deleció del NLS2 i amb la que es pretenia avaluar la contribució del senyal NLS2 a la localització nuclear del SAE2 (**Figura 17**).

D'altra banda, i per tal d'avaluar si el senyal de localització NLS2 és suficient per localitzar el SAE2 al nucli de la cèl·lula, es va crear una variant que presenta la deleció de la seqüència corresponent al NLS1 i de la regió que uneix el NLS1 amb la NLS2 (*linker*) i que es va denominar $\Delta 1,L$ (SAE2 $\Delta S575-V617$). Per abordar aquesta qüestió, es va fer servir una segona estratègia complementària que consistia en generar la variant de SAE2 que presenta mutades les lisines que constitueixen el nucli del NLS1 i que es va anomenar X1 (SAE2 K582TK583G). Aquesta construcció seria funcionalment similar a la construcció $\Delta 1,L$ (**Figura 17**).

A més, per tal d'avaluar si la regió que uneix el NLS1 i el NLS 2 (*linker*) juga un paper en la localització del SAE2, es va generar una variant de SAE2 que presenta la deleció dels 32 aminoàcids que uneixen el NLS1 i el NLS2 i que es va anomenar Δ,L (SAE2 $\Delta S587-V617$) (**Figura 17**).

Finalment, es van generar variants de SAE2 que tinguessin afectades els dos senyals de localització nuclear ja sigui per deleció o per mutacions puntuals. Així, la construcció anomenada $\Delta 1,2L$ (SAE2 $\Delta S575-625$) presenta deleccions del NLS1, la regió connectora (*linker*) i el NLS2. De forma similar, la construcció anomenada X1, $\Delta 2$ (SAE2 K582TK583G $\Delta NLS2$) presenta mutades les lisines del NLS1 i la deleció del NLS2 (**Figura 17**).



Figura 17. Representació de les variants del SAE2 fusionades a la eYFP. Es representa esquemàticament les diferents construccions del SAE2 generades que van ser fusionades a la eYFP mitjançant el vector pWEN25. La NLS1 i la NLS2 es mostren en color negre i blanc respectivament. El domini SAE2^{ct} es representa en gris. La resta de la seqüència amionacídica del SAE2 es representa amb la barra fosca. Els rectangles amb una creu fan referència a mutacions puntals de la NLS1. Les diferents construccions es van fusionar a la EYFP; EYFP::SAE2 (**Full**), EYFP::SAE2 ΔNLS2 (**Δ2**), EYFP::SAE2 ΔS575-V617 (**Δ1,L**), EYFP::SAE2 K582T K583G (**X1**), EYFP::SAE2 ΔS587-V617 (**ΔL**), EYFP::SAE2 ΔS575-E625 (**Δ1,2,L**) i EYFP::SAE2 K582T K583G ΔNLS2 (**X1,Δ2**).

A continuació i per tal d'estudiar la localització de les diferents variants del SAE2 fusionades a la eYFP, es van co-transformar cèl·lules epidèrmiques de ceba amb les construccions anteriorment descrites i la ECFP:SAE1b per tal de reconstituir l'enzim heterodimèric (**Figura 18A**). De manera equivalent a com s'ha descrit prèviament es va quantificar la fluorescència procedent del nucli i citosol i es va calcular la proporció de fluorescència la citosol (CFR). Els resultats obtinguts mostraren que la versió nativa del SAE2 (FULL) localitzava exclusivament al nucli (CFR=0,00) (**Figura 18B**). La qual cosa és consistent amb el anterior resultat que mostraven que el domini SAE2^{UFDct} localitzava exclusivament al nucli (**Figura 14**).

D'altra banda quan es va analitzar la forma processada del SAE2 ($\Delta 2$), tot i localitzar principalment en el nucli, es va detectar de forma significativa emissió de fluorescència a la regió citosòlica de la cèl·lula (CFR=0,02). Aquest resultat indicarien que el processament del SAE2 permetria un enriquiment de 3,8 vegades de l'enzim activador de SUMO en el citosol, comparat amb la forma no processada (**Figura 18B**).

Quan es va analitzar la localització subcel·lular de les formes del SAE2 ($\Delta 1,L$) i SAE2 (X1) es va observar fluorescència al nucli i citosol (**Figura 18A,B**). En aquests casos, l'enriquiment de fluorescència en el citosol (CFR=0,56 i CFR=0,52, respectivament) va ser significativament major si es compara amb la localització observada de la forma SAE2 ($\Delta 2$).

Per avaluar la contribució de la regió connectora (*linker*) entre la NLS1 i la NLS2 a la funció d'aquestes senyals de localització nuclear, es va analitzar la distribució de la variant de SAE2 que presenta una deleció d'aquesta regió, SAE2 (ΔL), i es va observar que l'emissió de fluorescència al citosol era pràcticament inexistent (CFR=0,00) (**Figura 18**). Aquest resultat suggereix que, en aquestes condicions experimentals, la regió connectora (*linker*) no sembla influir en la funció dels NLS1 i NLS2, i que la distancia que els separa no es determinant pel seu funcionament. Aquests resultats serien consistents amb els resultats d'interacció obtinguts *in vitro* entre el domini SAE2^{Ct} i la l'importina α (**Figura 16**).

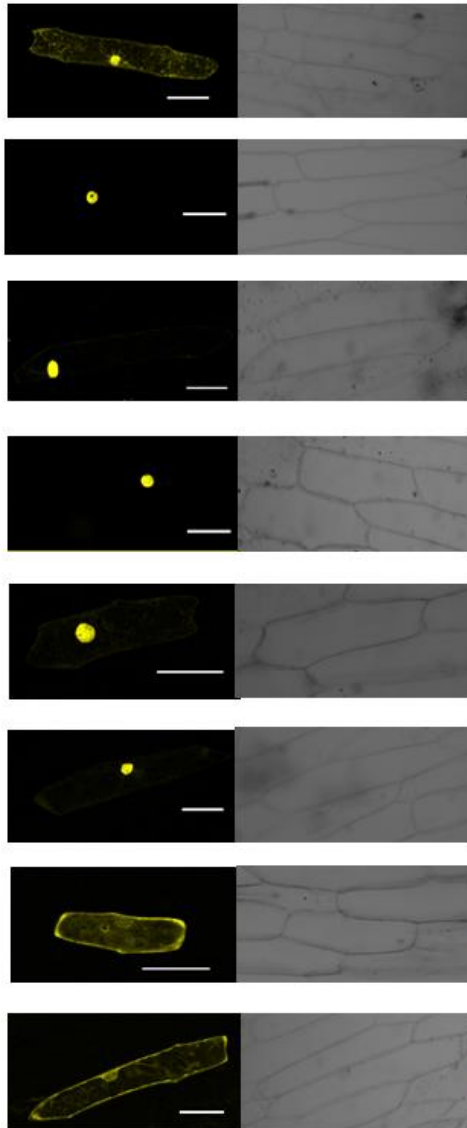
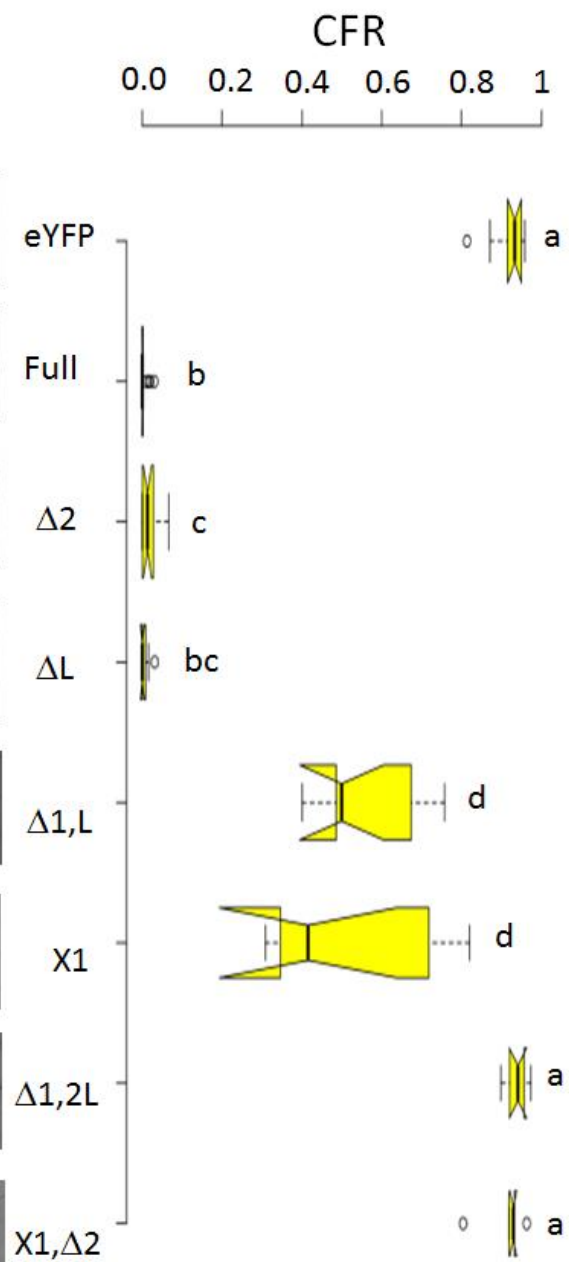
L'abolició d'ambdós senyals, independentment de l'estratègia experimental emprada (SAE2 ($\Delta 1,2,L$) i SAE2 (X1, $\Delta 2$)), resulta en una distribució cel·lular equivalent

al control, EYFP, amb unes CFR de 0,94 i 0,91, respectivament (**Figura 18**).

Aquests resultats suggereixen que la NLS2 és necessària per facilitar la completa localització nuclear de l'enzim SAE2. Tanmateix, el fet que s'observi una major localització de les variants de SAE2 que no presenten el senyal NLS1, SAE2 (Δ 1,L) i SAE2 (X1), indica que la contribució de la NLS1 a la localització nuclear de l'E1 és quantitativament més rellevant i eficient respecte a la de la NLS2.

En resum, la localització citosòlica observada a les variants de SAE2 estudiades suggereix que el NLS1 i el NLS2 constitueixen els principals determinants de la localització nuclear del SAE2 i que ambdós senyals són necessaris per a la localització exclusivament nuclear de l'E1.

Figura 18. Localització subcel·lular de les diferents variants del SAE2 generades. Anàlisi de l'expressió transitoria en cèl·lules epidèrmiques de ceba on es va co-expressar les diferents variants eYFP::SAE2 amb la eCFP::SAE1b.. Les diferents construccions que van fer servir foren: la proteïna nativa, Full (eYFP::SAE2); la variant amb deleció del senyal NLS2, Δ 2 (eYFP::SAE2 Δ NLS2); les variants amb alteracions en el senyal NLS1, Δ 1,L (eYFP::SAE2 Δ S575-V617) i X1 (eYFP::SAE2 K582T K583G); la variant amb una deleció de la regió connectora d'ambdós senyals Δ L (eYFP::SAE2 Δ S587-V617); i les variants deficientes en ambdós senyals NLS1 i NLS2, Δ 1,2,L (eYFP::SAE2 Δ S575-E625) i X1, Δ 2 (eYFP::SAE2 K582T K583G Δ NLS2). La fluorescència emesa per les cèl·lules que expressaven les diferents variants van ser analitzades mitjançant microscòpia confocal, quantificada i la proporció de fluorescència detectada al citosol calculada (CFR, Citosol Fluorescence Ratio). Es representa la projecció màxima de la compilació d'imatges obtinguda a cada cèl·lula. La fluorescència detectada es representa en color groc. L'escala correspon a 100 μ m. **B.** Els resultats obtinguts del càlcul de la CFR segons el mètode prèviament descrit (Mas et al. 2016) es mostren representats en un diagrama de caixes. Les línies centrals mostren les medianes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). Un total de 10 cèl·lules van ser analitzades per a cadascuna de les construccions avaluades. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

A**B**

2.4. Anàlisi de conservació del domini SAE2^{Ct}

Per tal d'identificar els determinants funcionals presents en del domini SAE2^{Ct} i el seu grau de conservació, es van cercar homòlegs del SAE2 d'Arabidopsis a la base de dades Phytozome v.11 i es van seleccionar un total de 54 seqüències per analitzar. A partir d'un alineament inicial de seqüències completes, es van determinar els límits del domini SAE2^{Ct} i es va tornar a analitzar de manera independent de la resta de dominis. Les anàlisi d'homologia es van realitzar fent servir el mètode Clustal Omega incloent el domini corresponent del SAE2 humà com a referència externa.

A partir de l'anàlisi d'homologia del domini SAE2^{Ct} en el grup de les plantes dicotiledònies, entre les que s'inclou Arabidopsis thaliana, podem identificar 5 regions principals (**Figura 19**).

La regió I correspon a la seqüència consens GM(V/L)LSGW que correspon a la unió entre els dominis UFD i C-terminal. La regió II presenta una extensió variable (**Figura 19**) i una regió conservada amb un enriquiment en serines (**Figura 20A**). La regió III conté la primera regió bàsica, KKR(K/R), i correspondria al senyal de localització canònica (NLS1) descrit en Arabidopsis prèviament (Castaño-Miquel et al., 2013) i que correspon a una variant de senyal de localització nuclear de classe I, o de classe 2 si es considera el residu de prolina present a la regió N-terminal (Kosugi et al. 2009) (**Taula 3**). La regió IV és una regió relativament variable d'uns 50 aminoàcids (**Figura 20C**) on trobem una regió conservada de residus acídics/hidrofòbics (**Figura 20B**). Aquesta regió acídica/hidrofòbica de la regió IV presenta característiques de motiu d'unió no covalent a SUMO (SIM-SUMO interacting motif), que consisteix en un petit nucli hidrofòbic que normalment està precedit o seguit de residus acídics i/o fosforilats (Kerscher 2007), suggerint que durant el procés d'activació, l'enzim activador també podria interaccionar de forma no covalent amb SUMO. Finalment, la regió V constitueix la segona regió enriquida en residus bàsics que conté el motiu conservat KK(K/I/Q/R)(R/K) (**Figures 19 i 20**), corresponent a la regió que s'escindeix del domini SAE2^{Ct} com a resultat del processament identificat (**Figura 7**), i que els nostres resultats indiquen que té funcionalitat de senyal de localització nuclear no canònic (NLS2) (**Figures 14 i 16**). D'altra banda, la Valina 617, que és essencial per a què es doni el processament de SAE2 en Arabidopsis (**Figura 9**), està conservada entre les espècies del grup de les brassicàcies,

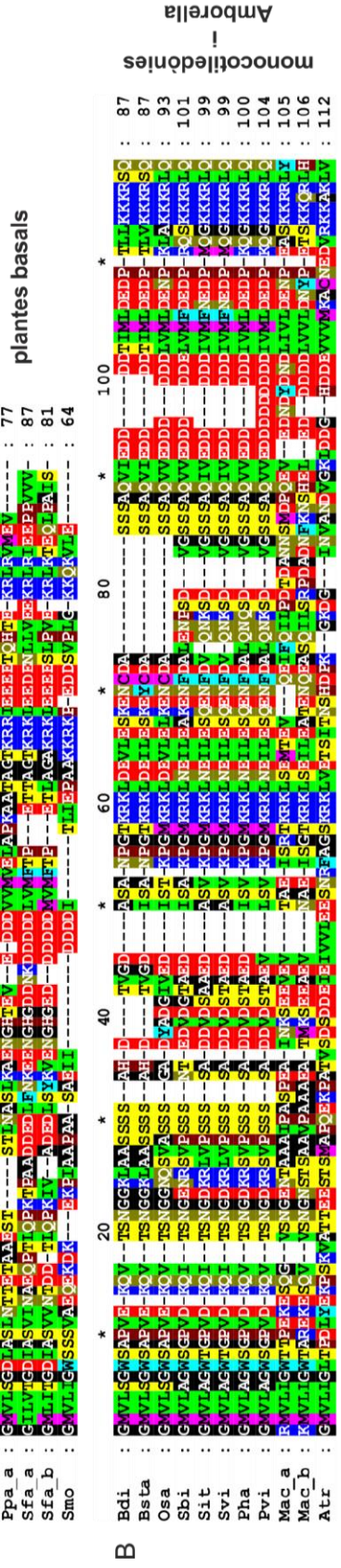
és a dir, entre les espècies vegetals evolutivament properes a *Arabidopsis*. Curiosament, aquesta Valina 617, tot i no estar conservada en espècies més distants, apareix a *Amborella trichopoda*, l'espècie més antiga del grup de les angiospermes (**Figura 19**).

Quan es va analitzar les seqüències del grup de les monocotiledònies, incloent a *Amborella*, es poden identificar les cinc regions descrites en dicotiledònies (**Figura 19**). La diferència més dramàtica correspon a la regió III que conté el senyal de localització NLS1. En aquest grup, el senyal NLS1 no es correspon amb una variant de NLS monopartit de classe 1, sinó que presenta característiques de NLS monopartit de classe 4 (Kosugi et al. 2009) (**Taula 3**). Tanmateix, en *Musa acuminata* i *Amborella trichopoda*, aquesta regió III no es correspon amb cap classe de senyal de localització nuclear descrita fins ara. Pel que fa a la regió IV en monocotiledònies, de forma similar a dicotiledònies, es troba una regió conservada de residus acídics/hidrofòbics que es podria correspondre amb domini d'interacció amb SUMO (SIM) (Kerscher 2007). Finalment, la regió V que conté la NLS2 d'*Arabidopsis*, tot i ser una regió enriquida en lisines i estar conservada (**Figura 20**), no es correspon amb cap senyal de localització nuclear consens, de manera semblant a la NLS2 d'*Arabidopsis*.

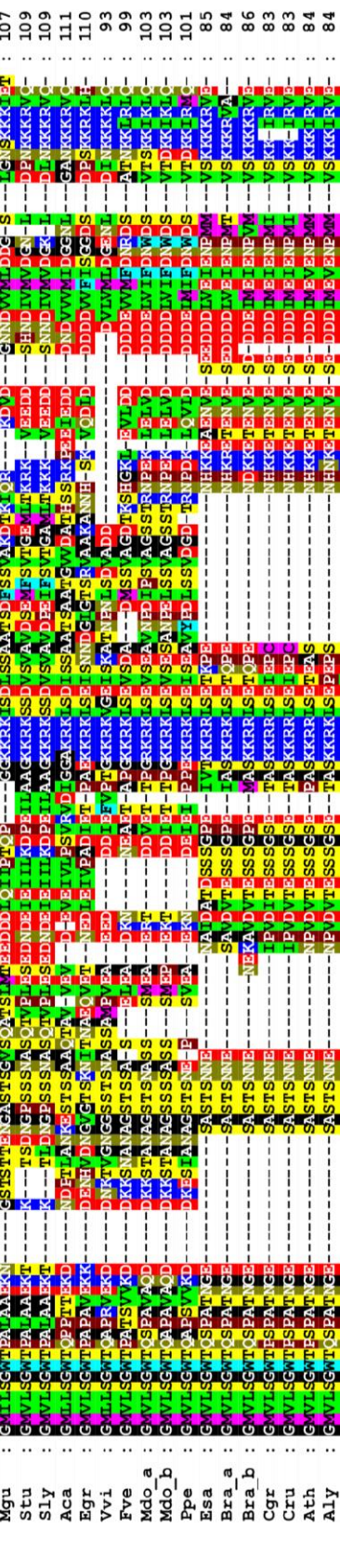
Les plantes basals, entre les quals trobem les moltes *Sellaginella* i *Sphagnum*, les quals s'inclouen entre els embriófits més antics, presenten grans diferències en l'organització del domini SAE2^{Ct}. Tot i que presenten dues regions bàsiques, regió III i regió V, la regió que les separa és significativament més curta (10 aminoàcids de mitja) (**Figura 20C**) que la present monocotiledònies i dicotiledònies, que varia entre 30 i 50 aminoàcids. No obstant, aquesta regió presenta un enriquiment en aminoàcids acídics, de manera equivalent a la regió IV dels ortòlegs de SAE2 analitzats. En aquest grup de plantes, l'organització de les regions III, IV i V correspon a la d'un senyal de localització bipartit típic (Kosugi et al., 2009) (**Taula 3**). Aquests resultats suggereixen que la transformació d'un senyal NLS bipartit en dos senyals monopartits, amb el conseqüent augment de complexitat, va suposar una avantatge evolutiva en la transició de plantes basals a plantes amb capacitat de formar llavors, les angiospermes.

Figura 19. Anàlisi filogenètic del domini SAE2^{Ct}. Alineament de les seqüències homologues del domini SAE2^{Ct} en plantes basals (A) i angiosperms (B,C). Els aminoàcids es troben acolorits en grups segons les seves propietats químiques. A sota de l'alineament de seqüències de dicotiledònies s'indica per caixes les diferents regions identificades. La regió I constitueix la unió entre el domini SAE2^{UFD} i SAE2^{Ct}, i està seguida de la regió II que està enriquida en serines i aminoàcids àcids. En totes les seqüències analitzades es van identificar dues regions enriquides en aminoàcids bàsics (regió III i V), que es corresponen amb els senyals de localització nuclear canònic (NLS1) i no canònic (NLS2), respectivament. Els últims 8 aminoàcids de la regió V (NLS2) constitueixen la regió processada del SAE2^{Ct}. Les regions bàsiques (III i V) estan separades per una regió àcida (regió IV).

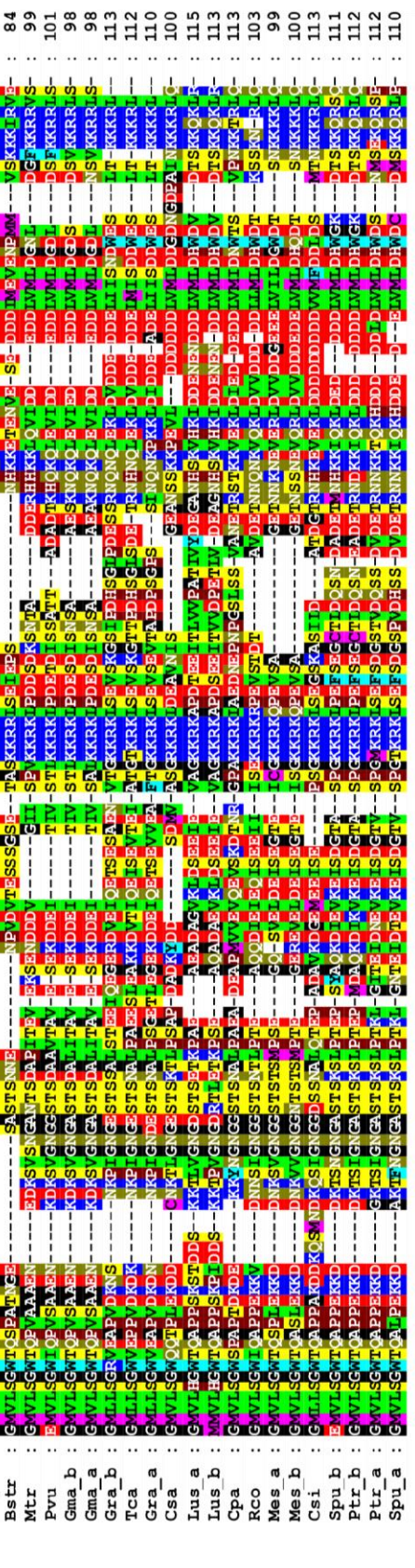
A Ppa_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Ppa_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Sfa_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Sfa_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Smc : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120



B Bai : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Beta : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Osa : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Sbi : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Sit : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Svi : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Pha : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Pvi : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mac_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mac_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Atr : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120



C Kna : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mgu : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Stu : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Sly : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Aca : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Egr : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Fve : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mdo_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mdo_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Ppe : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Esa : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Bra_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Bra_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Cgr : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Cru : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Ath : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Aly : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Bstr : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mtr : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Pvu : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Gna_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Gna_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Gra_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Tca : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Gca : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Csa : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Lus_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Lus_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Opa : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Rco : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mes_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Mes_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Csi : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Spu_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Pir_b : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Pur_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
Spu_a : GAVLIGDASINWTEAAAPT * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120



dicotyledonies

I

II

III

IV

V

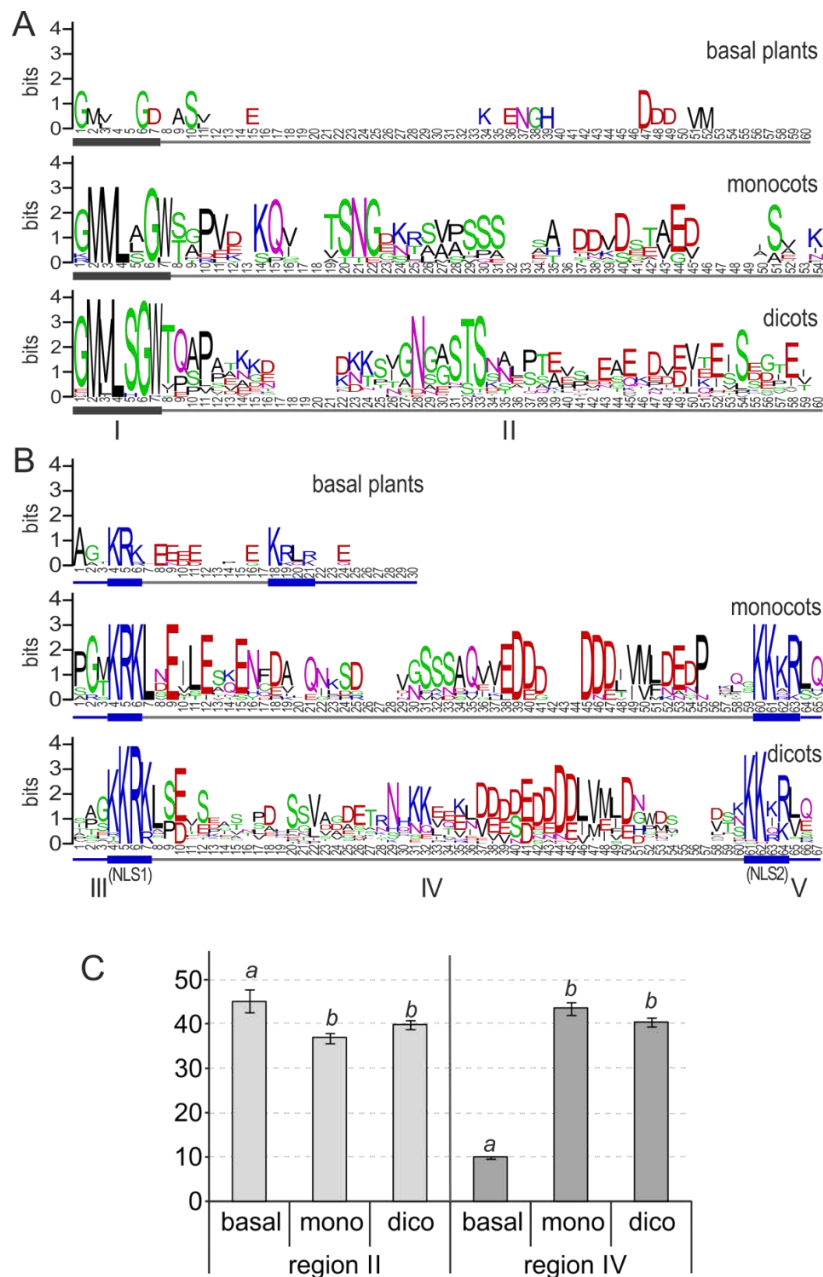


Figura 20. Anàlisi de conservació del domini SAE2^{ct}. Representació gràfica de la seqüència consens corresponent a les regions I i II (A) i de les regions III, IV, i V (B) determinada a partir de l'alineament de la seqüència d'aminoàcids mostrada en la figura 8. L'alçada total de la columna de símbols indica el grau de conservació de la seqüència en aquesta posició, mentre que l'altura del símbols dins de la columna indica la freqüència relativa de cada aminoàcid dins d'aquesta posició. La longitud de la seqüència es mostra en números a sota de la representació gràfica. Per sota de cada gràfica, es representen la regió I amb una caixa gris, les regions connectores II i IV amb una línia gris i les regions III i V, que corresponen al NLS1 i NLS2, respectivament, estan representades per caixes blaves. (C) La mitja i el error estàndard de la longitud presentada per les regions connectores II i IV estan representats en la gràfica de columnes. Les diferents lletres indiquen grups que mostren diferències significatives ($p < 0,02$). N=5,11,38 número de seqüències analitzades corresponent a plantes basals, monocotiledònies i dicotiledònies, respectivament.

3. Desenvolupament de eines moleculars per a l'estudi de la funció biològica del processament del SAE2.

Considerant els resultats obtinguts de la caracterització molecular del processament del SAE2 i les seves implicacions en la localització subcel·lular de l'enzim activador de SUMO (SAE2), vam formular una hipòtesi que planteja la localització citosòlica del enzim activador de SUMO E1, facilitada pel processament del senyal NLS2 en la subunitat SAE2, com un mecanisme per afavorir la conjugació citosòlica de SUMO en determinades condicions fisiològiques i ambientals. Per testar aquesta hipòtesi, es va procedir a la generació de plantes sobreexpressores de la forma nadiua i processada del SAE2, així com d'altres variants del SAE2 que presenten diferents graus d'alteració de la seva localització subcel·lular (**figura 21**), tal i com s'ha descrit prèviament (**Apartat 1.2, Figura 17**).

3.1. Generació de plantes sobreexpressores de diferents versions del SAE2

La forma nadiua del SAE2 (FULL), la seva forma processada ($\Delta 2$, amb la deleció del NLS2) i les variants que confereixen un major enriquiment citosòlic del SAE2, com són la $\Delta 1,L$ (amb delecions del NLS1 i la regió *linker* IV) i la $\Delta 1,2,L$ (amb delecions dels senyals NLS1 i NLS2, i la regió *linker* IV), prèviament fusionades a l'extrem C-terminal de la EYFP, es van clonar al vector binari pB2GW7 (Gateway), i es van generar diferents línies transgèniques sobreexpressores d'aquestes variants del SAE2 sota el promotor constitutiu 35S (**Figura 21A**). Paral·lelament, les formes FULL, $\Delta 2$, X1 (amb el NLS1 mutada) i X1 $\Delta 2$ (amb el NLS1 mutada i la deleció del NLS2), aquestes dues últimes equivalents funcionalment a les línies $\Delta 1,L$, i $\Delta 1,2,L$, respectivament, es van clonar en el vector binari pH7m24gw, en el que l'expressió del transgen està sota el promotor endogen del SAE2 (regió de 1500 pb a 5' del ATG del SAE2) 3 (**Figura 21B**). Finalment, es van seleccionar dues línies independents homozigòtiques per a cadascuna de les construccions generades per dur a terme la seva caracterització molecular.

A

| Nom | Vector | Promotor | Fluoròfor | Versió del SAE2 | NLSs | Resistència | Línies transgèniques |
|--------|--------|----------|-----------|-----------------|-----------|-------------|----------------------|
| Full | pB2GW7 | 35S | eYFP | | NLS1/NLS2 | ppt | Full8/Full10 |
| Δ2 | pB2GW7 | 35S | eYFP | | NLS1 | ppt | Δ2.5/Δ2.8 |
| Δ1,L | pB2GW7 | 35S | eYFP | | NLS2 | ppt | Δ1,L4/D1,54 |
| Δ1,2,L | pB2GW7 | 35S | eYFP | | - | ppt | Δ1,2,L8/Δ1,2,L10 |

B

| Nom | Vector | Promotor | Fluoròfor | Versió del SAE2 | NLSs | Resistència | Línies transgèniques |
|-------|------------|----------|-----------|-----------------|-----------|-------------|----------------------|
| Full | pH7m24gw,3 | pSAE2 | eYFP | | NLS1/NLS2 | Hyg | Full4/Full8 |
| Δ2 | pH7m24gw,3 | pSAE2 | eYFP | | NLS1 | Hyg | Δ2.1/Δ2.7 |
| X1 | pH7m24gw,3 | pSAE2 | eYFP | | NLS2 | Hyg | X1.2/X1.6 |
| X1,Δ2 | pH7m24gw,3 | pSAE2 | eYFP | | - | Hyg | X1,Δ2.2 /X1,Δ2.4 |

Figura 21. Línies transgèniques generades amb diferents versions del SAE2. A. Línies transgèniques independents amb diferents versions del SAE2 sota la regulació del promotor constituït p35S. **B** Línies transgèniques independents amb diferents versions del SAE2 sota la regulació del promotor endogen del SAE2. S'indica el vector binari de transformació emprat, el fluoròfor al que s'ha fusionat el SAE2, quins NLSs hi son presents en cada cas, la resistència a herbicides que confereix el vector per seleccionar les plantes transformades així com el nom i el número de línia independent per a cada construcció. En gris clar i fosc és representa el domini SAE2^{Ct} i la resta del SAE2 respectivament. Els rectangles de color blanc i negre fan referència al NLS1 i el NLS2 respectivament. El rectangle blanc amb una X representa el NLS1 mutat.

3.2. Caracterització de l'acumulació de les diferents formes del SAE2 en les línies transgèniques generades i els seus efectes en la conjugació de SUMO

Amb l'objectiu de caracteritzar les implicacions moleculars del processament del SAE2 així com l'efecte de la localització citosòlica del SAE2 en la conjugació de SUMO, en primer lloc es van analitzar els nivells d'acumulació dels components de la maquinària de SUMOilació així com l'acumulació de les diferents formes del SAE2 fusionades a la eYFP sota la regulació del promotor 35S (**Figura 21A**) o el promotor endogen pSAE2 (**Figura 21B**), en les plantes transgèniques generades anteriorment descrites.

Concretament, es van analitzar plàntules d'onze dies crescudes *in vitro* en medi MS0.5x, en plaques verticals en condicions de dia llarg. Com a control es va fer servir Col-0 i, com a control de plantes que tenen una conjugació de SUMO augmentada, es van fer servir plantes 35S::SUM1 generades i descrites prèviament (Lois et al. 2003).

Les diferents línies transgèniques p35S::eYFP::SAE2 generades a excepció de les dues línies independents $\Delta 1,2,L$ mostraren nivells similars en l'acumulació de la proteïna recombinant eYFP::SAE2 (**Figura 22**). Curiosament les dues línies $\Delta 1,2,L$ mostraren una acumulació menor en relació a la resta. Aquests resultats suggereixen que la deleció del domi SAE2^{Ct} en condicions d'expressió constitutiva podria afectar a l'estabilitat d'aquest enzim. En fulles, no es va observar que l'expressió de les formes recombinats de SAE2 tinguessin un efecte sobre l'acumulació de SAE2 endogen. En arrels, el resultat es similar amb l'excepció de les línies $\Delta 1,2,L$ que presenten un increment en els nivells de SAE2 endogen.

Quan es va analitzar l'acumulació de l'enzim conjugador SCE1 no es van observar diferències aparents entre les línies transgèniques analitzades. Tanmateix, les sobreexpressores de SUMO (35S::SUM1) mostraren una disminució significativa en l'acumulació de l'enzim conjugador (SCE1), la qual cosa indica que els nivells elevats de conjugació afecten els nivells de SCE1. De manera consistent amb aquesta observació, s'ha descrit que tant el mutant *siz1* com les plantes sobreexpressores del domini SAE2^{UFD^{Ct}} (**Figura 22**), presenten una conjugació basal de SUMO reduïda, mostren un nivells de SCE1 més elevats (Saracco et al. 2007; Castaño-Miquel et al. 2011).

Línies transgèniques p35S::eYFP::SAE2

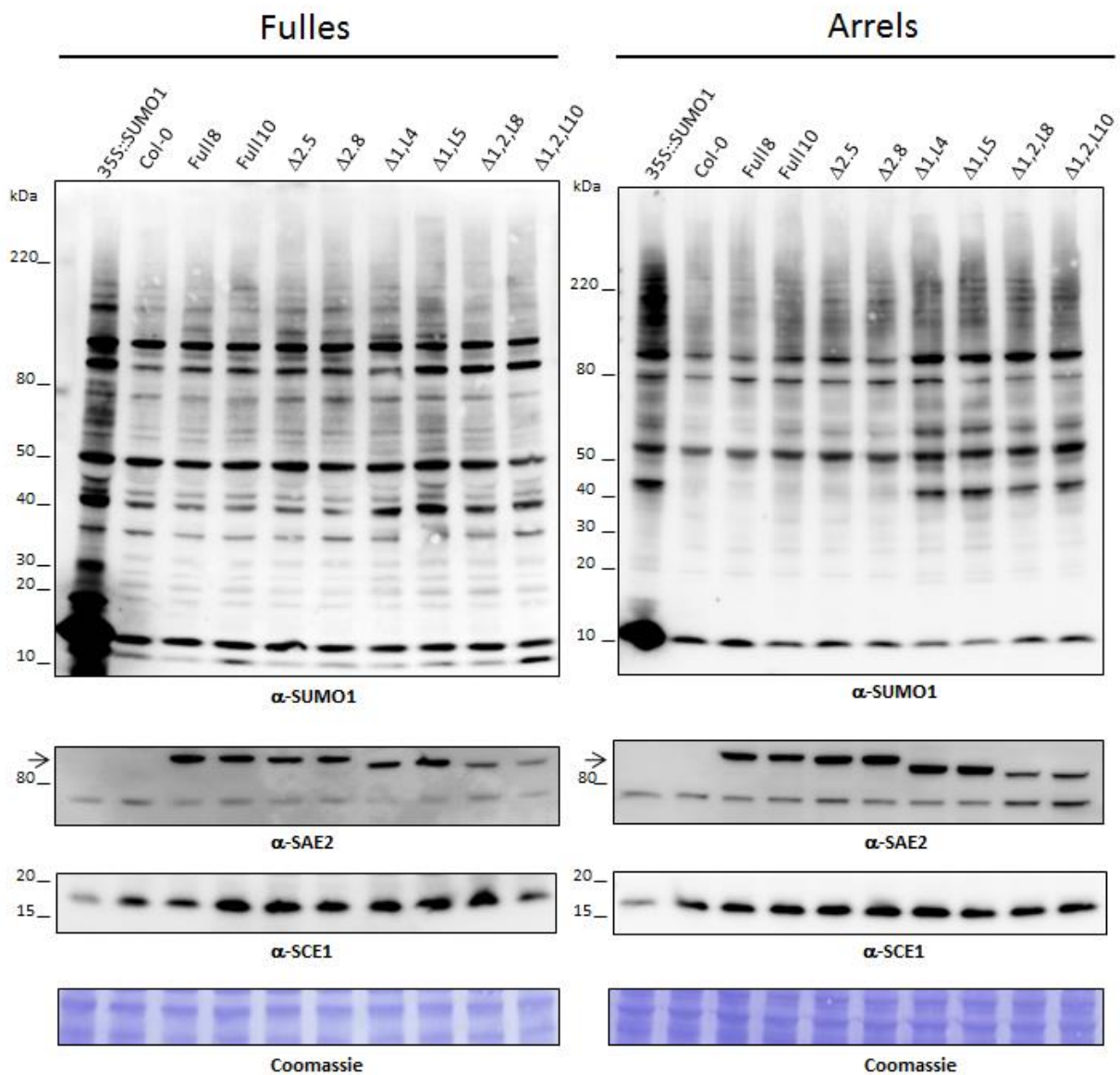


Figura 22. Anàlisi de la maquinària de sumoilació de les plantes sobre-expressores del SAE2 sota el promotor constitutiu p35S. A. Els extractes de proteïna de fulles de rosseta i arrels de plàntules d'onze dies crescudes *in vitro* en condicions de dia llarg, en plaques medi MS diluït dues vegades i sense sacarosa en posició vertical, es van resoldre en un gel SDS-PAGE. Els conjugats de SUMO, l'enzim activador (SAE2), la proteïna recombinant eYFP::SAE2 (la fletxa marca la seva posició), i l'enzim conjugador (SCE1) es van analitzar mitjançant wester-blot amb els anticossos corresponents. A la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, com a control de càrrega. Cada carril conté 18µg de proteïna.

Pel que fa als nivells de conjugats de SUMO observats en les línies 35S::EYFP::SAE2, tant en fulles de roseta com a les arrels, la conjugació basal va ser lleugerament més elevada en relació a Col-0 i menors respecte a les 35S::SUMO1. Tanmateix s'ha de tindre en compte a l'hora de comparar, que els nivells de sobreexpressió de SUMO assolit en les plantes 35S::SUM1 són molt més grans que el nivells d'acumulació del SAE2 en les plantes 35S::EYFP::SAE2 (**Figura 22**).

D'altra banda, i més concretament les línies $\Delta 1,L$ i $\Delta 1,2,L$, que expressen formes del SAE2 amb un major enriquiment citosòlic com a conseqüència de la deleció del senyal de localització nuclear canònic NLS1, mostraren diferències quantitatives i qualitatives en el patró de conjugació basal de SUMO en arrels. Aquest augment de la conjugació basal en relació a la resta de línies transgèniques, correlaciona negativament amb els nivells de SUMO lliure. Quan es va analitzar qualitativament el patró de conjugats, es va observar la diferents bandes (44kDa, 50 kDa, 53 kDa, 60 kDa i 100 kDa aproximadament) amb una intensitat molt més elevada. Aquests resultats suggereixen que quan s'augmenta una localització citosòlica del SAE2, com ocorre a les línies $\Delta 1,L$ i $\Delta 1,2,L$, s'afavoreix significativament de manera quantitativa i qualitativa la conjugació de certs substrats. Tanmateix, quan es comparen les línies sobreexpressores de les formes FULL i $\Delta 2$, on les línies $\Delta 2$ sobreexpressen la forma fisiològica processada, no es van observar diferències entre elles, indicant els efectes de la forma $\Delta 2$ sobre la conjugació citosòlica de SUMO està per sota del llindar de detecció amb l'aproximació emprada (**Figura 22**).

Pel que fa a l'anàlisi de les línies transgèniques pSAE2::EYFP::SAE2 (**figura 23**), les fulles i les arrels mostraren una acumulació de l'EYFP::SAE2 recombinant variable, però amb nivells aproximats al SAE2 endogen. Pel que fa a l'acumulació de l'enzim conjugador (SCE1), no es van observar diferències significatives entre les diferents línies respecte a Col0. Novament, quan es van analitzar els nivells de conjugats de SUMO presents a les diferents línies transgèniques, es va observar diferències quantitatives i qualitatives en les línies X1 i X1 $\Delta 2$, similars a la observades en les línies 35S ($\Delta 1,L$ i $\Delta 1,2,L$) que són equivalents pel que fa a l'afectació de la localització subcel·lular de la forma del SAE2 que expressen (**Figures 17, 18 i 21**).

Línies transgèniques pSAE2::eYFP::SAE2

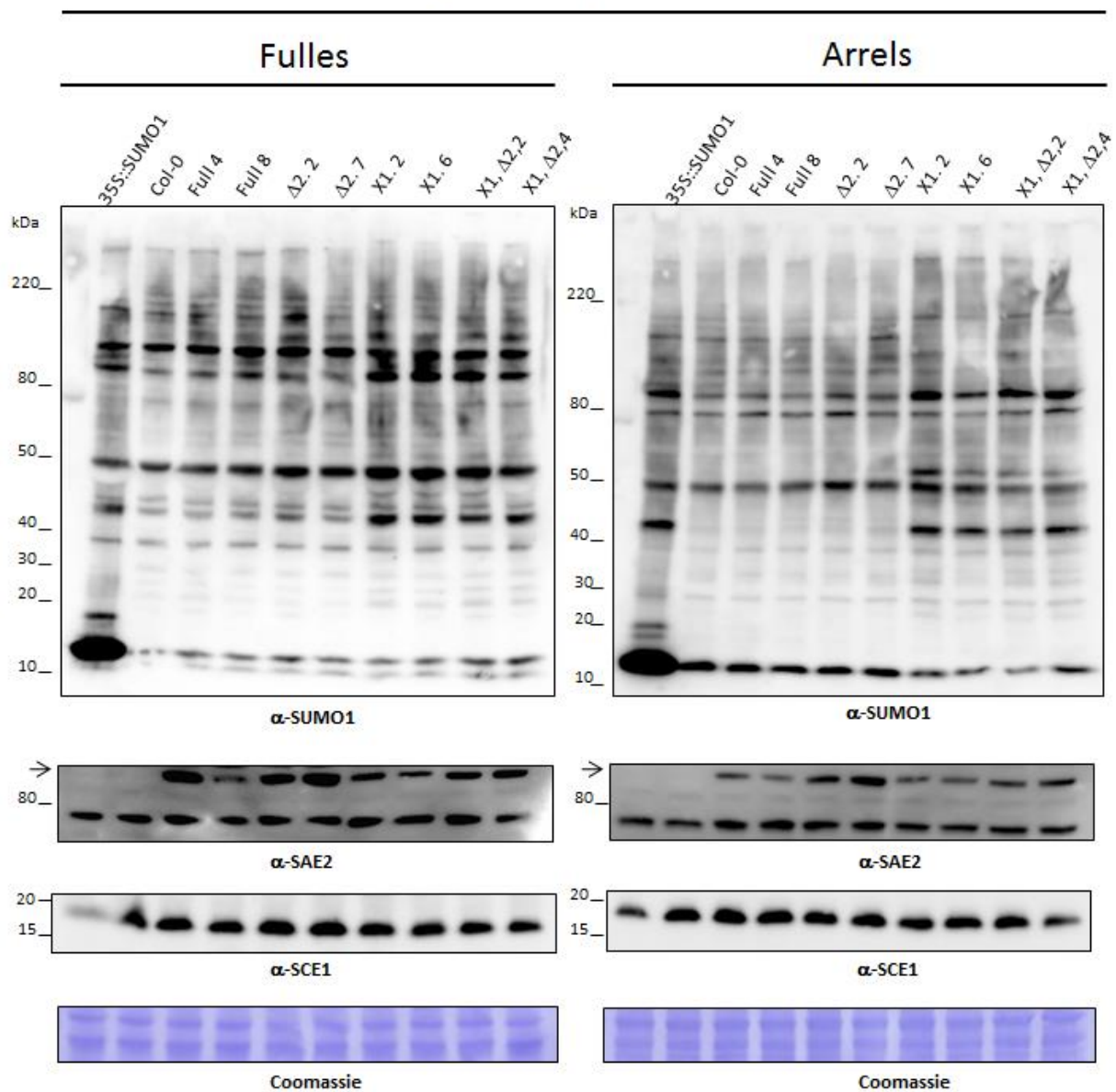


Figura 23 . Anàlisi de la maquinària de sumoilació de les plantes sobre-expressores del SAE2 sota el promotor endogen pSAE2. A. Els extractes de proteïna de fulles de rosseta i arrels de plàntules d'onze dies crescudes *in vitro* en condicions de dia llarg, en plaques medi MS-05X sense sacarosa en posició vertical, es van resoldre en un gel SDS-PAGE. Els conjugats de SUMO, l'enzim activador (SAE2), la proteïna recombinant eYFP::SAE2 (la fletxa marca la seva posició), i l'enzim conjugador (SCE1) es van analitzar mitjançant wester-blot amb els anticossos corresponents. A la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, com a control de càrrega. Cada carril conté 18µg de proteïna.

3.3. Anàlisi de la localització subcel·lular del SAE2 en Arabidopsis

Per tal de determinar *in vivo* en planta que el processament del SAE2 contribueix a la localització citosòlica del SAE2 així com per tal d'avaluar si en Arabidopsis el NLS2 és suficient per localitzar el SAE2 en el nucli, es van aïllar protoplasts de les línies FULL, $\Delta 2$, $\Delta 1,L$ que sobreexpressen diferents formes del SAE2 sota el promotor 35S. A continuació, es va analitzar la localització subcel·lular d'aquest enzim mitjançant microscopia confocal (**Figura 24**) amb un mètode de quantificació prèviament desenvolupat (Mas et al. 2016) (**Figura 13**).

L'anàlisi i comparació del CFR (Citosol Fluorescence Ratio) de les línies FULL i $\Delta 2$ no va mostrar diferències significatives entre ambdues construccions (**Figura 24A**). Tanmateix, tot i presentar el mateix CFR el nombre de cèl·lules que presentaven localització nuclear i citosòlica va ser major en els protoplasts de la línia $\Delta 2$ que la FULL. D'altra banda, quan es va analitzar la línia $\Delta 1,L$, el CFR dels protoplasts va ser significativament major a l'observada en els protoplasts que sobre-expressen les construccions FULL i $\Delta 2$. A més, sorprenentment, quasi un 40% de les cèl·lules de la construcció $\Delta 1,L$ mostraren una localització exclusivament nuclear (**Figura 24B**).

En resum, tenint en compte els resultats obtinguts, la NLS2 constitueix un senyal de localització nuclear no canònic suficient per localitzar el SAE2 en el nucli de les cèl·lules d'Arabidopsis, ja que les cèl·lules que sobre-expressen la construcció $\Delta 1,L$ del SAE2, presenten una localització nuclear o nuclear/citosòlica. Tot i que no s'han trobat diferències significatives en la localització citosòlica entre les construccions FULL i $\Delta 2$ existeix una tendència a trobar més cèl·lules amb localització nuclear i citosòlica en els protoplasts que sobre-expressen la forma del SAE2 processada ($\Delta 2$). A més, els resultats suggereixen que probablement la forma nadiua del SAE2 dels protoplasts FULL es processada si tenim en compte que es detecta senyal al citosol. D'altra banda, el fet de detectar un gran nombre de cèl·lules en els protoplasts que sobre-expressen la forma $\Delta 1,L$ del SAE2 fa sospitar que probablement la localització citosòlica del SAE2 estigui fortament regulada i pugui ser degradat en aquest compartiment subcel·lular.

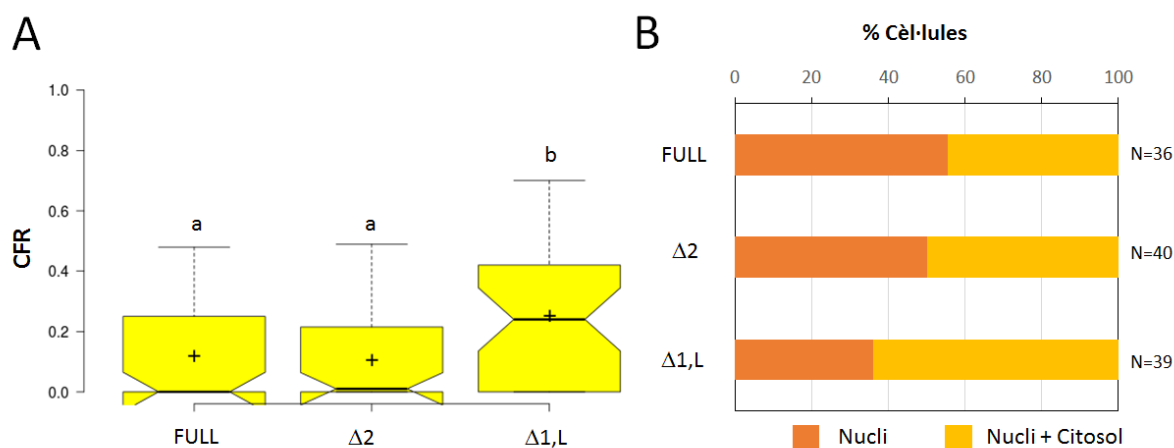


Figura 24. Anàlisi de localització subcel·lular del SAE2 en Arabidopsis. A. Quantificació de la senyal citosòlica i representació en diagrama en caixa del CFR (Citosol Fluorescence Ratio) segons el mètode descrit en (Mas et al. 2016) en protoplastos que sobre-expressen les formes del SAE2: (EYFP::SAE2, FULL), EYFP::SAE2 Δ NLS2 (Δ 2), EYFP::SAE2 Δ S575-V617 (Δ 1,L). Les línies centrals mostren les medians. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medians són diferents, (Chambers et al., 1983). Un total de 36, 40 i 39 cèl·lules van ser analitzades per a cadascuna de les construccions respectivament. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$). **B.** Representació de la proporció de cèl·lules que presenten localització nuclear i nuclear/citosòlica respecte al total de cèl·lules analitzades per a cadascuna de les construccions.

3.4. Anàlisi de la conjugació citosòlica de les línies 35S::SAE2 FULL i $\Delta 1,L$

Tot i haver identificat diferències quantitatives i qualitatives en la conjugació basal de SUMO en les línies $\Delta 1,L$ respecte a Col0, quedava per determinar si aquestes diferències eren el resultat d'un increment de la conjugació citosòlica de SUMO. Per adreçar aquesta qüestió, es van realitzar experiments de fraccionament cel·lular a partir de teixit d'arrels de plantes transgèniques de 11 dies, crescudes en plaques verticals o medi líquid, que expressen les variants de SAE2 FULL i $\Delta 1,L$ sota el promotor 35S (**Figura 25**).

Els extractes proteics obtinguts de les fraccions *input*, nucli i citosol es van resoldre en un gel SDS-PAGE i es van analitzar mitjançant immunoblot fent servir anticossos específics. Com a marcador nuclear, es va analitzar la presència de la Histona3 i, com a control de càrrega, es van analitzar els nivells de la HSP70 que presenta una distribució nuclear/citosòlica (**Figura 25**).

Quan es van analitzar els nivells de SAE2, es va observar que una petita proporció tant del SAE2 endogen com del eYFP::SAE2 recombinant mostrava una localització citosòlica en les dues línies analitzades, FULL i $\Delta 1,L$. Pel que fa al SUMO, la seva forma lliure presentava una localització exclusivament citosòlica en ambdues línies, mentre que la distribució de conjugats de SUMO presentava diferències quantitatives i qualitatives entre les dues línies. Aquestes bandes diferencials, es poden classificar en tres tipus: bandes que es troben presents únicament al nucli (a), bandes que es troben enriquides tant en el nucli com en el citosol (b) i bandes que es troben enriquides únicament al citosol (c) (**Figura 25A**). A pesar de que no totes, algunes de les bandes enriquides en la línia $\Delta 1,L$ presentaven una distribució principalment citosòlica. D'altra banda i des d'un punt de vista quantitatiu, tant la línia FULL com $\Delta 1,L$, mostraren que la majoria de conjugats de SUMO s'acumulen al nucli però amb proporcions relatives significativament diferents, un 90 i 80%, respectivament. L'acumulació de conjugats de SUMO al citosol a línia $\Delta 1,L$ era el doble a l'observada en la línia FULL (**Figura 25B**). Aquest resultat són coherents amb la hipòtesi inicial que planteja que la conjugació de SUMO al citosol pot estar afavorida pel processament del senyal NLS2 del SAE2 i, en conseqüència, la seva acumulació en el citosol.

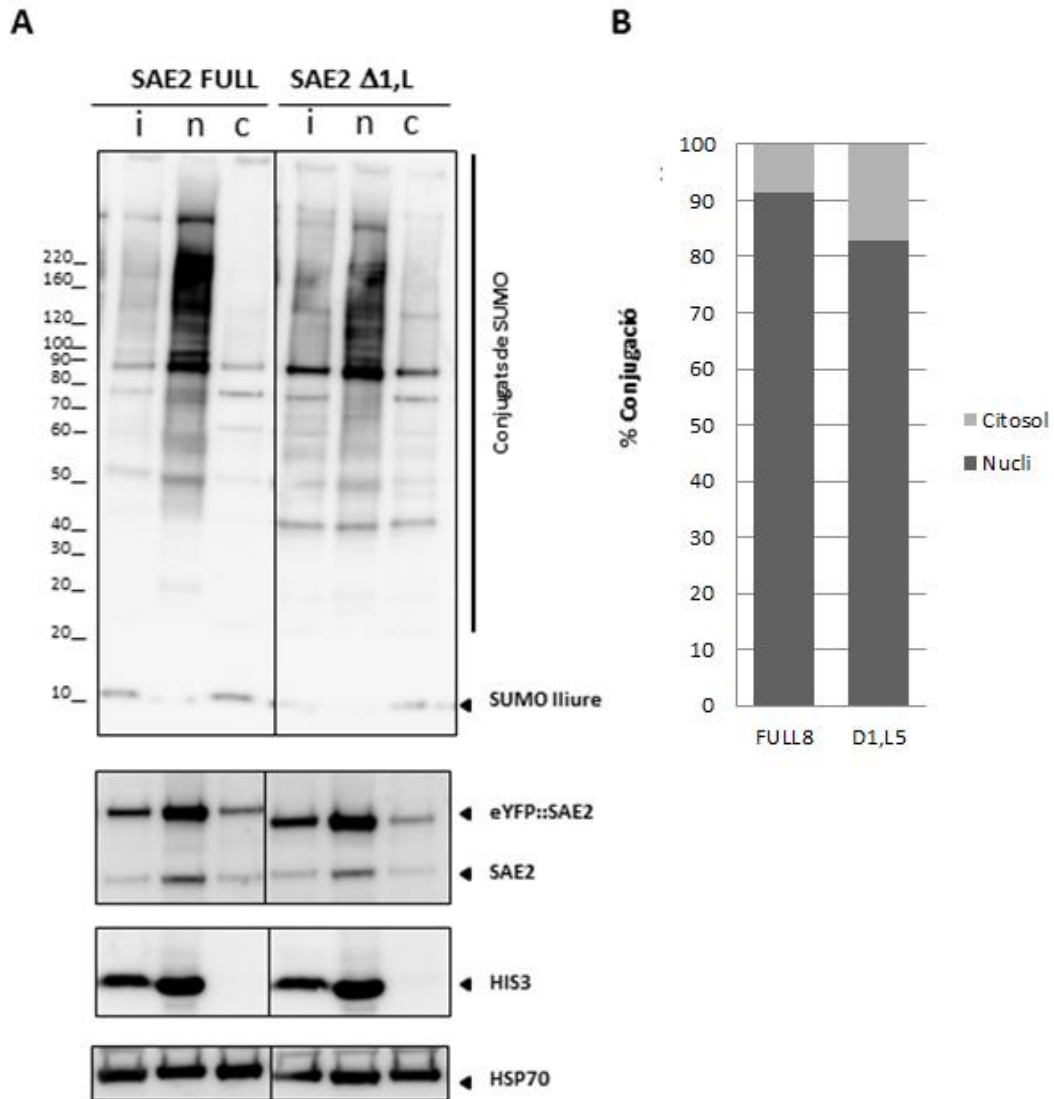


Figura 25 . Distribució dels conjugats de SUMO en les plantes sobreexpressores de variants del SAE2. A. Els extractes de proteïna procedents dels fraccionament subcel·lular d'arrels, de plàntules d'onze dies crescudes en plaques amb medi MS 0.5X sense sacarosa en posició vertical i en condicions de dia llarg, es van resoldre en un gel SDS-PAGE i els conjugats de SUMO, l'enzim activador (SAE2), histona HIS3 (proteïna nuclear) i la HSP70 (proteïna nuclear/citosòlica) es van detectar mitjançant western-blot fent servir anticossos específics. Les fraccions analitzades corresponen al input (i), nucli (n) i citosol (c). Cada carril conté 18µg de proteïna **B.** Quantificació relativa de la conjugació de SUMO en el nucli i citosol en les plantes sobreexpressores del SAE2 (FULL) i (Δ1,L). Per a la quantificació del percentatge de conjugació es va fer servir el programari MultiGauge v.3 (Fujifilm) i la regió d'interès (ROI) va ser definida com un rectangle que inclogués totes les bandes detectades per sobre del SUMO lliure en cada línia. La mateixa ROI que va ser utilitzada per la quantificació del conjugats de SUMO en cada línia es va fer servir per quantificar el senyal basal. Es representa la mitja de l'acumulació relativa de conjugats de SUMO al citosol i nucli obtinguda a partir de l'anàlisi de quatre rèpliques biològiques.

4. Anàlisi de l'efecte de l'enriquiment citosòlic del SAE2 en el desenvolupament d'Arabidopsis.

L'estudi de plantes amb alteracions en la seva capacitat de SUMOilació ha permès demostrar que la conjugació de SUMO regula el desenvolupament de les plantes i es troba implicada en processos tan importants com la divisió, l'expansió i la diferenciació cel·lular, el creixement vegetatiu i el desenvolupament reproductiu. La SUMOilació juga un paper essencial en el desenvolupament de la llavor, així, els mutants knock-out de l'enzim activador SAE2, *sae2*, conjugador SCE1, *sce1*, o els dobles mutants de les isoformes de SUMO1 i 2, *sumo1/2*, són letals com a resultat d'un desenvolupament incorrecte de l'embrió (Saracco et al. 2007; H. J. Park et al. 2011).

Tanmateix, i malgrat la seva importància, l'estudi dels mecanismes moleculars que faciliten la regulació per SUMOilació dels diferents processos biològics esmentats es troba en una fase primerenca (Saracco et al. 2007; H. J. Park et al. 2011; Elrouby 2015). En aquest context, els nostres resultats afegeixen un nou nivell de regulació de la conjugació de SUMO *in vivo* mitjançant el processament postraduccional del SAE2 i, conseqüentment, el seu enriquiment en el citosol.

Amb l'objectiu de caracteritzar la rellevància biològica d'aquest nou mecanisme de regulació de la SUMOilació, es va realitzar una caracterització i comparació fenotípica entre les diferents línies transgèniques descrites a l'apartat 3. Per simplificar, al llarg d'aquest apartat, quan s'indiqui que es fa un anàlisi de les línies transgèniques sobreexpressores del SAE2, es farà referència a la caracterització i comparació de les diferents línies sobreexpressores de la forma nadiua del SAE2, la seva forma processada ($\Delta 2$) i les diferents variants defectives en la seva localització subcel·lular ($\Delta 1, L, X1$), ja sigui sota el promotor constitutiu p35S o bé sota el promotor endogen pSAE2 (**Figura 21**). Els aspectes analitzats inclouen: fenotip de llavor, elongació d'hipocòtils durant l'establiment de la plàntula, mida de roseta i floració. Entre aquests aspectes, tenint en compte el paper essencial de la SUMOilació en el desenvolupament de la llavor així com que el processament del SAE2 ocorre durant la maduració d'aquesta, s'ha posat especial interès en l'estudi de la llavor.

4.1. Anàlisi de la producció de llavors de les diferents línies sobre-expressores del SAE2.

La grandària i el nombre de llavors produïdes són dos dels paràmetres principals que contribueixen al rendiment i producció de llavors de la planta. Tanmateix, el seu estudi és molt complex ja que múltiples factors genètics, bioquímics i moleculars controlen aquests paràmetres tant importants des d'un punt de vista agronòmic (Van Daele et al. 2012).

La SUMOilació s'ha descrit com un dels factors rellevants en la producció de les llavors de la planta, de manera que plantes amb una conjugació deficient de SUMO presenten una reducció en la producció de les llavors (Liu et al. 2014; Castaño-Miquel et al. 2017).

En aquest context, es va voler avaluar la producció de les llavors en les línies transgèniques sobreexpressores del SAE2. La productivitat per a cadascuna de les línies transgèniques es va determinar mitjançant el pes total de les llavors produïdes per cada planta analitzada. Degut a la variabilitat de la producció entre les diferents rèpliques biològiques analitzades, es va calcular la producció relativa definida com el pes total de les llavors produïdes per cada planta en relació a la mitja produïda pel total de plantes analitzades en cada rèplica biològica.

Quan es van analitzar la producció relativa de llavors en les línies transgèniques sobreexpressores del SAE2, no es van trobar diferències significatives entre les diferents línies i construccions, especialment en el cas de les línies que expressen el SAE2 i les seves variants sota el promotor 35S (**Figura 26A**). En el cas de les plantes en les que es va utilitzar el promotor SAE2 (**Figura 26B**), es va observar una tendència que suggereix que l'enriquiment del SAE2 en el citosol podria tenir un efecte negatiu en la producció de llavors, però seria necessari augmentar el número de rèpliques per determinar si aquesta tendència pot reflectir una diferència significativa.

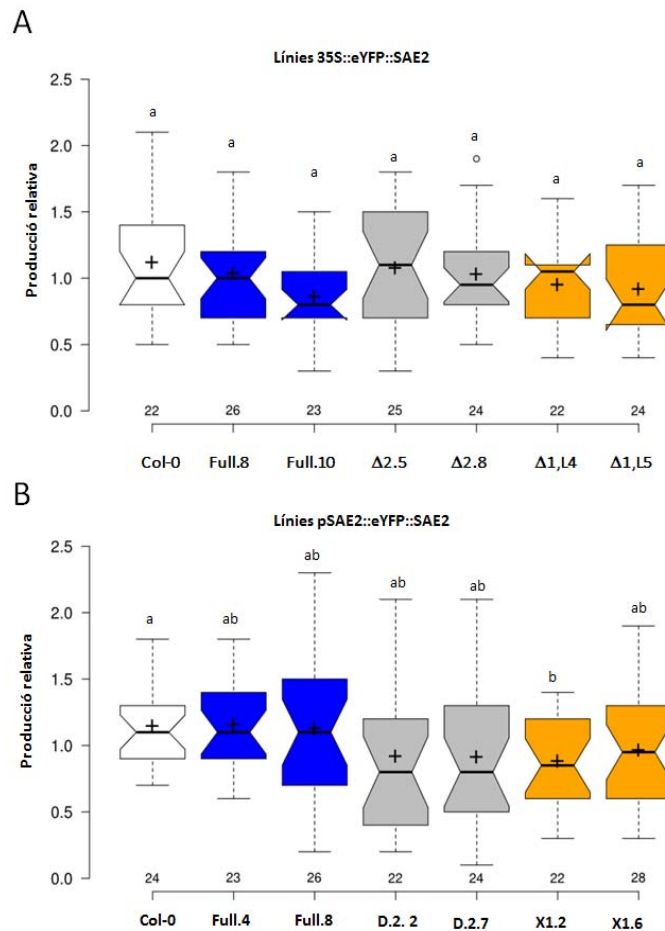


Figura 26. Anàlisi de l'efecte de la sobre-expressió de diferents variants del SAE2 en la producció de llavors. Es representa la producció relativa de llavors per a cadascuna de les línies transgèniques 35S::eYFP::SAE2 (A) i les pSAE2::eYFP::SAE2 (B). Un total de 4 rèpliques biològiques van ser analitzades i per a cada línia es va determinar el pes total de les llavors produïdes en 5-7 individus. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitges. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 22, 26, 23... correspon al total d'individus analitzats en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

4.2. Caracterització de la grandària de la llavor de les diferents línies sobreexpressores del SAE2.

La grandària final de la llavor s'aconsegueix a través d'un creixement coordinat entre tres elements que desenvolupen simultàniament la llavor: l'embrió, l'endosperm i la coberta de la llavor. I el creixement d'aquests tres elements es troba genèticament controlat per diferents reguladors identificats (Sun et al. 2010).

Com que no existeix cap estudi que hagi analitzat el de la SUMOilació en la determinació de la grandària de la llavor es va analitzar primerament aquest paràmetre en les llavors la línia sobreexpressora de SUMO1, que presenten una SUMOilació augmentada, el mutant *siz1-3*, que presenta una disminució de la conjugació, i Col-0 com a control. A més, es va afegir la línia mutant *shp1shp2* (SHATTERPROOF1 i 2 MADS-box) que presenta unes llavors amb una grandària major que les línies Col-0 (dades no publicades, laboratori de Lucia Colombo). La grandària de les llavors es va analitzar mitjançant el programari lliure SmartGrain (Tanabata et al. 2012).

L'anàlisi de la grandària o àrea de les línies SUMO1, Col-0, *siz1-3* i *shp1shp2* va revelar en primer lloc i com era d'esperar que les llavors de la línia *shp1shp2* presenten una grandària significativament major respecte a la resta de línies. Ara bé, quan es va analitzar les llavors de la línia sobre-expressora SUMO1, aquestes presentaren també una grandària significativament major respecte a Col-0, però significativament menor respecte a la línia control *shp1shp2* (**figura 27**). D'altra banda, i de forma sorprenent, quan es va analitzar l'àrea de les llavors de de la línia mutant *siz1-3*, es va trobar que de forma similar a la línia sobre-expressora SUMO1, les seves llavors són significativament més grans que les de Col-0 (**Figura 27**).

En resum, aquests resultats suggereixen que una desregulació de la conjugació de SUMO resulta en un augment de la grandària de la llavor, el que suposa un nou paper biològic de SUMO en el desenvolupament de la llavor.

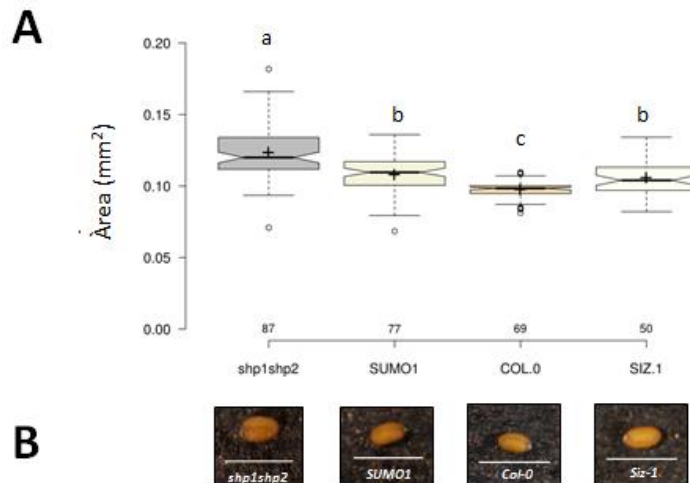


Figura 27. La SUMOilació regula la grandària de la llavor. Anàlisi morfològic de l'àrea (A), i fotografia de les llavors (B). L'àrea de les llavors va ser analitzada en 4 rèpliques biològiques independents amb el programari lliure SmartGrain. Per a cada línia es va quantificar l'àrea de 15-20 llavors en cadascuna de les rèpliques analitzades. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). $n = 87, 77, 69, 50$, correspon al total de llavors analitzades en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

A continuació es va analitzar l'àrea de les diferents línies transgèniques sobreexpressores del SAE2 (**figura 28**). Pel que fa a les línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S, les línies $\Delta 1, L4$, $\Delta 1, 2, L8$, i $\Delta 1, 2, L8$ mostraren una augment de la grandària significativament major a Col-0, però no les Full, $\Delta 2$, que tenen un fenotip entremig, i $\Delta 1, L5$, indicant que l'enriquiment de SAE2 en el citosol podria resultar en un augment de la grandària de la llavor (**Figura 28A**). En canvi, totes línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor pSAE2 mostraren un augment de la seva àrea, no observant-se diferències significatives entre les diferents construccions analitzades (**Figura 28B**).

En resum, la SUMOilació regula la grandària de la llavor i l'expressió del SAE2 sota el promotor pSAE2 endogen provoca una augment de la grandària de la llavor. Tanmateix, considerant la variabilitat de resultats obtinguts dependent del promotor

utilitzat, no es poden treure conclusions fermes sobre paper del processament del SAE2, i la seva localització citosòlica, en la regulació de la grandària de la llavor.

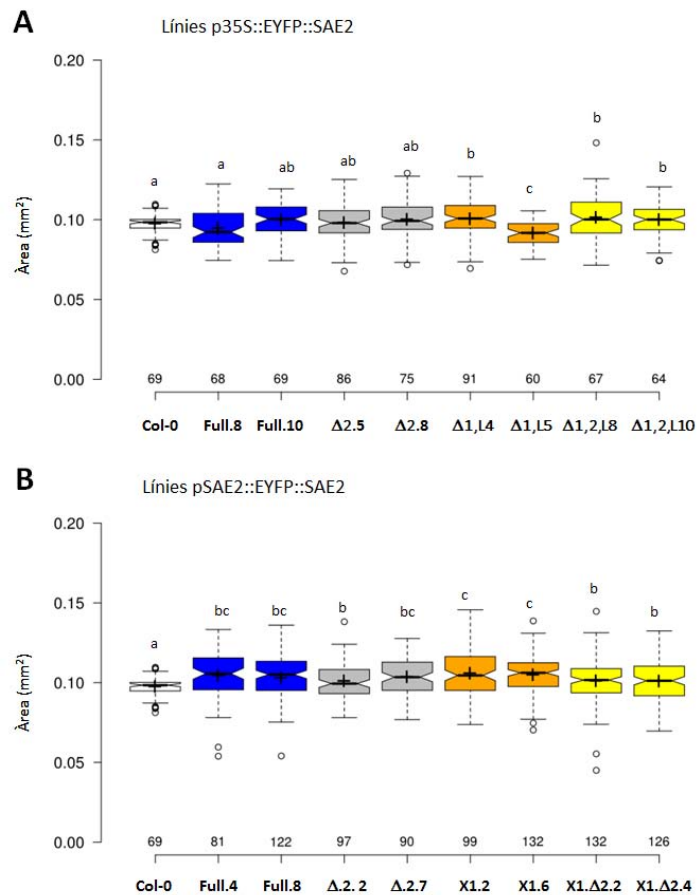


Figura 28. Anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió del SAE2 en la grandària de la llavor. Anàlisi de de l'àrea de la llavor en les línies sobre-expressores 35S::EYFP::SAE2 (A) i (B) pSAE2::EYFP::SAE2. La morfologia de les llavors va ser analitzada en 4 rèpliques biològiques independents amb el programari lliure SmartGrain. Per a cada línia es va quantificar l'àrea de 15-30 llavors en cadascuna de les rèpliques analitzades. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 87, 77, 69, 50, correspon al total de llavors analitzades en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

4.3. Estudis de l'efecte del processament del SAE2 en l'organització ultraestructural de la llavor.

Amb l'objectiu d'aprofundir en la caracterització i la diferenciació fenotípica de les llavors produïdes per les línies sobre-expressores de la forma nadiua i processada del SAE2, es va procedir a realitzar un estudi de la seva ultraestructura mitjançant microscòpia electrònica de transmissió.

L'anàlisi ultraestructural de les llavors t recol·lectades després de 10 a 15 dies després de la pol·linització, que coincideix amb el processament del SAE2 en el desenvolupament de la llavor (**Figura 10**), va mostrar diferències en l'estructura de les vacuoles de proteïnes de reserva (PSV, *protein storage vacuoles*) relacionades amb la densitat electrònica i la morfologia dels globoides continguts (**Figura 29**). Durant la germinació, les proteïnes de reserva són degradades per proporcionar els nutrients necessaris durant el període en el que la nova plàntula no ha adquirit encara la seva capacitat fotosintètica. Està descrit que les PSVs en les llavors de la majoria de les plantes dicotiledònies i al endosperma de cereals contenen tres regions morfològicament diferents en relació a les propietats que mostren en la seva observació per microscopia electrònica: la matriu, els cristal·loides i els globoides. Les PSVs en les llavors de lleguminoses es diferencien en què no tenen cristal·loides, però contenen nombrosos globoides petits (Jiang et al. 2001). La majoria de les proteïnes solubles s'acumulen en la matriu. Els cristal·loides contenen proteïnes de reserva, proteïnes de membrana i lipids. Els globoides estan formats per cristalls d'oxalat i àcid fític, i s'ha proposat que estan delimitats per una doble membrana lipídica (Isayenkov 2014).

Les llavors produïdes per plantes que expressen EYFP::SAE2 sota el promotor 35S presentaren alteracions en els globoides, sent la més rellevant la presència d'un patró reticular no observat en les llavors control Col-0. Aquestes alteracions en el patró reticular eren encara més dramàtiques en les llavors que expressen la forma processada del SAE2 (EYFP::SAE2 Δ 2) (**Figura 29**). Aquestes resultats suggereixen que la SUMOilació tindria un paper regulador en la formació de vacuoles de reserva de proteïnes i que aquesta regulació podria estar facilitada per esdeveniments de SUMOilació en citosol.

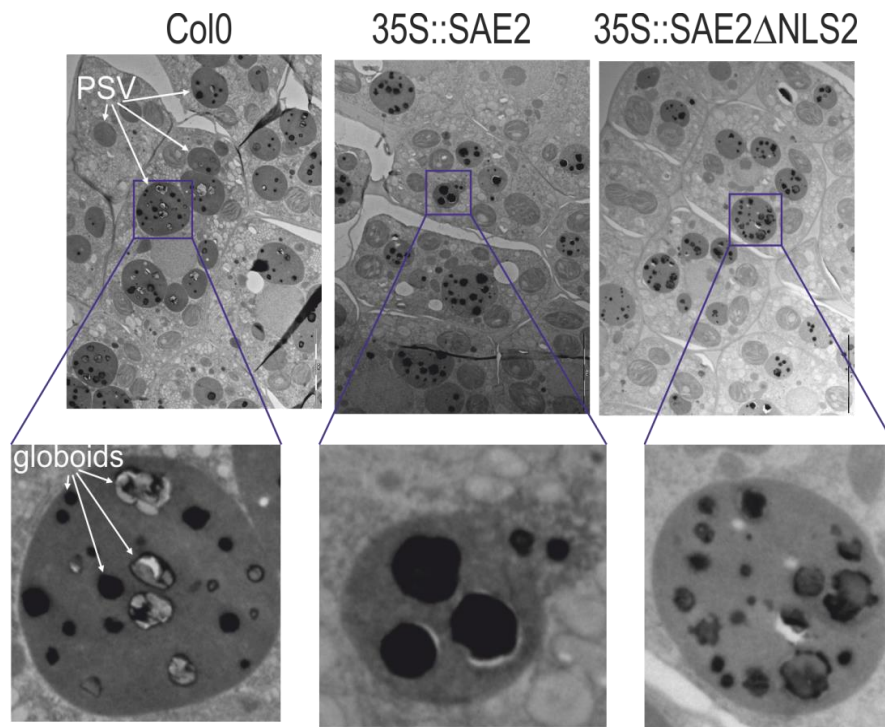


Figura 29. Anàlisi de l'ultraestructura de llavors en desenvolupament de diferents línies sobreexpressores del SAE2. L'anàlisi i comparació de l'ultraestructura de les línies 35S::EYFP::SAE2 (FULL) i 35S::EYFP::SAE2 (Δ 2) i el control Col-O va revelar alteracions en la densitat d'electrons i la morfologia de les vacuoles de proteïnes de reserva (PSVs). Les llavors verdes en desenvolupament van ser recollides després de 10-15 post antesi, mitjançant congelació d'alta pressió i van ser preparades per l'anàlisi de microscopia electrònica. Es mostren imatges representatives dels teixits dels embrions. Les fletxes indiquen la localització dels globòids i les vacuoles de proteïnes de reserva.

4.4. Caracterització dels hipocòtils de les diferents línies sobreexpressores del SAE2.

Recentment, s'ha descrit que la funció de COP1 i PhyB, dos reguladors essencials en les respostes a la llum de la planta, està regulada per la SUMOilació. En aquest context, s'ha descrit que SIZ1 regula negativament la fotomorfogènesis mitjançant la SUMOilació de COP1, afavorint la seva activitat lligasa d'ubiquitina i degradant reguladors positius de la fotomorfogènesis (Lin et al. 2016) D'altra banda s'ha descrit que la SUMOilació de phyB regula negativament la senyalització en resposta a la llum mitjançant la inhibició de la interacció entre phyB i els PIFs (PHYTO-CHROME-INTERACTING-FACTORS), els quals actuen com reguladors negatius de la fotomorfogènesis (Sadanandom et al. 2015).

En aquest context, es va caracteritzar la fotomorfogènesi de les diferents línies sobreexpressores del SAE2 i més concretament es va avaluar el creixement de l'hipocòtil en tres fotoperíodes diferents: en condicions de dia llarg, dia curt i foscor (**Figura 30**)

L'anàlisi fotomorfogènic de les línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S va revelar que, en condicions de dia llarg (LD, long day), les línies FULL presentaven un hipocòtil significativament més llarg en relació a la resta de línies analitzades així com en relació a Col-0 (**Figura 30A**). Al contrari, les línies $\Delta 2$, $\Delta 1,L$, i $\Delta 1,2,L$ presentaren una reducció significativa del creixement de l'hipocòtil en relació a les línies FULL i Col-0, suggerint que l'enriquiment del SAE2 al citosol exerceix una regulació negativa sobre la funció del SAE2 nuclear. D'altra banda, quan es va analitzar la longitud dels hipocòtils de les plantes sobreexpressores SUMO1 no es van observar diferències significatives amb la línia Col-0. En condicions de dia curt (SD, short day) es va observar que totes les línies p35S::EYFP::SAE2 presentaven hipocòtils més llargs respecte al fenotip silvestre (Col-O) i la línia sobreexpressora SUMO1 (**Figura 30B**). Tanmateix no es van observar diferències quan es van comparar les diferents línies transgèniques entre elles.

Finalment, en condicions de foscor, totes les línies sobreexpressores de SAE2 analitzades van mostrar una elongació d'hipocòtil semblant a la línia sobreexpressora de SUMO1, i significativament menors respecte a Col-0, tot i que les diferències eren molt petites (**Figura 30C**).

Paral·lelament es va analitzar la longitud dels hipocòtils de plàntules crescudes

en condicions de dia llarg, dia curt i fosc en les línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor pSAE2 (**Figura 30**). L'anàlisi va mostrar que de forma similar al que es va observar en les línies generades amb el promotor 35S, les línies que expressen la forma nuclear del SAE2 (FULL) mostraren una longitud d'hipocòtil més gran que la resta de línies analitzades en condicions LD (**Figura 30D**). I de la mateixa manera, les línies que expressen formes del SAE2 enriquides en el citosol ($\Delta 2$, $\Delta 1,L$, i $\Delta 1,2,L$) reverteixen el fenotip de les que expressen la forma nuclear (FULL), presentant una reducció de l'elongació d'hipocòtil equivalent a Col-0.A més i d'igual forma a l'observada en les generades amb el promotor 35S, les plàntules de les totes línies generades amb el promotor pSAE2 crescudes en condicions de dia curt (SD) presentaren un hipocòtils significativament majors que la sobreexpressora de SUMO i la línia silvestre Col-0 (**Figura 30E**).

Finalment, quan es va analitzar la longitud del hipocòtil en condicions de fosc, es va observar el mateix comportament observat en les línies generades amb el promotor 35S, una lleugera reducció significativa de la longitud de l'hipocòtil (**Figura 30F**).

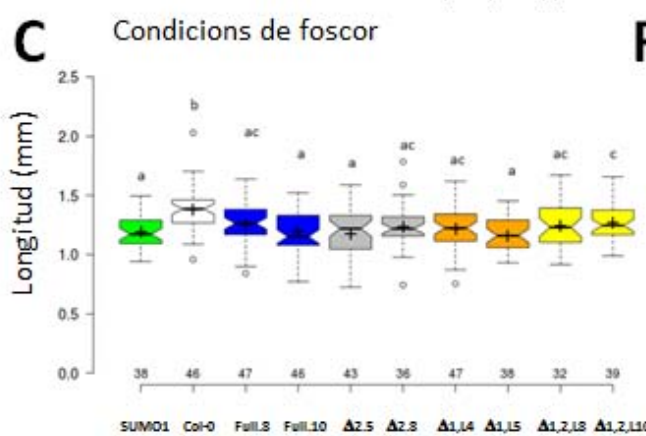
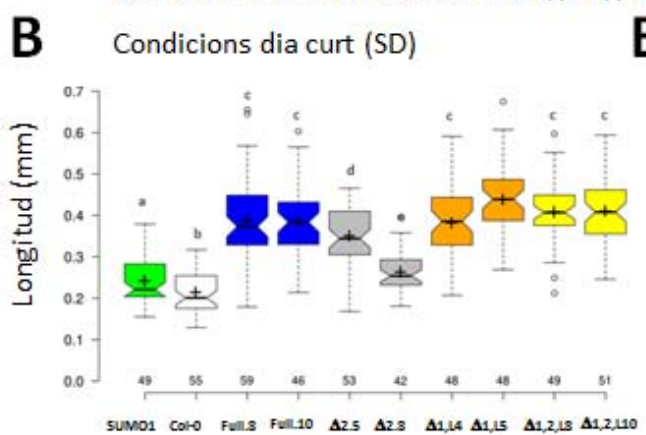
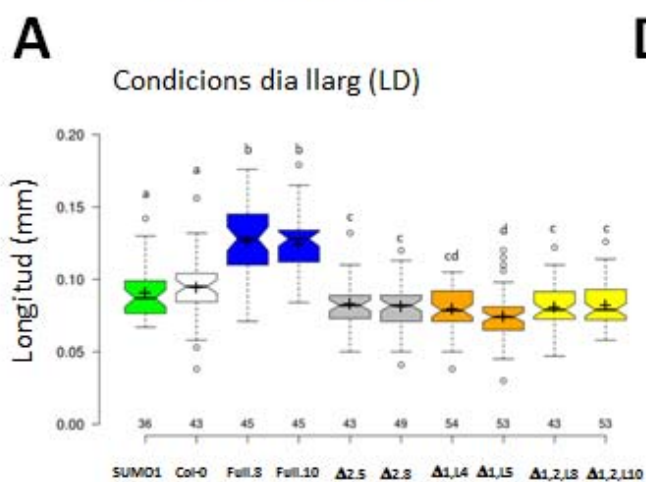
En resum, els nostres resultats indiquen que l'augment de la capacitat de SUMOilació per sobreexpressió del SAE2 produeix una hiposensibilitat a la llum, tal i com indica l'atenuació de la inhibició de l'elongació del hipocòtil observada en les plantes que expressen la forma nativa del SAE2. Aquesta hiposensibilitat és independent del promotor utilitzat per controlar l'expressió del SAE2 i també és independent del fotoperíode. En canvi, l'expressió de les variants del SAE2 enriquides en el citosol ($\Delta 2$, $\Delta 1,L$, i $\Delta 1,2,L$) afecta de forma diferent, i depenent del fotoperíode, a la capacitat de les plantes de respondre a la llum.

Mentre que en condicions de dia llarg, l'enriquiment del SAE2 al citosol contraresta l'efecte de l'expressió de la forma nuclear del SAE2 (FULL), en condicions de dia curt totes les línies sobreexpressores de SAE2 es comporten de manera semblant, mostrant una elongació de l'hipocòtil més gran que Col-0. El fet de que en condicions de fosc les diferències entre les línies estudiades i Col-0 siguin molt petites indica que els fenotips observats estan relacionats amb alteracions de la resposta a llum d'aquestes plantes.

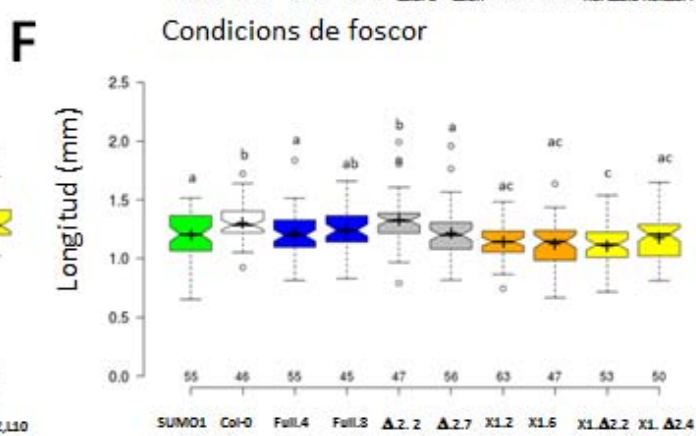
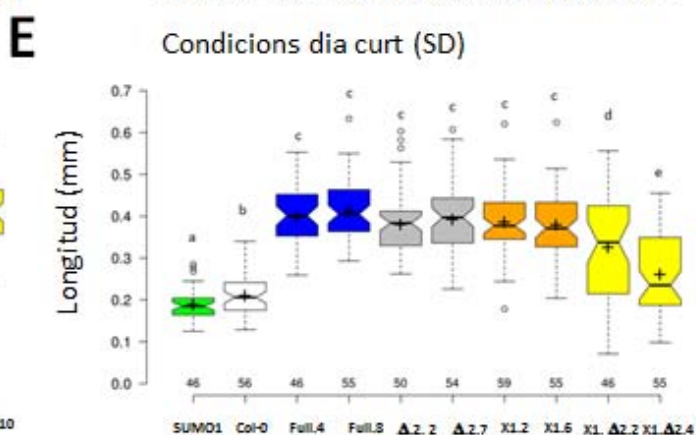
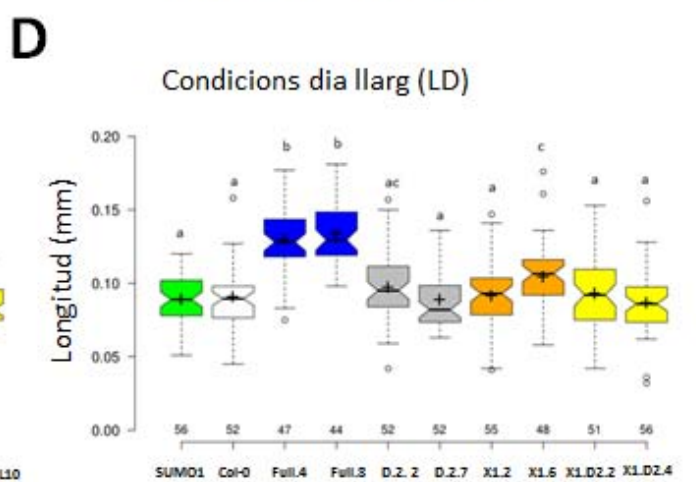
En definitiva, els resultats obtinguts suggereixen que la localització nuclear del SAE2 regularia negativament la sensibilitat a la llum i aquest procés podria estar regulat negativament pel processament del SAE2 i a seva localització citosòlica.

Figura 30. Anàlisi de l'efecte de la sobre-expressió del SAE2 en el creixement de l'hipocòtil en les línies 35S::EYFP:SAE2. Anàlisi morfològic de la longitud de l'hipocòtil de les plàntules de les línies sobre-expressores 35S::EYFP::SAE2, crescudes en en condicions de dia llarg (A) i en condicions de dia curt (B) durant 4 dies. La longitud dels hipocòtils va ser analitzada en 3 rèpliques biològiques independents amb el programari lliure ImageJ. Per a cada línia es van mesurar entre 10-15 plàntules. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 46, 55, 59... correspon al total d'hipocòtils analitzats en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

Línies 35S::eYFP::SAE2



Línies pSAE2::eYFP::SAE2



4.5. Anàlisi fenotípic del l'arrel de les diferents línies sobreexpressores del SAE2.

La rellevància de la SUMOilació en el desenvolupament de l'arrel va ser primerament descrita en els estudis de caracterització dels mutants de les lligases AtSIZ1 i AtMms21. Mentre que el mutant *siz1*, en condicions d'absència de fòsfor, presenta un increment d'arrels laterals així com del ràtio arrel/part aèrea (Miura et al. 2005), els mutants *mms21* en condicions normals presenten un escurçament de l'arrel i tenen desregulats l'expressió de marcadors de divisió cel·lular i gens induïts per citoquinines, la qual cosa indica que AtMMS21 regula el desenvolupament del meristem radicular mitjançant la regulació del cicle cel·lular i la senyalització de les citoquinines (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009).

En aquest context quan es va avaluar la longitud de l'arrel de les línies transgèniques sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S, es va observar que les línies FULL presenten una arrel significativament més curta que el control Col-0 i que la resta de les línies analitzades (**Figura 31A**). D'altra banda quan es compara les línies FULL amb les $\Delta 2$ i les línies $\Delta 1,L$ i $\Delta 1,2,L$, semblaria indicar existeix una reversió dels efectes de la localització exclusivament nuclear del SAE2.

Quan es va analitzar la longitud de l'arrel de les línies transgèniques sobreexpressores del SAE2 sota el promotor pSAE2 i, més concretament les línies FULL, no es va observar l'escurçament de l'arrel como ocorre en les línies generades amb el promotor 35S. D'altra banda, tot i que tampoc es van observar diferències significatives entre les línies $\Delta 2$ i FULL, les seves arrels van ser significativament més curtes respecte a les línies X1 i X1 $\Delta 2$ (**Figura 31B**).

En resum, els resultats obtinguts de l'anàlisi de la longitud de l'arrel en les diferents línies sobreexpressores del SAE2 suggereixen que l'acumulació del SAE2 nuclear en els teixits radiculars provoca un escurçament de l'arrel i que la localització citosòlica del SAE2 podria regular negativament aquest procés, tot i que aquests resultats només s'observen en línies generades amb el promotor 35S.

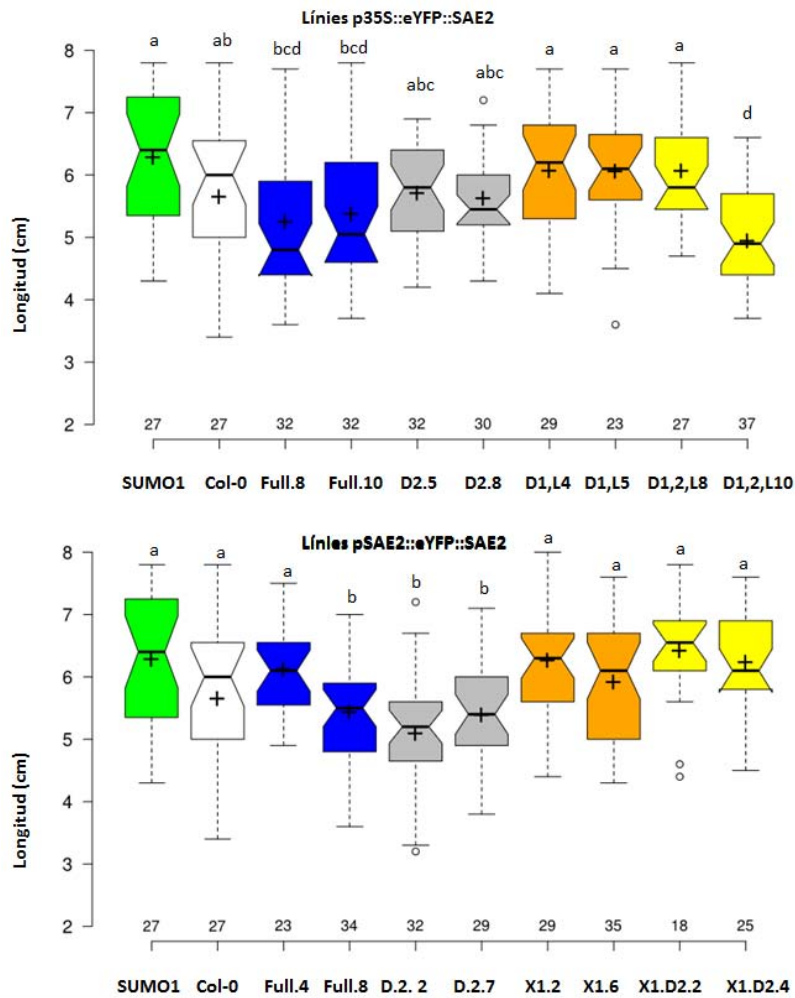


Figura 31. Anàlisi de l'efecte de la sobre-expressió del SAE2 en el creixement de l'arrel. Anàlisi morfològic de la longitud de l'arrel de les plàntules de les línies sobre-expressores p35S::eYFP::SAE2 (A) i pSAE2::eYfp::SAE2 (B). Les plàntules va ser creixudes en condicions de dia llarg a 7 dies i les seves arrels van ser mesurades amb el programari ImageJ. Un total de 5 rèpliques biològiques van ser analitzades. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 27, 27, 23... correspon al total d'arrels analitzats en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

4.6. Anàlisi fenotípic de la roseta de les diferents línies sobreexpressores del SAE2.

Els resultats obtinguts en els estudis de caracterització fenotípica dels mutants deficients en la conjugació de SUMO com són *siz1*, *mms21*, així com l'estudi dels mutants generats en el nostre laboratori (línies UFD), indiquen que la SUMOilació juga un paper essencial en el desenvolupament de la roseta de les plantes (Castaño-Miquel et al. 2017).

Quan es va analitzar l'àrea de la roseta de les línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S, es va observar en primer lloc que les línies FULL no presenten diferències significatives respecte al control Col-0, mentre que les línies $\Delta 2.8$, $\Delta 1,L4$ i $\Delta 1,L5$ mostraren una àrea significativament menor a la línia silvestre Col-0 i les línies FULL (**Figura 32A**). Curiosament, quan es va analitzar la longitud del pecíol, es va observar que les línies FULL presentaven un pecíol significativament més llarg respecte a la resta de les línies analitzades (**Figura 32B**).

D'altra banda quan es van analitzar les línies sobreexpressores del SAE2 sota el promotor pSAE2, no es van observar diferències significatives en l'àrea de la roseta a excepció de la línia X1.6 (**Figura 32C**). Tanmateix, quan es va quantificar la longitud dels pecíols en aquestes plantes, es va observar que les línies que expressen la forma nativa (FULL) de SAE2, presenten uns pecíols significativament més llargs en relació a la resta de línies, de manera similar a les línies que l'expressen sota el promotor 35S (**Figura 32D**). També es conserva la reducció del pecíol observada en les línies que expressen les formes del SAE2 enriquides en el citosol ($\Delta 2$ i X1), revertint l'efecte de l'expressió de la forma nuclear.

En resum, les dades de l'anàlisi de la roseta suggereixen que l'acumulació de la forma nuclear del SAE2 regularia positivament la longitud del pecíol i que el processament del SAE2 i la seva localització citosòlica podria regular negativament l'efecte del SAE2 nuclear. En canvi, l'àrea foliar no estaria afectada, el que resulta en rosetes menys compactes.

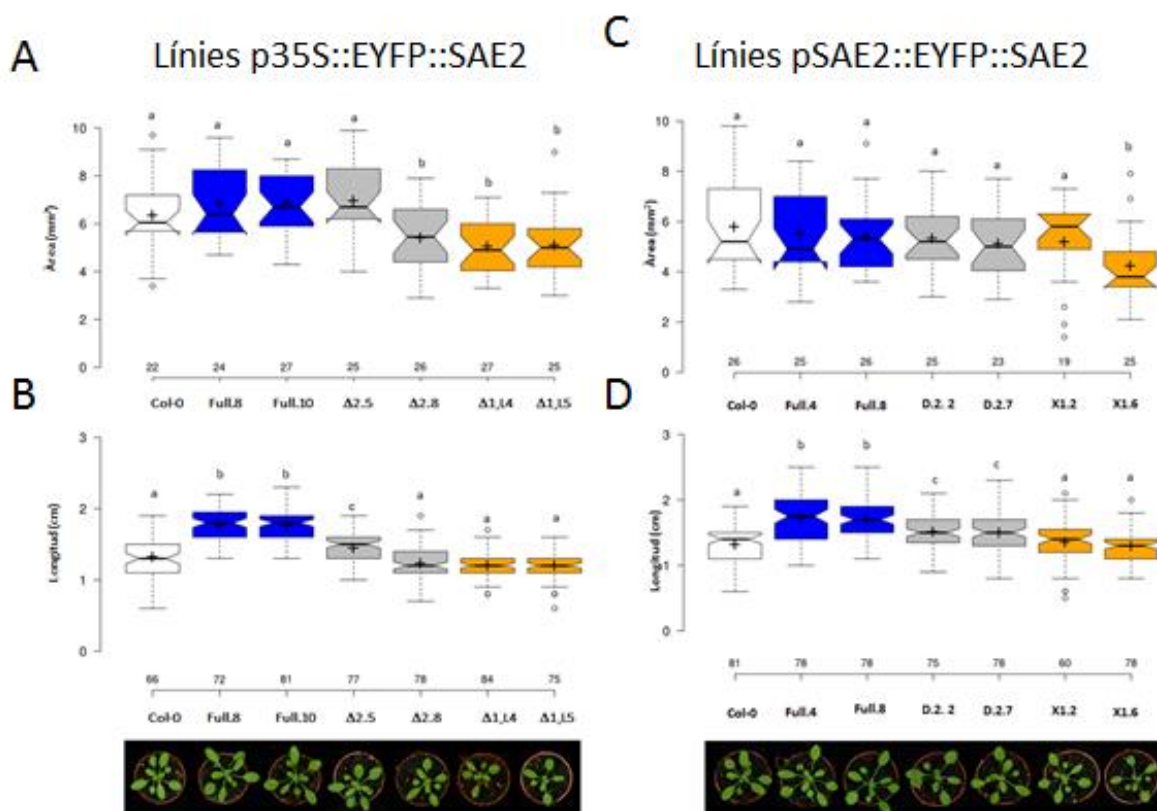


Figura 32. Anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió del SAE2 en el desenvolupament de la roseta en les línies 35S::EYFP::SAE2. Anàlisi de l'àrea de la roseta (A) i la longitud dels pecíols (B) en plantes de 21 dies crescudes en condicions de dia llarg. Un total de 4 rèpliques biològiques van ser analitzades. L'àrea de la roseta i la longitud del pecíol van ser analitzats mitjançant el programari ImageJ. Les línies centrals mostren les mediances; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3 - Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos mediances són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 66, 72, 81... correspon al total d'individus analitzats en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

4.7. Anàlisi fenotípic de la floració de les diferents línies sobreexpressores del SAE2.

Els estudis fenotípics dels mutants de la maquinària de SUMOilació han permès caracteritzar el paper de la SUMOilació en la floració de les plantes. (Jin et al. 2008; Son et al. 2014; Elrouby et al. 2013; Kwak et al. 2016; Castaño-Miquel et al. 2017).

En aquest context es va analitzar la floració de les diferents línies sobreexpressores del SAE2 mitjançant el monitoratge del nombre de dies transcorreguts així com el nombre de fulles presents a la roseta en el moment de la floració.

Quan es van comparar les línies transgèniques amb la línia silvestre Col-0 es va trobar diferències significatives tant amb el número de dies transcorregut com en el nombre de fulles en el moment de la floració (**Figura 33**). De fet, totes les línies transgèniques a excepció de les línies X.1, mostraren una floració retardada respecte a Col-0. Per exemple, les línies FULL tant sota el promotor pSAE2 com p35S mostraren una mitja de 4 fulles més en el moment de la floració. D'altra banda, les línies que expressaven les versions del SAE2 enriquides en el citosol mostraren un fenotip retardat com les FULL, o entremig Col-0 i les línies FULL.

En resum, el resultat de l'anàlisi de la floració de les diferents línies sobreexpressores del SAE2 suggereixen que l'acumulació del SAE2 nuclear endarrereix la floració de la planta i que aquest procés podria estar regulat negativament per la localització citosòlica del SAE2.

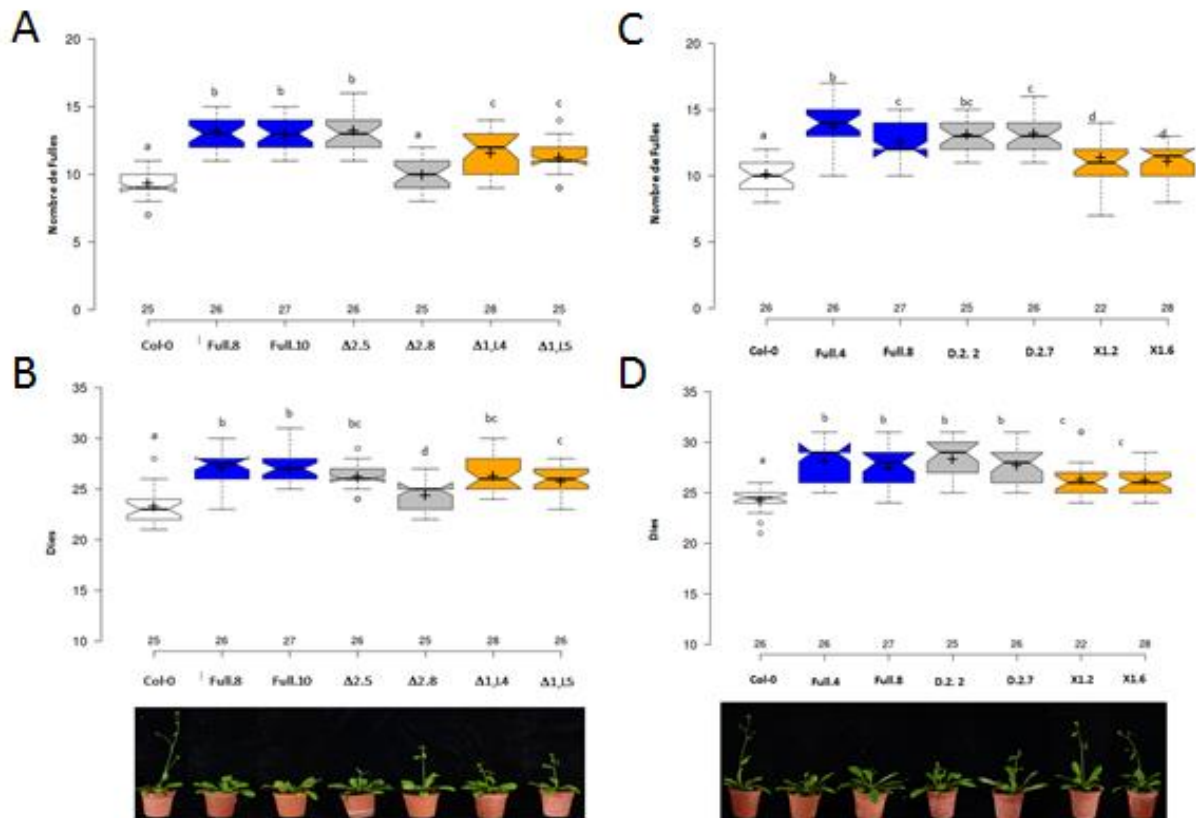


Figura 33. Anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió del SAE2 en el floració en les línies p35S::EYFP::SAE2. Anàlisi del nombre de fulles de la roseta (A) i el nombre de dies transcorreguts en el moment de la floració (B) de les plantes de les línies p35S::EYFP::SAE2 crescudes en condicions de dia llarg. Un total de 4 rèpliques biològiques van ser analitzades. Les línies centrals mostren les medianes; les creus mostren les mitjanes. Els límits de caixes indiquen els percentils 25 (Q1) i 75 (Q3) segons el que determina el programari R; Les marques es perllonguen 1,5 vegades el rang interquartil dels percentils 25 (Q1) i 75 (Q3), i els valors extrems estan representats per cercles. Les osques es defineixen com $\pm 1,58 * (Q3-Q1) / \sqrt{n}$ i representen l'interval de confiança del 95% per a cada mediana. Les osques que no es solapen donen un 95% de confiança que les dos medianes són diferents, (Chambers et al., 1983). n = 66, 72, 81... correspon al total d'individus analitzats en les diferents línies. Els grups amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

5. Anàlisi de l'efecte de l'expressió de diferents variants del SAE2 en les respostes a estrès abiòtic.

Juntament amb la regulació de la floració (Murtas et al. 2003), la implicació de SUMO en respostes a estrès abiòtic (Kurepa et al. 2003) i la regulació de la senyalització de l'àcid abscísic (Lois et al. 2003) van ser els primers processos biològics en els que es va identificar el paper fonamental de la conjugació de SUMO en plantes.

5.1. Anàlisi de la germinació de les llavors de plantes sobreexpressores del SAE2 en presència d'àcid abscísic.

L'àcid abscísic (ABA) és una fitohormona que regula nombrosos processos biològics entre els que s'inclouen el desenvolupament vegetal i l'adaptació a l'estrès ambiental (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006; Hirayama & Shinozaki 2007). L'ABA s'acumula en els teixits embrionaris durant el desenvolupament de la llavor i regula l'emmagatzematge dels productes de reserva així com facilita la iniciació i manteniment de la seva dormància (Nakabayashi et al. 2012). Durant el desenvolupament de la llavor, l'ABA impedeix la germinació prematura, abans que els embrions completin el seu desenvolupament i siguin viables des d'un punt de vista fisiològic. A més l'ABA millora la tolerància a la dessecació de les llavors mitjançant l'expressió de gens que codifiquen efectors que proporcionen protecció híper-osmòtica quan els embrions es deshidraten en les etapes de maduració posteriors (Lopez-Molina et al. 2003; Miura et al. 2009). En els primers moments de germinació, l'aparició de condicions ambientals adverses, com el dèficit d'aigua, inhibeixen el creixement a través de la síntesi d'ABA, la qual cosa garanteix la supervivència i l'establiment de les plàntules en condicions ambientals favorables (Lopez-Molina et al. 2003; Miura et al. 2009).

La inhibició negativa de la senyalització d'ABA va ser una de les primeres funcions biològiques de SUMO que es van identificar en plantes (Lois et al., 2003). Posteriorment, es va descriure que la modificació de ABI5 amb SUMO facilitava aquesta inhibició de la senyalització d'ABA (Miura et al. 2009).

Tenint en compte que la SUMOilació atenua la inhibició de la germinació modulant la senyalització de l'ABA i que el processament del SAE2 es dona durant el desenvolupament de la llavor (**Figura 10**), es va analitzar si les llavors produïdes per les

plantes sobreexpressores de diferents variants del SAE2 presentaven alterada la sensibilitat a l'ABA en experiments de germinació.

L'aplicació de l'ABA durant l'estratificació de les llavors va donar com a resultat diferents respostes d'inhibició a la germinació en les plantes sobreexpressores del SAE2 (**Figura 34**). Quan es van comparar les diferents línies generades amb el promotor 35S, es va observar que la sobreexpressió de la forma nativa (FULL) conferia una petita hipersensibilitat a l'ABA en comparació amb Col-0. Aquesta hipersensibilitat estava significativament accentuada en les línies que expressaven les formes del SAE2 enriquides en el citosol, $\Delta 1,L$ i la $\Delta 1,2,L$. Sorprenentment, les línies que expressaven la forma processada $\Delta 2$ presentaven una sensibilitat significativament menor a la presència d'ABA durant la germinació respecte a les línies sobre-expressores de la forma nadiua del SAE2 (línies FULL) i Col-0 (**Figura 34A**).

En el cas de línies que expressen el SAE2 sota el promotor pSAE2, totes les línies transgèniques, independentment de la variant del SAE2 que expressessin, mostraren una sensibilitat major a la presència d'ABA durant la germinació en comparació amb el control Col-0 i aquesta sensibilitat també estava augmentada en les línies que expressaven les formes del SAE2 enriquides en el citosol, $\Delta 2$, $\Delta 1,L$ i la $\Delta 1,2,L$, presentant una sensibilitat a l'ABA significativament major respecte a les línies FULL (**Figura 34B**).

De manera general, els resultats obtinguts suggereixen que l'augment de la conjugació de SUMO citosòlica facilitada per l'enriquiment SAE2 al citosol, confereix hipersensibilitat a ABA durant la germinació.

Per una altra banda, aquesta regulació pot dependre de la part de la llavor on s'expressa el SAE2, tal i com suggereixen els resultats oposats obtinguts entre les línies generades amb el promotor 35S respecte a les generades amb el pSAE2.

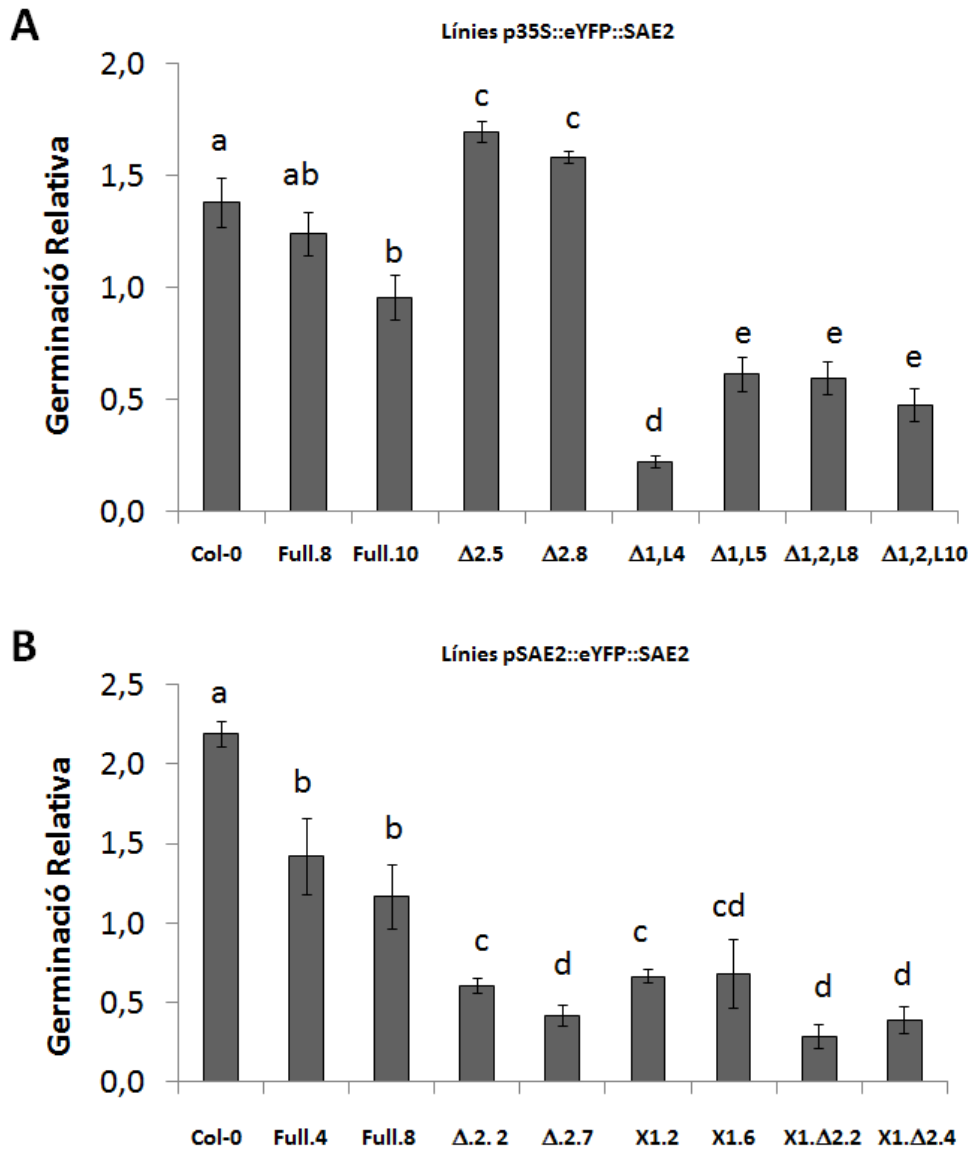


Figura 34. L'expressió de les diferents formes del SAE2 afecta a la germinació en presència d'àcid abscísic (ABA). Les llavors esterilitzades de les diferents línies transgèniques van ser sembrades (30-40 llavors per línia) en plaques amb medi Murashige i Skoog (0.5x) suplementades amb vitamines i amb una concentració d'àcid abscísic d'1 μ M. Les llavors es van estratificar en la foscor durant 3 dies a 4 $^{\circ}$ C per trencar la dormància. Es van analitzar un total de N=5 rèpliques biològiques independents que presentaren un germinació mitja del 35-65%. La germinació relativa es va calcular a partir de la relació entre els percentatges de germinació, quantificats a partir del conteig del nombre de plàntules establertes amb cotiledons oberts, respecte a la germinació mitja de la placa, a 7 dies de creixement en condicions de dia llarg i a 22 $^{\circ}$ C. **A.** Germinació relativa de les diferents línies sobre-expressores del SAE2 sota el promotor constitutiu (p35S). **B.** Germinació relativa de les diferents línies sobre-expressores del SAE2 sota el promotor endogen (pSAE2). Es representa la mitjana i les barres d'error estàndard. Els grups amb les mateixes lletres no presenten diferències significatives quan s'aplica un t-test ($p < 0.05$).

5.2. Anàlisi de la germinació en condicions d'estrès salí en les plantes sobreexpressores de les variants de SAE2.

En *Arabidopsis*, la conjugació de SUMO 1 i 2 augmenta davant diferents tipus d'estrès ambiental, entre els que s'inclouen l'estrès a la calor, el fred, la sequera i la salinitat (Kurepa et al. 2003; Catala et al. 2007; Miura et al. 2007; Conti et al. 2008). Més concretament i pel que fa a la salinitat, aquest increment de conjugació correlaciona amb la inhibició del creixement de les plàntules d'*Arabidopsis*. Així, la hiper-acumulació de conjugats de SUMO en els dobles mutants de les proteases *ots1ots2* fa que aquestes plàntules mutants mostrin una sensibilitat a la salinitat elevada, mentre que les plantes sobre-expressores d'aquestes proteases mostren una major resistència (Conti et al. 2008).

En aquest context es va avaluar la possible implicació del processament del SAE2 i la conjugació citosòlica en la resposta de la germinació davant d'un estrès salí mitjançant l'anàlisi de la germinació en condicions d'estrès salí en les plantes sobreexpressores de diferents variants del SAE2.

Quan es van comparar la resposta a l'estrès salí durant la germinació en les diferents línies generades amb el promotor 35S, en primer lloc es va observar que les línies FULL presentaven una resistència significativament major a les condicions salines (**Figura 35**) respecte a la línia control (Col-0) i la resta de línies transgèniques. Mentre que la resta de línies transgèniques de les construccions $\Delta 2$, $\Delta 1L$ i $\Delta 1,2L$ a excepció de la línia $\Delta 2.5$, presentaren tant a 7 com a 10 dies, germinacions similars a la observada en la línia Col-0.

Pel que fa a la resposta a l'estrès salí durant la germinació en les diferents línies generades amb el promotor pSAE2, es va observar que les línies FULL presentaven una resistència significativament major a les condicions salines (**Figura 36**) de la mateixa manera que ocorre amb les línies FULL sota el promotor constitutiu 35S. Pel que fa a les línies $\Delta 2$ sota el promotor endogen, encara que presentaren una resistència major respecte a l'observada a Col-0, són significativament més sensibles que les línies FULL. Les línies X1 i X1D2 (construccions equivalents a les $\Delta 1,L$ i $\Delta 1,2,L$ de les línies 35S, figura construccions) presentaren una sensibilitat significativament més gran a l'estrès salí respecte a Col-0.

D'altra banda, quan es van analitzar la germinació en condicions salines de la línia sobre-expressora SUMO1 (la qual presenta una conjugació basal augmentada) i la línia SIZ1 (la qual presenta una conjugació basal disminuïda), en ambdós casos es va observar una major sensibilitat en comparació a la observada a Col-O. Aquest fet posa de manifest la complexitat la regulació per SUMOilació que pot modular processos antagònics **(Figures 35 i 36)**

En resum, tan les línies transgèniques que sobreexpressen la forma processada del SAE2 ($\Delta 2$) com les línies transgèniques que tenen afectada el senyal NLS1 i presenten una major conjugació basal en el compartiment subcel·lular citosòlic, mostren una major sensibilitat de la germinació en condicions d'estrés salí. Per tant, aquests resultats suggereixen que el processament del SAE2, la seva localització citosòlica i l'augment de la conjugació en aquest compartiment subcel·lular, inhibeix la tolerància a estrés salí conferida per la sobreexpressió de la forma nativa del SAE2.

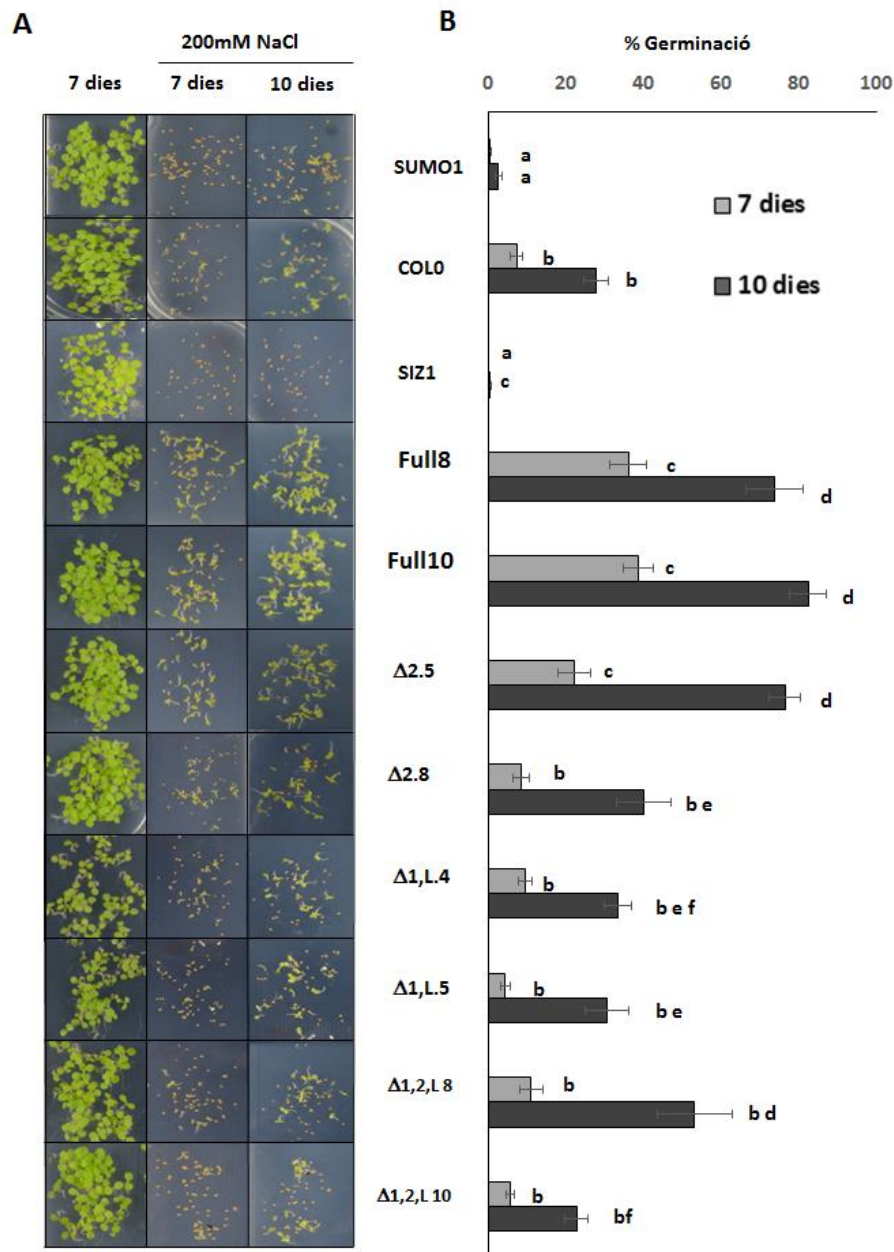


Figura 35. L'expressió de les diferents formes del SAE2 sota el promotor constitutiu 35S afecta a la germinació durant la resposta a estrès salí. Les llavors esterilitzades de les diferents línies transgèniques van ser sembrades (40-50 llavors per línia) en plaques amb medi Murashige i Skoog (0.5x) suplementades amb 200mM de NaCl. Les llavors de les diferents línies transgèniques sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S es van estratificar en la foscor durant 3 dies a 4°C per trencar la seva dormància. Un total de N=19 rèpliques independentes amb una germinació mitjana entre el 35-65 es van analitzar i la germinació es va calcular a partir dels percentatges de germinació quantificats a partir del conteig del nombre de plàntules amb cotiledons oberts a 7 i 10 dies de creixement en condicions de dia llarg i a 22°C. **A.** Imatges representatives dels experiments de germinació quantificats en (A). **B.** Percentatge de germinació de les diferents línies sobre-expressores del SAE2 sota el promotor constitutiu 35S. Es representa la mitjana i les barres d'error estàndard. Els grups amb les mateixes lletres indiquen que no existeixen diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

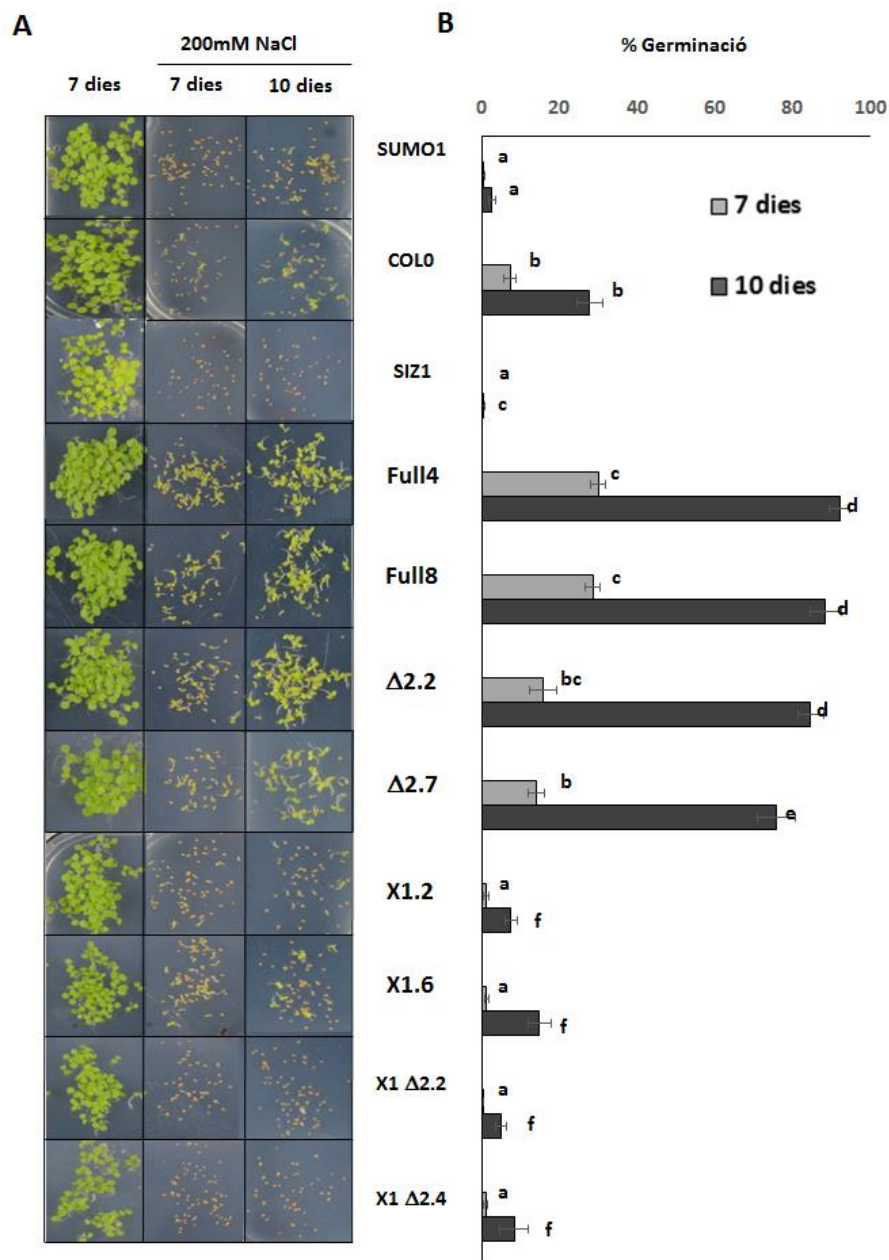


Figura 36. L'expressió de les diferents formes del SAE2 sota el promotor endogen (pSAE2) afecta a la germinació durant la resposta a estrès salí. Les llavors esterilitzades de les diferents línies transgèniques van ser sembrades (40-50 llavors per línia) en plaques amb medi Murashige i Skoog (0.5x) suplementades amb 200mM de NaCl. Les llavors de les diferents línies transgèniques sobreexpressores del SAE2 sota el promotor 35S es van estratificar en la foscor durant 3 dies a 4°C per trencar la seva dormància. Un total de N=19 rèpliques independentes amb una germinació mitja entre el 35-65 es van analitzar i la germinació es va calcular a partir dels percentatges de germinació quantificats a partir del conteig del nombre de plàntules amb cotiledons oberts a 7 i 10 dies de creixement en condicions de dia llarg i a 22°C. **A.** Imatges representatives dels experiments de germinació quantificats en (A). **B.** Percentatge de germinació de les diferents línies sobre-expressores del SAE2 sota el promotor constitutiu 35S. Es representa la mitjana i les barres d'error estàndard. Els grups amb les mateixes lletres indiquen que no existeixen diferències significatives quan s'aplica un T-test ($p < 0.05$).

CAPÍTOL 2. Noves perspectives en l'estudi de la SUMOilació i les seves implicacions biològiques

1. Anàlisi de la regulació circadiària de la maquinària de SUMOilació

Els fenotips fotomorfogènics descrits al capítol 1.4 (**Figura 30**) i el fet que l'elongació de l'hipocòtil es depenent del fotoperíode (Niwa et al. 2009) , ens va fer hipotetitzar sobre la possible regulació circadiària de la conjugació de SUMO. El rellotge circadiari és un mecanisme de cronometratge intern que controla diferents processos biològics essencials, així com permet anticipar els canvis ambientals que tenen lloc cada 24 hores (Dodd 2005). Encara que la majoria dels estudis se centren en el paper del rellotge en la regulació de la transcripció, diversos estudis indiquen que les modificacions postraduccional de les proteïnes també estan sota regulació circadiària. De fet, la ubiquitinació de proteïnes i la conseqüent degradació pel proteosoma 26S permet la regulació de l'acumulació diürna de diversos components bàsics de rellotge (Kiba et al. 2007).

En aquest context els resultats obtinguts de l'anàlisi fenotípic de de plàntules crescudes en condicions de LD,SD i fosc, mostren que l'acumulació de SAE2 en les plantes així com el seu processament, afecten al desenvolupament de fenotips fotomorfogènics amb regulació circadiària (**Figura 30**). En aquest sentit i en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Rossana Henriques, ens vam plantejar aprofundir en el coneixement de la possible regulació de la conjugació de SUMO mitjançant el rellotge circadiari. Més concretament es va estudiar la regulació circadiària de la SUMOilació centrant-nos a nivell transcripcional i postranscripcional.

Utilitzant la base de dades diürna (<http://diurnal.mocklerlab.org/about>) (Mockler et al. 2007) es va analitzar *in silico* els components de la via SUMO (**Figura 37**) que mostraren una la regulació transcripcional fotoperiòdica (dia curt, llarg dia) i/o circadiària (llum contínua durant 48h). Aquest enfocament ens va permetre identificar que els transcrits dels gens AtSUMO1, AtSUMO2 i SCE1 oscil·len al llarg del dia, tot i que el SCE1 era el que donava una oscil·lació més significativa.

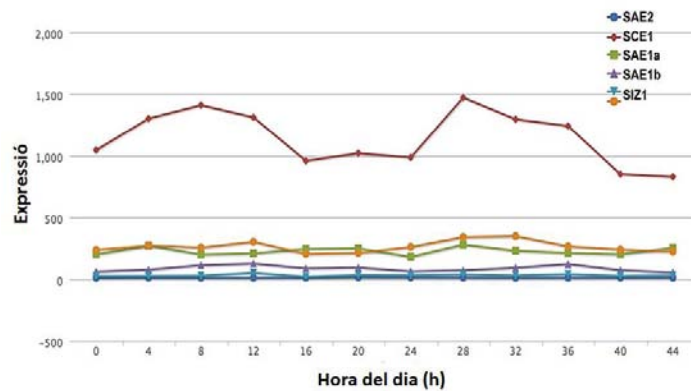


Figura 37. Anàlisi *in silico* de l'expressió de la maquinària de SUMOilació. Representació de les dades obtingudes la base de dades diürna (<http://diurnal.mocklerlab.org/about>) (Mockler et al, 2007) dels components de la maquinària de conjugació de SUMO que mostraren una la regulació transcripcional fotoperiòdica.

A continuació es va fer servir plàntules silvestres d'*Arabidopsis* (Col-0) crescudes en condicions de dia llarg (16h de llum) i es va confirmar el patró d'expressió rítmic de l'enzim conjugador SCE1 mitjançant una PCR quantitativa a temps real, en mostres recolectades cada 3h (**Figura 38**).

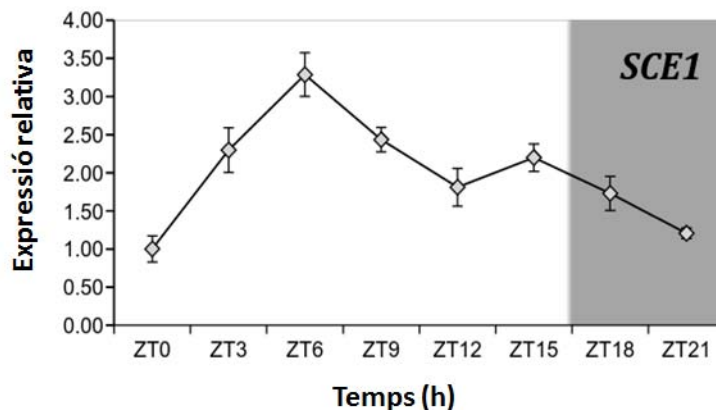


Figura 38. Patró d'expressió rítmic de l'enzim conjugador SCE1 . SCE1, l'enzim conjugador de SUMO, els nivells transcripcionals de l'enzim mostren un patró oscil·latori de l'expressió en condicions de dia llarg van ser avaluades mitjançant PCR quantitativa a temps real de mostres de plàntules Col-0 crescudes en condicions de dia llarg (LD) (16h de llum durant 20 dies. ZT (Zeitgeber time) són les hores de llum i fosc. Els rectangles blancs i grisos representen les hores de llum i fosc respectivament.

Finalment vam caracteritzar l'acumulació de proteïna en condicions de dia llarg i de dia curt dels diferents components de la maquinària de SUMOilació (**Figura 39**). Pel que fa l'enzim conjugador SCE1, l'acumulació de proteïna coincideix amb el patró transcripcional, observant-se la major acumulació de proteïna a 9h. Pel que fa a l'enzim activador SAE2, tot i no observar-se *in silico* un patró transcripcional regulat de forma circadiària ni haver-se analitzat mitjançant PCR quantitativa a temps real, s'observa un patró d'acumulació de proteïna similar a l'observat amb el conjugador. D'altra banda, tant el SUMO lliure com els conjugats, augmenten i disminueixen de forma similar a com ho fa el SCE1 i el SAE2.

En resum aquests resultats tot i ser preliminars, suggereixen que els components de la maquinària de la SUMOilació podrien estar regulats mitjançant el rellotge circadiari a nivell transcripcional.

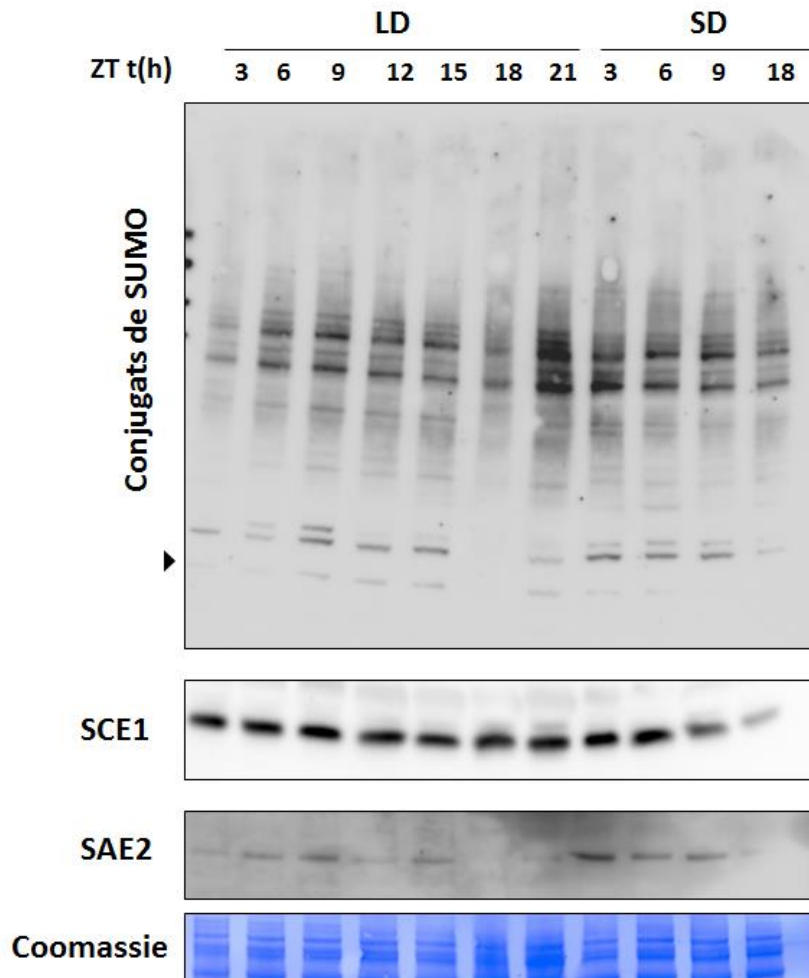


Figura 39. Anàlisi de la maquinària de SUMOilació de les plantes Col-O en condicions LD i SD.

A. Els extractes de proteïna de plàntules crescudes *in vitro* en condicions LD o SD durant 20 dies, en plaques de medi MS-05X sense sacarosa es van resoldre en un gel SDS-PAGE. Els conjugats de SUMO i el SUMO lliure (la fletxa marca la seva posició), l'enzim activador (SAE2), la proteïna recombinant eYFP::SAE2, i l'enzim conjugador (SCE1) es van analitzar mitjançant western-blot amb els anticossos corresponents. A la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, com a control de càrrega. Cada carril conté 18µg de proteïna.

2. El processament del SAE2 durant el desenvolupament de la flor

Com ja hem vist anteriorment, la floració està regulada per la SUMOilació (Son et al. 2014). A més s'ha descrit que els teixits florals presenten una elevada acumulació de conjugats de SUMO (Saracco et al. 2007) i els mutants en la E3 lligasa de SUMO SIZ1 presenten una disminució en la mida de la flor (Miura & Hasegawa 2010). Tanmateix, actualment encara no s'ha avaluat i caracteritzat la possible relació entre la SUMOilació i el desenvolupament de la flor.

Per tal d'abordar aquesta qüestió, en col·laboració amb el laboratori del Dr. Riechmann, es va analitzar l'acumulació dels diferents components de la maquinària de la SUMOilació i especialment la del SAE2. Més concretament, per tal de facilitar l'anàlisi proteòmic en les primeres fases del desenvolupament floral, vam fer servir un sistema d'inducció floral en *Arabidopsis*, que permet aïllar una gran quantitat de brots florals. Aquest sistema d'inducció del desenvolupament floral de forma sincronitzada, posat a punt al laboratori del Dr Riechmann i desenvolupat al laboratori del Dr. Meyerowitz, es basa en la utilització de plantes amb mutacions de pèrdua funció dels gens *APETALA1* (*AP1*) i la coliflor (*CAL*), que regulen l'inici de desenvolupament de la flor de forma redundat (Wellmer et al. 2006). Tenint en compte que la formació de flors en les plantes dobles mutants *ap1cal* està bloquejada temporalment, en el seu lloc, aquestes plantes presenten una proliferació massiva dels meristemes d'inflorescència, la qual cosa porta a un desenvolupament de tipus coliflor (**Figura 40, A**). D'altra banda, cal tenir en compte que el mutant *ap1 cal* amb el temps i de forma més tardana que les plantes silvestres, genera flors, però amb fenotip anormal que no presenten pètals ni sèpals (**Figura 40, C**). Atès que l'expressió ectòpica de *AP1* en les plantes de tipus silvestre provoca la transformació dels meristemes vegetatius en meristemes florals, el sistema d'inducció que vérem fer servir es basa en l'expressió d'una proteïna de fusió de *AP1* i el domini d'unió a hormones del receptor de glucocorticoides de rata (*GR*) sota la regulació del promotor constitutiu 35S i en un fons mutant *ap1 cal*. De manera que el tractament de l'35S: *AP1-GR ap1cal* de les inflorescències amb la dexametasona (hormona esteroide sintètica) activa l'expressió de la proteïna de fusió *AP1-GR* i dona lloc a una enorme formació de gemmes florals (**Figura 40, B**), mentre que les plantes control tractades amb un mock mostren cap resposta fenotípica (**Figura 40, A**).

Conseqüentment, l'activació de AP1-GR mitjançant el tractament amb dexametasona no únicament sincronitza el desenvolupament floral sinó que rescata la identitat floral que es troba defectuosa per la doble mutació *ap1 cal*.

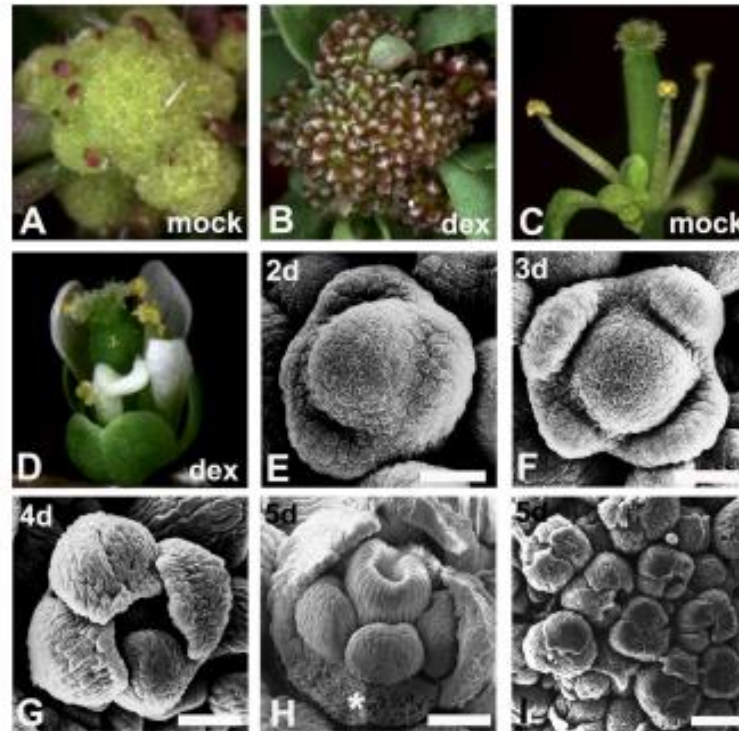


Figura 40. La inducció floral del doble mutant AP1-GR *ap1cal*. Si bé no s'observa resposta fenotípica al tractament (mock) en les plantes (A) AP1-GR *ap1 cal*, l'activació de AP1-GR en les inflorescències de les plantes AP1 Cal per la dexametasona (dex) donar lloc a una inducció floral massiva de primordis (B). Flors fèrtils del 35S: AP1-GR AP1 cal plantes de 4 setmanes després de tractament amb una solució simulada (C) i 13 dies després d'un sol tractament amb dexametasona (D). L'activació d'AP1-GR restaura els defectes d'identitat floral del doble mutant *ap1 cal*. (E-I) Imatges de microscòpia electrònica d'escombratge de les gemmes florals de 35S: AP1-GR *ap1 cal* en temps diferents punts (com s'indica) després d'un sol tractament amb dexametasona. En (H), una asterisc indica la posició d'un sèpal que es va retirar per a una millor visibilitat dels òrgans verticil intern. Barres d'escala: 20 μ m de (E-H) i 100 μ m en (I). **Figura modificada de (Wellmer et al. 2006).**

Amb l'objectiu de recol·lectar teixit del meristemes florals homogenis i sincronitzats (**Figura 40, I**) des d'un punt de vista del seu desenvolupament, plantes mutants 35S: AP1-GR *ap1cal* de 4 setmanes d'edat, es van tractar amb dexametasona i es va recol·lectar material a diferents punts (aparença dels meristemes, **figura 40 E-H**). A continuació es va analitzar l'acumulació de conjugats així com de les proteïnes SAE2 i SCE1 (**Figura 41**). En primer lloc es va observar que els diferents dies analitzats son lleugerament diferents des d'un punta de vista de la quantitat de conjugats presents. Tanmateix i el més sorprenent, va ser observar el fet que el SAE2 es trobava processat en totes les mostres analitzades. A dia 2, el processament del SAE2 era pràcticament complet, mentre que la resta de dies, es va trobar el SAE2 en les seves dues formes (nadiua i processada). Aquests resultats suggereixen que el processament del SAE2 no únicament ocorre en el desenvolupament de la llavor sinó que també es pot donar durant el desenvolupament inicial de la flor.

Figura 41. Anàlisi de la maquinària de sumoilació de les plantes mutants AP1-GR *ap1cal* induïdes. Els extractes de proteïna dels meristemes florals de plantes crescudes en condicions de dia llarg, es van resoldre en un gel SDS-PAGE. Els conjugats de SUMO, l'enzim activador (SAE2), la proteïna recombinant eYFP::SAE2 (la fletxa marca la seva posició), i l'enzim conjugador (SCE1) es van analitzar mitjançant western-blot amb els anticossos corresponents. A la part inferior es mostra la tinció en Coomassie de la membrana, com a control de càrrega. Cada carril conté 18µg de proteïna. La fletxa indica la forma no processada del SAE2.



3. Caracterització funcional de la SUMOilació en les respostes de defensa a patògens necròtrofs

L'estudi dels mecanismes de modificació post-traduccionals com són la fosforilació, la ubiquitinació, la nitrosilació i glicosilació, així com la sumoilació han rebel·lat la seva importància i implicació en les respostes de defensa de les plantes envers a patògens. (Stulemeijer & Joosten 2008; Lois 2010). En concret, patògens d'origen bacterià i viral alteren la homeostasi de la conjugació de SUMO de la planta, o exploten la maquinària de conjugació, com a mecanisme de patogenicitat (Hotson & Mudgett 2004a; Beth Mudgett 2005).

A pesar de la seva rellevància en la agricultura, no s'havia descrit un possible paper de la SUMOilació en les respostes de les plantes enfront de patògens necròtrofs. Per explorar aquesta hipòtesi, es va fer servir eines desenvolupades en el laboratori per inhibir la SUMOilació *in vivo* i que es basen en la disrupció de les interaccions entre l'enzim E1 i l'enzim E2 mitjançant l'expressió del domini SAE2^{UFDct}. (Castaño-Miquel et al., 2017). En aquest context, es van seleccionar diferents genotips d'*Arabidopsis* amb la SUMOilació alterada i es van infectar plantes de quatre setmanes amb dos patògens necròtrofs denominats *Botrytis cinerea* i *Plectosphaeraella cucumerina*. *B. cinerea* és un patògen transmès per l'aire i pot arribar a infectar a més de 200 espècies (Dean et al. 2012) mentre que *P. cucumerina* és un patògen es transmet per terra i ataca principalment a espècies vegetals de la família de les cucurbitàcies (cogombre, meló, carabassa) (Carlucci et al. 2012). La resistència a aquests patògens és genèticament complexa i multigènica. Pel que fa a les plantes seleccionades es van incloure les línies transgèniques sobreexpressores SUMO1-ox que presenten una SUMOilació augmentada, les línies transgèniques que presenten una disminució de la conjugació on s'inclouen les plantes sobre-expressores del SAE2^{UFDct} (línies #28 #1.4.1 #44) i les plantes *siz1-3*. El procés d'infecció va ser macroscòpicament analitzat i comparat amb el fenotip silvestre de les plantes Col-O. Les lesions provocades per *B. cinerea* van ser visibles com a punts petits i discrets a 2 dies post-infecció (dpi) en les línies amb la SUMOilació afectada (línies SAE2^{UFDct} i *siz1-3*), mentre que en les fulles de la línia amb la SUMOilació augmentada (SUMO1-ox), aquestes afectacions foliars aparegueren de forma més tardana a 3dpi (**Figura 42A**). Als 15 dpi, la majoria de les plantes *siz1-3* inoculades així

com les línies SAE2^{UFDct} #1 i #44 van morir, mentre que la majoria de les plantes Col-0, SUMO1-OX i la línia SAE2^{UFDct} #28 es mantingueren vives i per tant van sobreviure a la infecció en les condicions experimentals establertes (**Figura 42B**). Aquests resultats suggereixen que la SUMOilació es necessària per a la resistència a la infecció fúngica per *B.cinerea*.

De forma similar a la resposta observada en les diferents línies infectades amb *B. cinerea*, les plantes amb SUMOilació deficient mostraren una susceptibilitat accentuada a la infecció pel patogen *Plectosphaerella cucumerina* ja que mostraren necrosis en la majoria de les fulles a 7 dpi (**Figura 42C**) que es va expandir a través del pecíols fins al sistema vascular provocant una mortalitat major del 50% a 10 dpi (**Figura 42D**). Aquest fenotip difereix de la susceptibilitat mostrada per les línies Col-0 i SUMO1-ox, on la majoria de les plantes inoculades van sobreviure. Tanmateix s'observaren punts necrotròfics en la majoria de les fulles i necrosi en les fulles basals i (**Figura 42 D-E**). En aquest experiment, com a control positiu de la infecció fúngica, es va fer servir el mutant *agb1-1* (Llorente et al. 2005), el qual té afectada la subunitat β de la proteïna heterotrimèrica G i mostra una susceptibilitat augmentada a *P.cucmerina* com a conseqüència d'una desregulació de la composició de la paret cel·lular. Els símptomes macroscòpics de la infecció van ser associats a un increment de creixement fúngic en les plantes *siz1-3* o les plantes sobre-expressores SAE2^{UFDct}, com així s'observa a les tincions amb Trypan-blue (**Figura 42E**). Les fulles de les plantes que presenten una deficiència en SUMOilació i les plantes mutants *agb1-1* presentaren un major creixement fúngic de forma consistent amb la susceptibilitat observada (**Figura 42D-E**). Les plantes SUMO1-ox i les plantes Col-0 amb un perfil de conjugació de SUMO elevada i normal, respectivament, mostraren una susceptibilitat moderada, mentre que les línies SAE2^{UFDct} i les plantes muntants *siz1-3* amb una conjugació de SUMO reduïda mostraren una susceptibilitat elevada (**Figura 42D**).

A continuació i per tal d'aprofundir en el coneixement de la contribució de la SUMOilació a la resposta de defensa envers els fongs necrotròfics, es va analitzar les dinàmiques moleculars dels conjugats de SUMO i dos membres de la maquinària de SUMOilació, l'enzim activador de SUMO (SAE2) i l'enzim conjugador de SUMO (E2) durant la infecció de *P. cucumerina* en plantes Col-0. A 3 hores després de la infecció

(hpi), es va observar un augment transitori de la conjugació de SUMO. Després, gradualment es va produir una reducció de la conjugació de SUMO fins arribar a un 50% menys a les 48 hpi. Curiosament aquesta reducció dels conjugats de SUMO no va correlacionar amb l'acumulació de SUMO lliure (**Figura 43C**). Tanmateix, els nivells de SUMO lliure es van reduir a partir de les 3 hpi fins arribar a nivells indetectable a 48hpi (**Figura 43A-C**). De forma similar, el nivells de proteïna del SAE2 i el SCE1 van disminuir durant la infecció, encara que amb unes dinàmiques molt més suau. Els nivells de SCE1 van disminuir gradualment, mentre que el nivells de SAE2 es van mantindre fins les 24 hpi i després es van reduir a les 48 hpi (**Figura 43D-E**). L'anàlisi del ARNm del SUMO1, SAE2 i el SCE1 no revelaren fluctuacions que justifiquin la reducció dels nivells de proteïna (**Figura 43B**). Aquests resultats suggereixen que la reducció dels nivells de proteïna de SUMO, SAE2 i SCE1 en resposta a una infecció necrotròfica està controlada a nivells postranscripcional.

Els resultats obtinguts a partir de la infecció de plantes amb diferents graus d'alteració de la SUMOilació amb fongs necrotròfics (*B.cinerea* i *P.cucumerina*) mostren que els nivells de conjugació de SUMO es correlacionen negativament amb la progressió de la infecció (**Figura 43F**), la qual cosa suggereix que la SUMOilació es necessària per a l'activació de les respostes de defensa i resistència de la planta envers a patògens necrotròfics.

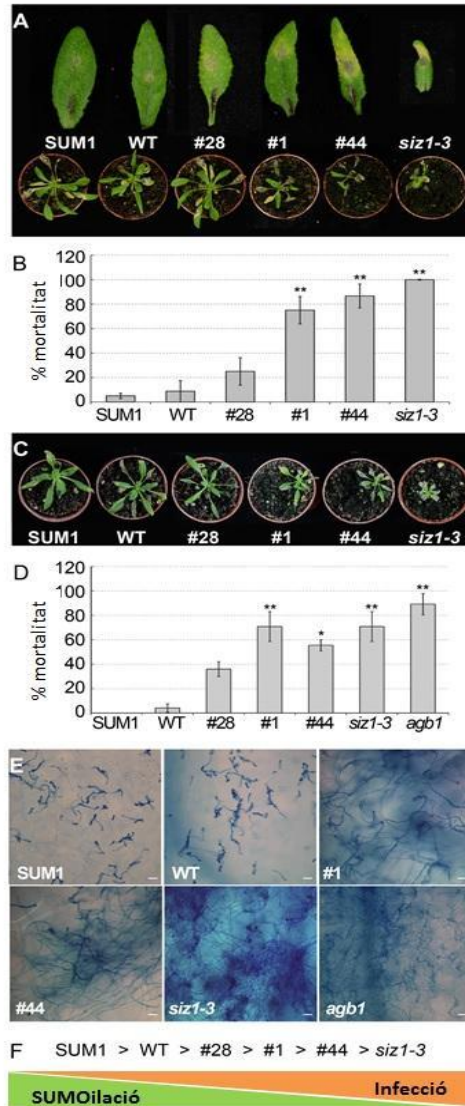


Figura 42. La SUMOilació es necessària per a la resistència a fongs. Susceptibilitat dels diferents genotips d'Arabidopsis amb una SUMOilació afectada a una infecció per *Botrytis cinerea* (A-B) i *Plectosphaerella cucumerina* (C-E). (A) Fulles representatives de plantes inoculades mitjançant spray amb (10^6 spores/ml) amb símptomes primerencs a 3 dpi i fenotip de les plantes a 7 dpi que van ser inoculades en 4 fulles per planta. (c) Percentatge de plantes mortes a 15 dies. Els valors promig i l'error estandard va ser calcular a partir de 5 rèpliques independents en les quals 8 plantes per fenotip van ser analitzades. (d) Fenotip de plantes representatives a 7 dies després de la inoculació mitjançant spray amb a 10^5 espores/ml. (e) Percentatge de plantes mortes a 10 dpi. Els valors promig i l'error estandard van ser calculats a partir de 3 rèpliques independents en les quals 8 plantes per genotip van ser analitzades. (f) Tinció amb trypan blue de les hifes de *Plectosphaerella cucumerina* en fulles de 3 dpi. Barra de l'escala, 20 μ m. (F) Esquema representatiu dels nivells de SUMOilació i la susceptibilitat a la infecció fúngica. L'asterisc denota les diferències significatives respecte a les plantes silvestres Col-0 (Test de Tukey * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

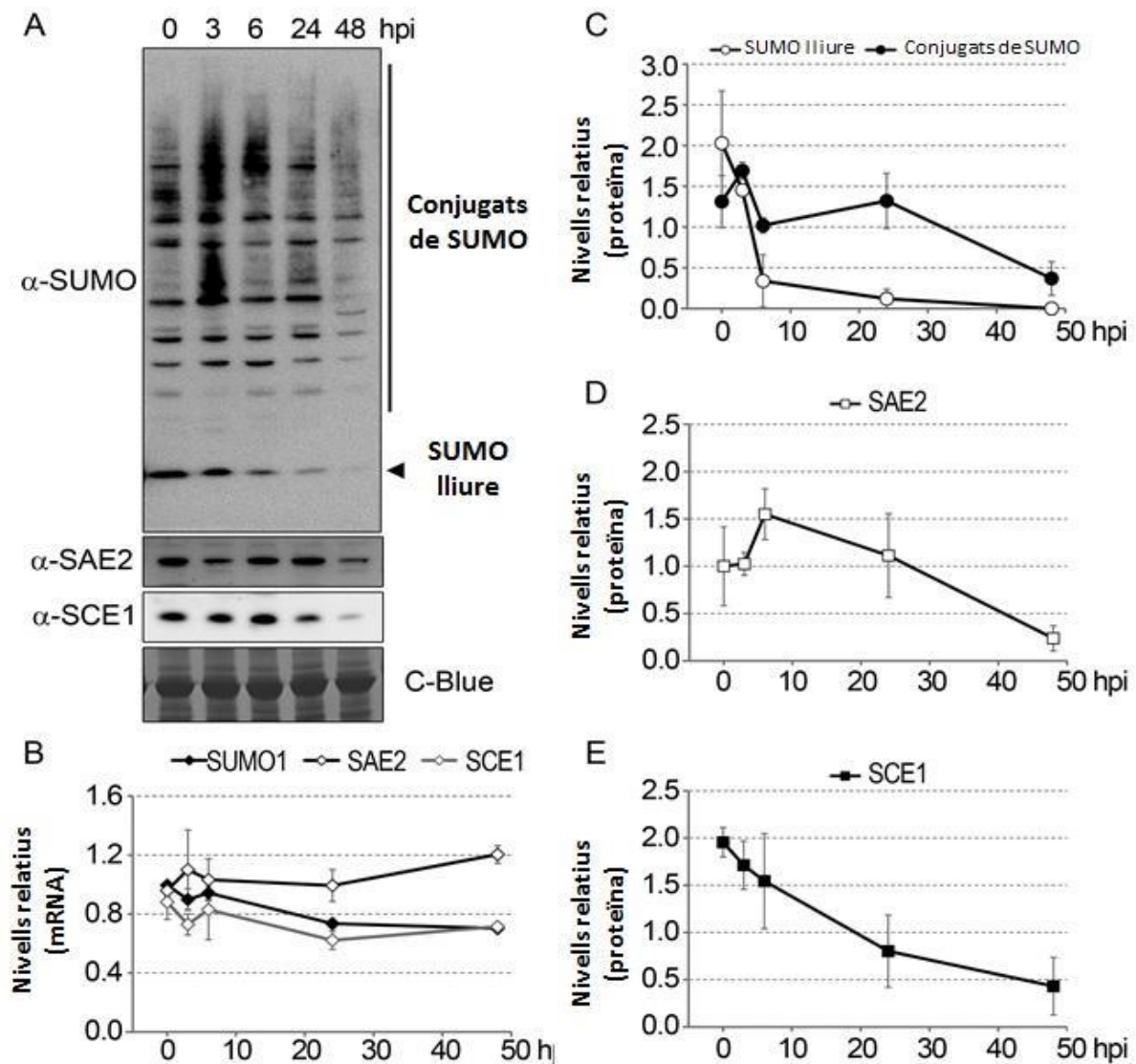


Figura 43. Els conjugats de SUMO i els nivells de proteïna dels components de la maquinària de SUMOilació del SAE2 i el SCE1 disminueixen durant la infecció fúngica. (a) Els extractes de proteïna total de plantes de 21 dies crescudes en condicions de dia neutre, abans de la infecció (0) o després de 3,6,24 i 48hpi (hores post-infecció) van ser resoltes en gel SDS-PAGE i examinades mitjançant un anàlisi immunoblot amb els anticossos anti-SUMO, nati-SAE2, anti-SCE1, anti-CAT3, anti-APX3. (b,c,d) Els nivells relatius de proteïna van ser quantificats fent servir dues rèpliques biològiques independents i els valors promig i l'error estandar va ser representat en els corresponents gràfics. (e) Els nivells de RNAm corresponent al SUMO1, a l'enzim activador de SUMO (SAE2) i l'enzim conjugador de SUMO (SCE1) van ser quantificats per les mateixes rèpliques biològiques que en (a). Les dades recollides es van normalitzar fent servir l'AtUBC21 com a gen de referència. Els valors promig i les barres d'error estandar corresponen a dos rèpliques.

DISCUSSIÓ

El processament del SAE2 com a mecanisme de regulació de la localització subcel·lular de l'enzim activador de SUMO E1 (SAE2/SAE1).

SUMO és un petit polipèptid que s'uneix covalentment als residus de lisina d'altres proteïnes diana de forma reversible. Com a modificador postraducciona, SUMO modula l'activitat de les proteïnes a través de la regulació de la localització subcel·lular, l'estabilitat i les interaccions proteïna-proteïna (Wilkinson & Henley 2012). La unió de SUMO està regulada per l'acció seqüencial de l'E1 o enzim activador de SUMO (SAE2), l'E2 o enzim conjugador (SCE1) i enzims E3 lligasa (Matic et al. 2010).

En les plantes, la SUMOilació modula processos biològics tan importants com el creixement, el desenvolupament i la floració. A més, la conjugació de SUMO juga un paper essencial en les respostes a estrès abiòtic com la deficiència de fosfat, les respostes a elevades i baixes temperatures, la sequera, així com les respostes a estrès biòtic com són les infeccions per fitopatògens (Park & Yun 2013).

Per tal que les modificacions per SUMO siguin efectives, el cicle de conjugació ha d'estar regulat. Aquesta modulació de conjugats/desconjugats de SUMO es pot donar mitjançant la regulació de la transcripció dels components de la maquinària de SUMOilació (Nigam et al. 2008), la seva activitat (Bossis 2006 (Truong, Lee & Chen 2012), estabilitat (Elrouby et al. 2013; Elrouby 2014), mitjançant la desconjugació de SUMO (Yates et al. 2016) o bé mitjançant canvis en la seva localització subcel·lular (Truong, Lee, Li, et al. 2012).

A pesar de que la SUMOilació nuclear és quantitativament majoritària, la SUMOilació de substrats citosòlics també és rellevant. Tanmateix, encara està per determinar si la maquinària de SUMOilació és translocada al citosol per facilitar la conjugació dels substrats citosòlics i, en cas afirmatiu, quins són els mecanismes moleculars implicats. En *Arabidopsis*, l'enzim E1 (SAE2) presenta una localització principalment nuclear, com ocorre amb els seus ortòlegs en humans i llevat, la qual cosa és consistent amb l'enriquiment de substrats nuclears de SUMO identificats en diferents estudis (Miller et al. 2010; Miller & Vierstra 2011). La localització nuclear del SAE2 ve donada per una senyal de localització nuclear canònica localitzada en el domini C-

terminal, (Castaño-Miquel et al. 2013). Pel que fa a la regulació postraducciona del SAE2, resultats obtinguts prèviament al nostre grup van posar de manifest l'existència d'una nova modificació post-traducciona, no caracteritzada en cap estudi anterior, la qual afectava a la mobilitat relativa d'aquest enzim en els extractes de síliqua analitzats mitjançant western-blot. L'anàlisi de plantes transgèniques que expressaven el domini SAE2^{UFDct}, generades prèviament en el nostre laboratori, va revelar que aquesta modificació postraducciona afectava a al domini UFDct del SAE2 i que es donava de manera molt evident en el fruit d'*Arabidopsis*. La caracterització molecular d'aquesta modificació post-traducciona ens va permetre determinar que es tractava d'un processament proteolític dut a terme per una peptidasa fins ara no identificada. Aquest processament dona lloc a l'escissió dels últims vuit aminoàcids de l'extrem C-terminal del SAE2, els quals presenten un enriquiment en lisines. Durant el decurs d'aquesta tesi, aquest octapèptid ha estat caracteritzat com un senyal de localització nuclear, no canònica, denominada NLS2, tal i com posa de manifest la seva capacitat d'interaccionar amb importines i de facilitar la localització nuclear de la proteïna fluorescent EYFP. En el context de l'enzim SAE2, la NLS2 és necessària per tal que es doni una completa localització nuclear del SAE2. En conseqüència, el processament de la NLS2 del SAE2 contribueix a facilitar la seva localització citosòlica.

Entre els mecanismes de regulació del tràfic de proteïnes nucli-citoplasma fins ara coneguts trobem: les interaccions proteïna-proteïna, els canvis conformacionals que afecten l'exposició de NLSs o NESs (nuclear export signal), i la retenció citoplasmàtica mitjançant associació a la membrana i alliberament mitjançant proteòlisi (Meier & Somers 2011). En aquest context, el processament proteolític del senyal de localització NLS2 del SAE2, mitjançant una peptidasa fins ara no identificada, com a mecanisme de regulació de la localització citosòlica en cèl·lules eucariotes és un mecanisme completament nou.

En general, el grau de conservació que presenta un determinat mecanisme de regulació en espècies distants filogenèticament és indicador de la seva rellevància biològica. Aquest anàlisi filogenètic del domini SAE2^{Ct} va mostrar que ambdues regions bàsiques, corresponent al NLS1 com al NLS2, estan presents en totes les plantes terrestres, embriófits, amb una gran diferència en relació a la distància que les separa

present en plantes basals, briòfits, i les angiospermes, grup de plantes vasculars, traqueòfits, del que es disposava informació genètica. Aquesta seqüència aminoacídica connectora entre la NLS1 i la NLS2 (regió IV, figura), que es caracteritza per estar enriquida en aminoàcids àcids, va diversificar al llarg de l'evolució des d'una longitud de 10 aminoàcids en les plantes basals fins a una seqüència significativament més llarga en angiosperms (45 aminoàcids en monocotiledònies i a 41 aminoàcids en dicotiledònies). Probablement, aquest allargament ha implicat una transició funcional de senyal nuclear bipartit a dos senyals de localització nuclear monopartits i independents. Per una altra banda, la valina⁶¹⁷, essencial per a què es doni el processament en *Arabidopsis*, tot i estar present en briòfits com en *Amborella*, espècie basal de les angiospermes, únicament es troba conservada en espècies emparentades evolutivament amb *Arabidopsis*, la qual cosa obre l'interrogant sobre si aquest processament es dona principalment en la família de les brassicàcies o bé és un mecanisme antic en les angiospermes que s'ha pogut perdre o modificar per afavorir la especificitat entre les diferents espècies. Alternativament, podria ser que aquest processament mostrés certa tolerància respecte a la identitat i/o posició del lloc de tall entre espècies, i que la selectivitat estigues conferida per un altre determinant estructural encara per descobrir. Tampoc es pot descartar la presència d'errors de seqüència no verificats com a resultat de la baixa conservació present al llarg del domini SAE2^{Ct}. Estudis addicionals seran necessaris per acabar de determinar si aquest processament té lloc en totes les angiospermes i quins són els requeriments estructurals que el faciliten. Per una altra banda, tenint en compte l'enriquiment en aminoàcids àcids adjacents a hidrofòbics, aquesta regió IV podria presentar un domini d'interacció amb SUMO (SIM) (Kerscher 2007). Aquest motiu d'interacció amb SUMO podria facilitar la conjugació de lisines contigües de les regions III, IV i V del domini SAE2^{Ct}, afegint una nova funcionalitat a aquesta regió. L'allargament del domini SAE2^{Ct} podria haver estat afavorit en l'evolució de les angiospermes pel fet de generar una nova superfície susceptible de ser modificada postraduccionalment i consegüentment permetre una regulació més acurada d'aquest enzim essencial.

En humans, l'enzim activador de SUMO (HsSAE2) localitza predominantment en el nucli, tanmateix una petita fracció de la subunitat petita Aos1 està present en el citoplasma de cèl·lules HeLa (Pichler et al., 2002), però la presència de l'heterodímer, Aos1/Sae2, no ha estat descrita fins al moment. Les dues subunitats de l'enzim activador HsE1 presenten diferents senyals de localització nuclear consens (NLSs), encara que la NLS present en la subunitat gran (Uba2) és la única necessària per a la importació nuclear de l'heterodímer al nucli (Moutty et al. 2011). La regulació de la localització subcel·lular del HsSAE2 també sembla ser dependent de la unió de SUMO en el seu domini C-terminal, i aquesta modificació postraduccional seria necessària per a la seva retenció nuclear (Truong, Lee, Li, et al. 2012). A més, estudis proteòmics han identificat regions en el domini SAE2^{Ct} com a dianes de fosforilació (Matsuoka et al. 2007) i l'acetilació (Choudhary et al. 2009). En aquest context, no es pot descartar que la regulació de la localització subcel·lular del SAE2 d'*Arabidopsis* estigui regulada no únicament per el processament proteolític del SAE2 sinó que la fosforilació, l'acetilació i la SUMOilació del domini SAE2^{Ct} tinguin igualment un paper rellevant. De fet, resultats de espectrometria de masses obtinguts recentment en el nostre laboratori han permès identificar dos llocs d'unió de SUMO a aquest domini (Lisina 595 i la Lisina 619), de les quals la lisina 619 forma part de la NLS2 del SAE2. Molt probablement, la SUMOilació d'aquestes lisines estigui afavorida per la regió àcida conservada en la regió IV definida al domini SAE2^{Ct} (**figura**). Aquests resultats per tant, afegeixen una major complexitat en la regulació de la localització subcel·lular del SAE2, ja que de forma similar a humans, la SUMOilació del domini SAE2^{Ct} podria permetre la retenció a nucli del SAE2, o bé la SUMOilació de la NLS2 podria afectar a la interacció del SAE2 amb la importina α i, de forma similar al processament del SAE2, resultaria en un enriquiment de l'enzim en el compartiment citoplasmàtic.

El processament del SAE2 com a mecanisme de regulació de la SUMOilació citosòlica

Tot i que la SUMOilació ocorre predominantment en el nucli, també han sigut identificats conjugats de SUMO no nuclears (Miller & Vierstra 2011; López-Torrejón et al. 2013; Elrouby et al. 2013; Wasik & Filipek 2014; Elrouby 2015). En plantes i més concretament en *Arabidopsis thaliana*, l'avaluació del SUMOiloma a partir de la

identificació de substrats de SUMO mitjançant espectrometria de masses i cribatges de doble híbrid ha permès identificar la implicació de SUMO en un gran nombre d'activitats com per exemple: el transport i la senyalització cel·lular, el desenvolupament d'òrgans (flors, arrel, meristemes, llavor, fruit i embrió) , així com en un gran ventall de respostes en diferents condicions de creixement com la radiació, la llum, la temperatura, la calor, el fred i la congelació, l'estrès osmòtic, la sequera, i les respostes de defensa de la planta envers a patògens (Castro et al. 2012; Xu & Yang 2013; Elrouby 2015). Moltes d'aquestes activitats estan regulades per conjugats nuclears, tanmateix hi ha altres proteïnes que estan presents en altres compartiments cel·lulars com el citosol i el citoesquelet, la vacuola, els cloroplasts o la paret cel·lular (Miller et al. 2010; Miller & Vierstra 2011; Miller et al. 2013; Elrouby 2015).

En aquest context, tenint en compte que no s'ha identificat cap senyal d'exportació nuclear (NES) en la seqüència aminoacídica del SAE2 (Castaño-Miquel et al. 2013), ens va fer especular que el processament del SAE2 sigui un mecanisme mitjançant el qual permeti acumular aquest enzim al citosol per tal d'afavorir la conjugació citosòlica. Els resultats obtinguts durant la caracterització molecular de plantes sobreexpressores de diferents variants del SAE2 van mostrar que la presència i acumulació del SAE2 en el compartiment citosòlic afavoreix la conjugació en aquest compartiment subcel·lular, constituint un mecanisme de regulació de la conjugació citosòlica de SUMO fins ara no descrit. Concretament, l'anàlisi molecular de la maquinària de SUMOilació de les línies sobreexpressores de diferents variants del SAE2 que tenen afectada la seva localització subcel·lular com a conseqüència de delecions i/o mutagènesi dels senyals NLS1 i NLS2, tenen augmentada la conjugació citosòlica des d'un punt de vista qualitatiu i quantitatiu (apartat 3). Estudis adreçats a elucidar els mecanismes moleculars que faciliten aquest processament, i específicament quina activitat enzimàtica es la responsable, seran molt valuosos per ajudar a entendre l'avantatge evolutiva d'aquest mecanisme de regulació.

La rellevància biològica del processament del SAE2

La regulació de la maduració de la llavor mitjançant el processament del SAE2

L'estudi dels mecanismes genètics i moleculars que controlen la formació de la llavor és essencial des d'un punt de vista socioeconòmic, ja que és una dels determinants de la producció agronòmica. En aquest sentit, els avanços en el coneixement del desenvolupament de la llavor en espècies model com *Arabidopsis* són fonamentals per tal de millorar la producció d'espècies amb interès agronòmic (Becker et al. 2014)

Els treballs desenvolupats en aquesta tesi han permès caracteritzar la implicació d'un nou mecanisme de regulació de la formació i maduració de la llavor, el processament postraduccionnal del SAE2. Més concretament hem descrit que tot i que la SUMOilació regula la grandària de la llavor, el processament del SAE2 no sembla modular aquesta característica. Tanmateix, l'anàlisi de l'ultraestructura de les plantes FULL i $\Delta 2$ va revelar que la sobreexpressió del SAE2 durant la maduració de la llavor produeix alteracions en la morfologia i densitat electrònica de les vacuoles de proteïnes de reserva (PSV), i que aquestes alteracions són més evidents en les plantes sobreexpressores de la variant de SAE2 $\Delta 2$ enriquida en el citosol. Aquesta modulació d'un procés citosòlic recolza el paper del processament del SAE2 en la modificació de substrats citosòlics. Des del punt de vista biològic, les alteracions observades de les PSVs podria afectar la germinació si tenim en compte que, durant la germinació, aquestes proteïnes són degradades per proporcionar nutrients per a l'embrió (Jiang et al. 2001). Calen per tant més estudis que analitzin com la conjugació citosòlica de SUMO pot modular la formació dels PSVs durant la maduració de la llavor.

La regulació de la germinació en condicions d'estrès salí

Les modificacions postraduccionals juguen un paper fonamental en les respostes a estrès de les plantes activant o desactivant diferents sensors o factors de transcripció que controlen l'expressió gènica. La ubiquitinació i la fosforilació són dos dels processos post-traduccionals millor estudiats controlant la senyalització de l'estrès. Tanmateix, en els últims anys s'ha descrit que la conjugació de SUMO sembla tenir igualment un paper fonamental en la resposta a l'estrès abiòtic (Elrouby & Coupland 2010; Miller et al. 2010;

Elrouby 2015). Més concretament i pel que fa a la implicació de la SUMOilació en les respostes a estrès salí, s'ha descrit que l'acumulació de conjugats de SUMO es correlaciona amb la sensibilitat del creixement de les plàntules d'*Arabidopsis* en condicions d'estrès salí (Augustine et al. 2009; Conti et al. 2009; Tomanov et al. 2014). Tanmateix, la manera en que la conjugació de SUMO afecta a la germinació de les plantes en condicions d'estrès salí no s'havia caracteritzat. En aquest sentit, l'anàlisi de la germinació de les diferents línies sobreexpressores del SAE2 ens ha permès determinar que l'acumulació del SAE2 nuclear en les llavors regula positivament la resistència a l'estrès salí mentre que el processament del SAE2 i la conjugació citosòlica regula negativament aquest procés. Concretament, les línies transgèniques que acumulen les variants defectives de la NLS1 i que presenten un augment qualitatiu i quantitatiu de la conjugació citosòlica, presenten una major sensibilitat a la germinació en condicions d'estrès salí. En definitiva el processament del SAE2 i la conjugació citosòlica de SUMO sembla tenir un paper important en la sensibilitat de la germinació de la llavor a les condicions salines i, probablement, es tracti d'un mecanisme de protecció de la llavor en condicions desfavorables.

La regulació del desenvolupament de l'arrel

La SUMOilació regula el desenvolupament de l'arrel. De fet els mutants de la lligasa *MMS21* en condicions normals presenten un escurçament de l'arrel i tenen desregulats l'expressió de marcadors que indiquen que *MMS21* regula el desenvolupament del meristem radicular mitjançant la regulació del cicle cel·lular i la senyalització de les citoquinines (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009).

En aquest context, la caracterització fenotípica de les diferents línies sobreexpressores del SAE2 ens va permetre determinar que l'acumulació del SAE2 nuclear en els teixits radiculars provoca un escurçament de l'arrel i que la localització citosòlica del SAE2 regularia negativament aquest procés, tot i que els resultats obtinguts presenten variabilitat depenent del promotor utilitzat en la generació de les plantes sobre-expressores del SAE2 i les seves variants. Si tenim en compte que l'enzim *MMS21* presenta una localització nuclear/citoplasmàtica és molt probable que la conjugació citosòlica estigui regulada per aquests dos enzims. Tanmateix encara queda

per demostrar si efectivament la lligasa MMS21 permet la conjugació en el compartiment citosòlic, així com descriure quins són els conjugats que podrien regular positiva i/o negativament l'escurçament de l'arrel.

La regulació de la fotomorfogènesi mitjançant el processament del SAE2

Entre els diferents pigments que promouen les respostes fotomorfogèniques en les plantes, els més importants són aquells que absorbeixen la llum del vermell i el blau. El fitocrom és la proteïna recptora encarregada d'absorbir la llum vermella i vermell llunyà, i en menor mesura el blau (Butler et al 1959). Pel que fa a l'absorció de llum blava, el criptocrom 1 (CRY 1) s'ha descrit com el fotoreceptor de llum blava i regula negativament el creixement de l'hipocòtil (Lin 2000). D'altra banda, s'ha descrit que COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1), una E3 lligasa de la ubiquitina, juga un paper central com a repressor de la fotomorfogènesi. En la foscor, COP1 s'acumula en el nucli i degrada reguladors positius de la fotomorfogènesi. En resposta a la llum, l'activitat de COP1 es redueix a través de diferents mecanismes que inclouen l'exclusió del nucli al citosol, la qual cosa permet un desenvolupament fotomorfogènic adequat (Seo et al. 2003; D. Xu et al. 2014; Lu et al. 2015; Xu et al. 2015; Lin et al. 2016). Uns altres reguladors negatius de la fotomorfogènesi són els PIFs (Pytochrome Interacting Factor), els quals són degradats o la seva activitat transcripcional es redueix com a conseqüència de la seva interacció amb les fitocroms, activant-se la fotomorfogènesi.

Estudis recents han descrit que SIZ1 regula negativament la fotomorfogènesi mitjançant la SUMOilació de COP1, afavorint la seva activitat lligasa d'ubiquitina i la conseqüent degradació de reguladors positius de la fotomorfogènesi. Curiosament, els nivells de SIZ1 també estan regulats per l'activitat E3 lligasa de COP1, establint-se un cicle regulador que facilitaria la regulació precisa dels nivells del COP1 (Lin et al. 2016), posant de manifest la importància d'aquest repressor central de la fotomorfogènesi. Un altre efector clau en la fotomorfogènesi que està regulat per la conjugació de SUMO és el fitocrom B, phyB. La SUMOilació de phyB regula negativament la senyalització en resposta a la llum mitjançant la inhibició de la interacció entre phyB i els PIFs (PHYTOCHROME-INTERACTING-FACTORS), el que resulta en l'estabilització dels PIFs i la conseqüent inhibició del programa fotomorfogènic (Sadanandom et al. 2015). Així doncs, la SUMOilació inhibeix la fotomorfogènesi a través de dos mecanismes

complementaris: l'activació de l'inhibidor COP1 i la repressió del modular positiu phyB. És remarcable que ambdós mecanismes impliquen el transport nucleo-citoplasmàtic dels factors regulats per SUMO. En presència de llum, el repressor COP1 és exclòs del nucli, mentre que el regulador positiu phyB és importat. Una possible regulació per SUMO d'aquestes translocacions entre nucli i citosol està per encara determinar.

Els resultats de l'anàlisi fotomorfogènic de les plàntules de les línies sobreexpressores del SAE2 enriquit en el nucli va revelar que aquestes plantes presentaven una hiposensibilitat a la llum en relació a l'elongació de l'hipocòtil, recolzant el paper de la SUMOilació com a regulador negatiu de la fotomorfogènesi. Sorprenentment, en condicions de dia llarg, aquesta atenuació estava revertida en plantes que expressaven la forma de SAE2 enriquida en el citosol, suggerint que la SUMOilació citosòlica facilitada pel processament del SAE2 podria actuar com un interruptor molecular durant la fotomorfogènesi. Considerant, les evidències sobre el paper de SUMO en aquest procés, es podria especular sobre una possible funció de la SUMOilació citosòlica afavorint la importació de phyB al nucli o retenint COP1 en el citosol.

En condicions de dia curt, les plantes sobre-expressores de SAE2 també mostren una marcada hiposensibilitat però, en aquest cas, les plantes que expressen les variants de SAE2 enriquides al citosol no presenten una atenuació de la hiposensibilitat. En aquest cas, a diferència dels resultats obtinguts en condicions de dia llarg, la potencial estimulació de la importació de phyB al nucli o retenció de COP1 en el citosol tindria un efecte menor que la inhibició conferida per la SUMOilació al nucli. Considerant que COP1 només és exportat del nucli en presència de llum, es podria especular que la taxa d'exclusió nuclear de COP1, en condicions de dia curt, no és significativa per observar l'efecte de la seva SUMOilació al citosol. En conjunt, aquest model sembla el més plausible tenint en compte que s'ha postulat que la SUMOilació no afectaria a la translocació de phyB al nucli ((Sadanandom et al., 2015).

D'altra banda, en plantes adultes, l'anàlisi fenotípic de la roseta de plantes sobreexpressores del SAE2 va revelar que l'acumulació del SAE2 nuclear dona lloc a l'elongació del pecíol i aquest procés també podria estar regulat negativament pel processament del SAE2 i la seva localització citosòlica. Aquests resultats es troben en

concordança amb els estudis que han descrit la SUMOilació com un mecanisme de regulació negativa de la fotomorfogènesis i la via de senyalització de la llum. A més, posen de manifest la rellevància del processament del SAE2 i de la conjugació citosòlica com a possible mecanisme de regulació dels efectes fisiològics de la conjugació nuclear més enllà de l'etapa de germinació i establiment de la plàntula.

La regulació circadiària de la SUMOilació

Els organismes es troben sotmesos a cicles diaris de llum i foscos i mostren un comportament rítmic associat a aquests canvis. Exemples d'aquests ritmes són els moviments de les fulles i els pètals, diferents patrons de creixement i la capacitat fotosintètica (HARMER 2009). Quan els organismes passen de cicles diaris de llum-fosc a fosc continu (o llum feble continu), molts d'aquests ritmes continuen tenint lloc, inclús durant dies. El període de ritme és d'unes 24h, pel que es denomina ritme circadiari. En els organismes, els ritmes circadiaris estan controlats per un oscil·lador intern acoblats a un gran nombre de processos fisiològics. Els ritmes generats pel rellotge circadiari poden diferenciar-se dels que es produeixen en resposta directa a les senyals de l'entorn, ja que els ritmes circadiaris persisteixen quan les plantes són transferides a condicions ambientals constants o a condicions de fosc o llum constants (de Montagu et al. 2010).

A hores d'ara no existeix cap estudi que hagi revelat una potencial regulació circadiària de la maquinària de SUMOilació. En aquest treball, hem descrit que almenys l'expressió del conjugador (SCE1) i l'acumulació de proteïna sembla tenir una regulació circadiària a nivell transcripcional. En aquest sentit seria interessant comprovar i analitzar a nivell d'expressió la resta de components de la maquinària de SUMOilació i aprofundir en els mecanismes de regulació circadiària a nivell transcripcional i postraduccional de la conjugació i les seves implicacions en el desenvolupament, l'estrès abiòtic i biòtic. A més, aquests resultats recolzen observacions prèvies que indiquen que els nivells de l'enzim E2 conjugador de SUMO està molt regulats *in vivo*, ja que augmentant o disminueixen en resposta a una reducció o increment de la capacitat de SUMOilació de la planta (Castano-Miquel et al., 2017; Saracco et al., 2007).

La regulació de la floració

Estudi previs van posar de manifest el paper rellevant de la SUMOilació en la regulació de la floració. Plantes d'*Arabidopsis* mutants amb un conjugació de SUMO disminuïda (mutants knockdown de SUMO, *siz-1*, *mms21*, mutants UFD) presenten una floració primerenca (Elrouby 2015; Castaño-Miquel et al. 2017). Més concretament i des d'un punt de vista molecular, la SUMOilació del factor de transcripció FLD (Flowering locus D) dependent de SIZ1, dóna lloc a la seva inactivació, la qual cosa afavoreix l'activació de FLC (Flowering locucs C) que és un repressor de la floració (Jin et al. 2008). A més, la SUMOilació de FLC dependent de la lligasa MMS21, regula positivament la seva funció i estabilitat (Son et al. 2014; Kwak et al. 2016).

En aquest context, l'anàlisi de la floració en les línies sobreexpressores del SAE2 va revelar que la que l'acumulació del SAE2 nuclear endarrereix la floració de la planta. Aquest fenotip no està clarament revertir per l'expressió de les formes de SAE2 enriquides al citosol, suggerint que els components implicats en la regulació de la floració per conjugació de SUMO són principalment nuclears.

Model proposat de regulació de la SUMOilació mitjançant el processament del SAE2 i les seves implicacions biològiques.

Com s'ha comentat a la introducció, la localització dels components de la maquinària de SUMO juguen un paper important en la regulació de la funció del sistema de SUMOilació . (Li & Hochstrasser 2003; Sydorsky et al. 2010; Truong, Lee, Li, et al. 2012; Wasik & Filipek 2014; Le et al. 2017). La gran majoria dels conjugats de SUMO presenten una localització nuclear, mentre que no tots els components de la maquinària de SUMO son nuclears (taula). Es per això que la redistribució subcel·lular dels enzims de la maquinària de SUMO podria jugar un paper molt important a l'hora de promoure la conjugació de SUMO en certs compartiments cel·lulars en resposta a determinats estímuls.

En aquest context i tenint en compte els resultats obtinguts en la caracterització del processament del SAE2 (apartat 1), les seves implicacions en la localització subcel·lular d'aquest enzim (apartat 2), així com els seus efectes en la conjugació

citòsòlica (apartat 3) i les seves implicacions biològiques (apartat 4 i 5), es proposa un nou model de regulació de la SUMOilació en plantes (**Figura 44**). En aquest sentit, el model representa com el processament del SAE2 mitjançant una peptidasa no identificada, permetria un enriquiment de l'enzim en el compartiment citosòlic i d'aquesta manera afavoriria la conjugació dels substrats presents al citosol. Pel que fa a les seves implicacions biològiques, la conjugació citosòlica regularia negativament processos relacionats amb la conjugació nuclear com la tolerància a estrés salí durant la germinació, la inhibició de la fotomorfogènesis i el creixement dels pecíols en plantes adultes. Aquest model estaria curiosament en concordança amb un model proposat recentment en cèl·lules cardíques on s'assenyala l'antagonisme entre la SUMOilació citosòlica i la nuclear, sent els processos extranuclears cardioprotectors i els nuclears, negatius per a la funció cardíaca (Le et al. 2017). En d'altres processos, hem observat que la SUMOilació citosòlica no modifica de manera clara les alteracions causades per la sobreexpressió de la versió del SAE2 enriquida al nucli, com són la mida de la llavor, desenvolupament de l'arrel o floració. I en d'altres, accentua les alteracions conferides per la sobreexpressió de la forma nuclear, com són la hipersensibilitat a ABA durant la germinació o les alteracions morfològiques de les vacuoles de proteïna de reserva. Estudis addicionals seran necessaris per elucidar els mecanismes moleculars responsables de la variabilitat observada.

En resum, els resultats obtinguts han permès identificar un nou mecanisme de regulació de la SUMOilació que no només afegeix una nova capa de regulació d'aquest procés essencial per les plantes, sinó que aporta un coneixement molt valuós per entendre com es modifiquen els substrats de SUMO citosòlics. El fet de que la maquinària de la SUMOilació estigui enriquida en el nucli va donar lloc a especulacions sobre la conjugació citosòlica que inclouen la translocació de l'enzim E2 conjugador carregat amb una molècula de SUMO al centre actiu des del nucli al citosol, o la possibilitat de que els substrats citosòlics es modifiquessin al porus nuclear. Les nostres dades indiquen l'existència d'un mecanisme que facilita la localització citosòlica de l'enzim E1 activador, que juntament amb l'enzim E2 conjugador, que té una distribució nucleocitosòlica, proveïrien de la maquinària bàsica per a que es conjuguessin els substrats citosòlics de manera eficient.

Els nostres resultats indiquen que aquest mecanisme de regulació podria haver aparegut durant l'aparició de plantes amb llavors (angiospermes) durant l'evolució. I és precisament la formació de llavor, l'etapa a on es va identificar el processament del SAE2 de manera inicial i a on és més evident. Per determinar si aquest mecanisme de regulació constitueix una avantatge evolutiva, seran necessaris nous estudis que analitzin la funcionalitat d'aquest domini del SAE2 en espècies distants evolutivament.

També serà necessari avançar el coneixement dels mecanismes moleculars que faciliten aquest processament, com la identificació de la proteasa responsable de la hidròlisi d'aquest octapèptid, que permetran desenvolupar noves eines genètiques, que complementaran les aproximacions proteòmiques i que facilitin un estudi més dirigit sobre les implicacions biològiques d'aquest mecanisme.

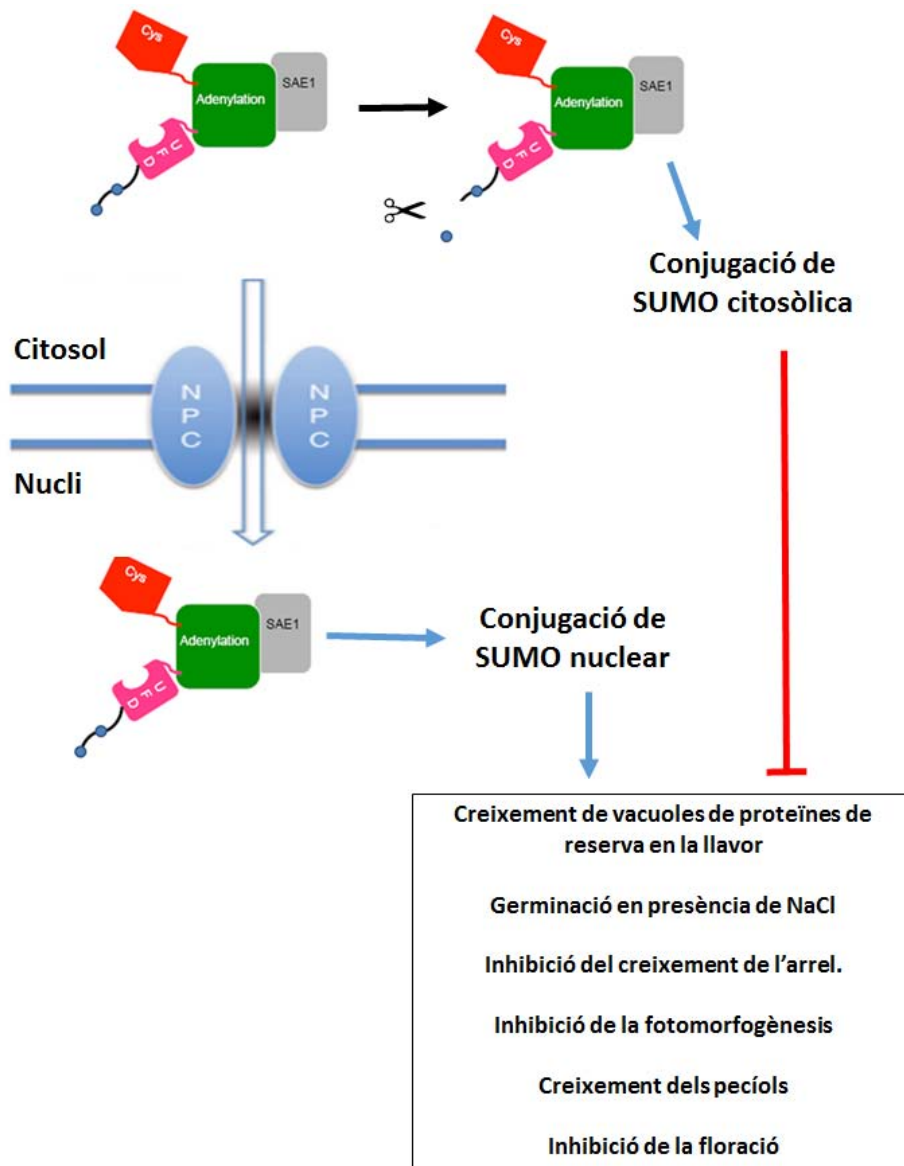


Figura 44. Model proposat del processament del SAE2 i les seves implicacions moleculars i biològiques. En gris es representa la subunitat del SAE1 i el SAE2 i els seus dominis es representen en diferents colors: en verd, el domini d'adenilació, en vermell, el domini catalàtic (Cys), en rosa, el domini UFD junt amb una cua C-terminal amb dos senyals de localització nuclear (cercles blaus). Les fletxes blaves indiquen activació, mentre que la línia vermella, inhibició. NPC (Complexe del porus nuclear). Figura modificada de (Truong, Lee, Li, et al. 2012).

L'expressió del domini SAE2^{UFD^{Ct}} com a eina molecular per a l'estudi de la SUMOilació

A partir del coneixement de les interaccions proteïna-proteïna entre els enzims que permeten la conjugació de SUMO, en els últims anys el nostre laboratori ha desenvolupat una nova estratègia per aconseguir la inhibició de la conjugació de SUMO *in vivo* que es basa en la disrupció de les interaccions entre el SAE2 i el SCE1 mitjançant la sobre-expressió del domini UFD^{Ct}. Tenint en compte que la SUMOilació es un procés essencial, la utilització de mutants nuls que tinguin els primers passos de la via de conjugació de SUMO afectats ha estat limitada degut a la letalitat d'aquestes mutacions durant el desenvolupament de la llavor. Conseqüentment, la utilització de mutants nuls ha estat reduïda i centrada en plantes que els manquen els enzims SIZ1 o MMS21, que són les úniques E3 ligases que han sigut descrites en *Arabidopsis*. Tanmateix, els mutants nuls *siz1* i *mms21* presenten defectes pleiotròpics en el desenvolupament significativament dramàtics (Ishida et al. 2009; Miura et al. 2010), la qual cosa pot generar dubtes des del punt de vista de les funcions biològiques que són caracteritzades fent servir aquests mutants. A més, la dependència del fenotip de *siz1* respecte a les condicions de creixement ha generat observacions contradictòries en el paper d'aquest enzim i la SUMOilació en les respostes a la sequera (Catala et al. 2007; Miura et al. 2013), la qual cosa accentua la necessitat d'utilitzar eines genètiques alternatives. Més concretament, l'estratègia que hem desenvolupat al nostre laboratori, ens ha permès generar plantes que no tenen compromesa la seva viabilitat i ens ha facilitat l'estudi de processos fisiològics al llarg d'un rang d'inhibició de la SUMOilació, permet l'estudi de respostes dosi-dependents. Ambdós aspectes, constitueixen dos avantatges interessants respecte a la utilització dels mutants nuls de *siz1* i *mms21* en l'estudi de la rellevància de la SUMOilació en les diferents processos fisiològics en els que participa.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, la utilització de plantes transgèniques que presenten inhibida de la SUMOilació mitjançant l'expressió del domini SAE2^{UFD^{Ct}} no únicament ens ha permès caracteritzar un nou paper de SUMO en les respostes de defensa de les plantes davant patògens fúngics necrotròfics (Castaño-Miquel et al. 2017) sinó que també ens ha ajudat a descriure una nova forma de

regulació de la maquinària de SUMOilació. Més concretament, ens va permetre identificar una nova modificació post-traduccionals del enzim activador E1 fins ara no descrita.

La SUMOilació es necessària per a la resistència davant patògens fúngics necrotròfics en plantes

En els últims anys, els mecanismes de modificació post-traduccionals han sigut descrits com a principals elements reguladors de les respostes de defensa envers a patògens en plantes. De fet, la fosforilació, la ubiquitinació, la SUMOilació, la nitrosilació i la glicosilació juguen un paper important en la immunitat de les plantes (Lee et al. 2007; Stulemeijer & Joosten 2008).

Tot i que en els estudis anteriors en el camp de la SUMOilació i les respostes a estrès biòtic, no s'havia investigat la susceptibilitat a fongs necrotròfics de plantes mutants de la maquinària de la SUMOilació. L'estudi de les plantes transgèniques que sobre-expressen el domini SAE2^{UFDct} va mostrar que aquestes plantes presentaven una sensibilitat augmentada als fongs necrotròfics. Sorprenentment, quan vam incloure en els assajos d'infecció les plantes mutants *siz1*, vam observar que aquestes també mostraren una sensibilitat significativa davant els patògens fúngics necrotròfics. Tanmateix hem de tindre en compte per exemple que la variabilitat en els respostes dels mutants *siz1* va ser observada prèviament en els estudis de tolerància a la sequera (Catala et al. 2007; Miura et al. 2013), la qual cosa remarca la necessitat de fer servir noves alternatives i aproximacions en l'estudi de la SUMOilació en plantes, com per exemple la nova estratègia que hem descrit.

D'altra banda, les respostes de defensa regulades per la via del àcid salicílic i associada amb la mort cel·lular programada, que permeten una defensa efectiva envers els patògens biotrófics, beneficia tanmateix als patògens necrotròfics. De fet, les plantes mutants *siz1* estan caracteritzades per acumular alts nivells de salicílic, la qual cosa augmenta l'expressió dels gens PR, els quals indueixen de forma constitutiva la resistència sistèmica adquirida (SAR) conferint una major residència a patògens bacterians com *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) (Lee et al. 2007; van den Burg et al. 2010). Per tant, en aquest sentit la susceptibilitat del mutant *siz1* als patògens

necrotròfics que hem observat seria consistent amb el fet que aquestes plantes acumulen àcid salicílic.

Per tal d'aprofundir en el coneixement del paper de la SUMOilació en la defensa de la planta envers a patògens, vam caracteritzar la dinàmica de la conjugació i l'acumulació dels diferents components de la maquinària de SUMOilació (el SAE2, el SCE1 i el SUMO lliure), durant els primeres 48h després de la infecció, quan encara no es van observar cap dany fisiològic de les plantes. Encara que els diferents components van mostrar dinàmiques diferents, a 48hpi, es va observar una disminució significativa dels diferents components del sistema de SUMOilació, que no va correlacionar amb els nivells de mRNA, la qual cosa suggereix la existència d'un mecanisme de regulació post-transcripcional. Tenint en compte que la inhibició de la SUMOilació resulta en una mort cel·lular (Miura et al. 2010), els resultats obtinguts estarien en concordança amb la hipòtesi de que els fongs necrotròfics podrien induir la degradació de la maquinària de SUMOilació com a mecanisme de patogenicitat. Entre els resultats que donarien suport a aquesta hipòtesi trobem el fet que certs efectors patogènics bacterians com XopD i AvrXv4 actuen com a proteases de SUMO (Hotson et al. 2003), els quals aconseguen pertorbar la homeòstasi de SUMO en les cèl·lules vegetals (Hotson et al. 2003; Roden et al. 2004) i afavorir la progressió de la infecció. A més, en les infeccions virals, les proteïnes essencials per la replicació viral AL1 i REP interaccionen amb el conjugador de SUMO (SCE1), alterant la capacitat de conjugació de SUMO en les cèl·lules vegetals (Castillo et al. 2004; Sánchez-Durán et al. 2011). D'altra banda també ha sigut caracteritzada la interacció entre el conjugador i NIb, la polimerasa RNA-dependent del potivirus (TuMV). De fet sembla que la SUMOilació d'aquesta polimerasa es necessària per l'acumulació i proliferació del virus (Xiong & Wang 2013). La manipulació de la maquinària de SUMOilació pels patògens es una estratègia també present en els virus animals i en bacteris (Beyer et al. 2015; Boggio et al. 2007; Vethantham & Manley 2009). Ara bé, l'existència d'estratègies similars durant la infecció de fongs en plantes encara queda per ser identificada i caracteritzada. En aquest sentit, calen més estudis que estudiïn i caracteritzin els mecanismes mitjançant els quals els fongs necrotròfics aconseguen disminuir els nivells de proteïna dels principals components del sistema de SUMOilació

CONCLUSIONS

1. El domini SAE2^{UFDct} es processat postraduccionalment durant la formació de les llavors d'*Arabidopsis thaliana* i afecta els últims 8 aminoàcids de l'extrem C-terminal.
2. La valina 617 contigua al lloc de tall és essencial per al processament del SAE2^{UFDct}.
3. El domini C-terminal del SAE2 conté un senyal de localització nuclear canònic denominat (NLS1)
4. L'octapèptid processat postraduccionalment del domini C-terminal del SAE2 es comporta com un senyal de localització nuclear i es denomina NLS2.
5. Tant el NLS1 com el NLS2 interaccionen amb el solc major de la importina α .
6. Tant el NLS1 com el NLS2 són suficients per localitzar el SAE2 en el compartiment nuclear.
7. El NLS2 és necessari per la completa localització nuclear del SAE2.
8. El processament del NLS2 permet a l'enzim localitzar tan al nucli com al citosol.
9. La localització citosòlica del SAE2 avaforeix la conjugació de SUMO en aquest compartiment cel·lular.
10. L'anàlisi filogenètic i de conservació del domini SAE2^{Ct} va revelar en primer lloc que tant el NLS1 i el NLS2 es troben conservats en angiospermes.
11. L'anàlisi fenotípic de les plantes sobreexpressores del SAE2 va mostrar la conjugació citosòlica podria estar regulant negativament processos relacionats amb la conjugació nuclear com el creixement de vacuoles de proteïnes de reserva en la llavor, la germinació en presència de NaCl, la inhibició de la fotomorfogènesis, el creixement dels pecíols, i probablement la inhibició de la floració
12. L'anàlisi de l'expressió de l'enzim conjugador SCE1 i l'acumulació de proteïna en plàntules d'*Arabidopsis* va revelar que presenta una regulació transcripcional circadiària que podria estar regulant la conjugació de SUMO durant el desenvolupament fotomorfogènic.
13. El processament del SAE2 sembla estar present durant l'inici del desenvolupament de la flor
14. La SUMOilació és necessària per a la resistència a fongs necròtrofs.
15. Els conjugats de SUMO i els nivells de proteïna dels components de la maquinària de SUMOilació disminueixen durant la infecció fúngica.

MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL BIOLÒGIC

1.1. Material bacterià

1.1.1. Soques bacterianes

En aquest treball s'han utilitzat les següents soques bacterianes:

-DH5 α : Soca d'*Escherichia coli* utilitzada per al clonatge de vectors.

-BL21 RIL: Soca d'*Escherichia coli* utilitzada per a l'expressió de proteïnes.

-C1C58: Soca d'*Agrobacterium tumefaciens* utilitzada per al clonatge de vectors binaris utilitzats per a la transformació de plantes.

1.1.2. Obtenció de cèl·lules competents per xoc tèrmic.

El protocol que es descriu a continuació es va utilitzar per obtenir les cèl·lules competents per xoc tèrmic d'*Escherichia coli*.

Primerament es van estriar les cèl·lules en un cultiu en placa per tal que les cèl·lules de partida siguin fresques i vigoroses. Posteriorment es van fer créixer en cultiu líquid.

Procediment:

1. Inocular una colònia aïllada de la soca utilitzada en 50 mL de medi LB.

2. Incubar en agitació (220 rpm) a 37°C durant tota la nit. 3.

Inocular 4 mL del cultiu anterior en 400 mL de medi LB.

4. Incubar en agitació (220 rpm) fins que la D.O.600 =0.375.

5. Refredar el cultiu en gel durant 10 minuts.

6. Centrifugar el cultiu 7 minuts a 1600xg a 4°C sense fre a la centrífuga.

7. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 80 mL de solució CaCl₂ freda.

8. Centrifugar 5 minuts a 1100xg a 4°C. 9. Descartar el sobrenedant i resuspendre

les cèl·lules en 80 mL de solució CaCl₂ freda.

Mantenir en gel durant 30 minuts.

10. Centrifugar 5 minuts a 1100xg a 4°C 11. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 16 mL de solució CaCl₂ freda.

12. Aliquotar les cèl·lules en fraccions de 100 µL en tubs eppendorf estèrils i congelar-les amb nitrogen líquid. Guardar-les a -80°C.

Solucions: - Solució CaCl₂ (autoclau): CaCl₂ 60 mM, 15% glicerol (v/v), 10mM PIPES [piperazine-N,N'- bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)] pH 7 (equilibrar amb HCl 1N).

1.1.3. Medis de cultiu bacterians

Els medis de cultiu bacterià es van preparar amb aigua. Els suplementes o antibiòtics requerits en cada ocasió es van afegir després d'atemperar el medi a 50°C. Aquests mateixos medis van ser utilitzats per al cultiu sòlid a placa de Petri, afegint agar al 1.5%.

- Medi LB pH 7.5 (autoclau): Bactotripton 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L i NaCl 5 g/L. Ajustar el pH amb NaOH. Per al medi sòlid s'afegeix 15 g/L.

- Medi 2xTY pH 7.5 (autoclau): Bactotripton 16 g/L, extracte de llevat 10 g/L i NaCl 5 g/L. Ajustar el pH amb NaOH.

1.1.4. Suplements dels medis de cultiu bacterians

Majoritàriament els suplements afegits són antibiòtics. A la taula es mostren els diferents suplements utilitzats, les concentracions de les solucions estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

| Antibiòtic | Estoc | Dissolvent | Concentració de treball | | |
|----------------------|-----------|------------------|-------------------------|---------------|-------------|
| | | | E.coli | A.tumefaciens | A. thaliana |
| Ampicil·lina (Amp) | 100 mg/ml | H ₂ O | 100 µg/ml | - | - |
| Carbenicil·lina (Cb) | 50 mg/ml | H ₂ O | 100 µg/ml | - | - |
| Kanamicina (Km) | 50 mg/ml | H ₂ O | 50 µg/ml | 50 µg/ml | 50 µg/ml |
| Rifampicina (Rf) | 50 mg/ml | DMSO | - | 100 µg/ml | - |
| Higromicina (Hyg) | 50 mg/ml | H ₂ O | - | - | 30 µg/ml |
| Cefotaxima (Cf) | 100mg/ml | H ₂ O | - | - | 100 µg/ml |
| BASTA/PPT | 20mg/ml | H ₂ O | - | - | 20 µg/ml |
| Espectinomicina | 40mg/ml | H ₂ O | 40 µg/ml | 40 µg/ml | |

Taula M1. Suplements de medis bacterians i de plantes.

1.1.5. Condicions de cultiu de bacteris

El cultiu líquid de cèl·lules d'E.coli es realitza a 37°C en agitació a 220 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 37°C. El cultiu líquid de cèl·lules d'A.tumefaciens es realitza a 28°C en agitació a 150 rpm. El cultiu sòlid es realitza en placa a 28°C. Els cultius o soques bacterianes s'emmagatzemen permanentment en glicerol 15% a -80°C.

1.2. Plasmidis

1.2.1. Vectors d'expressió en E.coli

- pWEN15 (Kost et al. 1998): Vector utilitzat per l'expressió transitòria de proteïnes fusionades a la proteïna fluorescent blava a l'extrem C-terminal en cèl·lules vegetals. Ampicilina^R.
- pWEN25: Vector utilitzat per l'expressió transitòria de proteïnes fusionades a la proteïna fluorescent groga a l'extrem C-terminal en cèl·lules vegetals. Ampicilina^R.
- pET28 (Novagen): Vector utilitzat per l'expressió de proteïnes heteròlogues a cèl·lules E.coli sota el control del promotor del fag T7. Kanamicina^R.
- pGEX. Vector usat per produir una proteïna d'intererés fusionada a la GST. Ampicilina^R.

1.2.1.1. Vectors d'expressió en plantes

- pB2GW7: Vector utilitzat per la transformació d'Agrobacterium que permet clonar el gen d'interès sota el control del promotor constitutiu 35S. Spectonomicina^R en bacteris i BASTAt en plantes.
- pH7m24gw,3. Vector utilitzat per la transformació d'Agrobacterium que permet clonar el gen d'interès sota el control del promotor endogen. Spectonomicina^R en bacteris i Hygromicina en plantes.

1.2.2. Construccions

| Tipus de vector | Vector de clonació | PROMOTOR | Fusió | Gen | Construcció | Insert | Nom |
|---|------------------------|------------------|-------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Vector d'expressió en E.coli | pGEX | Tac | GST | Kappa (AAA35090) | pGEX::Kapp60pΔ1BB | Asp72-Asn543 | Importina Kap α (M0) |
| | | | | | pGEX::Kapp60pΔ1BB_W195A/N/199A | Asp72-Asn543 | Importina Kap α (M1) |
| | pET28a | T7 | HIS | SAE2 (A12g21470) | pGEX::Kapp60pΔ1BB_W405A/N/409A | Asp72-Asn543 | Importina Kap α (M2) |
| | | | | | pET28a::ATSAE2 | SAE2 Met1-E625 | SAE2 (forma nativa) |
| | pET28a | FLAG+HIS | HIS | SAE2 (A12g21470) | pET28a::ATSAE2ΔNLS2 | Met1-Val617 | Δ2 (forma processada) |
| | | | | | pET28a-AtUFDct | Ser436-Glu625 | EYFP:UFDct |
| | | | | | pET28a-AtUFDct V617D | Ser436-Glu625 | UFDct V617D |
| | | | | | pET28a-AUFDct S618D | Ser436-Glu625 | UFDct S618A |
| | | | | | pET28a-flag:EYFP-Ct | Met543-Glu625 | EYFP-Ct |
| | | | | | pET28a-flag:EYFP-NLS1 | Pro579-Arg585 | EYFP-NLS1 |
| Vector de transformació transitoria en planta | pWen15 | p35S | ECFP | SAE1B (At5g50580) | pET28a-flag:EYFP-NLS2 | Ser618-Glu625 | EYFP-NLS2 |
| | | | | | pET28a-flag:EYFP | - | EYFP:EYFP |
| | pB2GW7 | p35S | EYFP | SAE2 (A12g21470) | Pwen15::sae1b | Met1-Leu320 | ECFP:SAE1B |
| | | | | | pWEN25-EYFP-Ct | Met543-Glu625 | EYFP:SAE2 ^{Ct} |
| | | | | | pWEN25-EYFP:UFD | Ser436-Met543 | EYFP:SAE ^{UFD} |
| | | | | | pWEN25-EYFP:UFDct | Ser436-Glu625 | EYFP:SAE2 ^{UFDct} |
| | | | | | pWEN25-EYFP-NLS1 | Pro579-Leu586 | EYFP-NLS1 |
| | | | | | pWEN25-EYFP-NLS2 | Ser618-Glu625 | EYFP-NLS1 |
| | | | | | pWEN25-SAE2 Δ NLS1 | SAE2 Δ5575-V617 | Δ1,L |
| | | | | | pWEN25-SAE2 Δ NLS1-2 | SAE2 Δ5575-E625 | Δ1,2,L |
| pWEN25-SAE2 Δ NLS2 | | | | | Met1-Val617 | Δ2 | |
| pWEN25-SAE2 Full | | | | | (SAE2) Met1-E625 | FULL | |
| pWEN25::SAE2 XnlS1 | | | | | SAE2 K582T K583G | X1 | |
| pWEN25::SAE2ΔInker | | | | | SAE2 Δ5587-V617 | Δ1 | |
| pWEN25::SAE2 XnlS1 ΔnlS2 | | | | | SAE2 Δ5575-E625 | X1Δ2 | |
| pB2GW7::eyfp-SAE2Full | | | | | Met1-E625 | FULL | |
| pB2GW7::eyfp-SAE2nlS2 | | | | | Met1-Val617 | Δ2 | |
| pB2GW7::eyfp-SAE2ΔNLS1,L | | | | | SAE2 Δ5575-V617 | Δ1,L | |
| pB2GW7::eyfp-SAE2ΔNLS1-2,L | | | | | SAE2 Δ5575-E625 | Δ1,2,L | |
| pSAE2::eyfp-SAE2 Full | | | | | pSAE2 (1500bp) | psAE2::eyfp-SAE2 Full | SAE2 Met1-E625 |
| | psAE2::eyfp-SAE2nlS2 | SAE2 Met1-Val617 | Δ2 | | | | |
| | psAE2::eyfp-SAE2 XnlS1 | SAE2 K582T K583G | X1 | | | | |
| pH7m24gw_3 | | | | psAE2::eyfp-SAE2XnlS1_ΔnlS2 | SAE2 K582T K583G | X1Δ2 | |

Taula M2. Construccions emprades en aquest treball.

1.2.3. Encebadors

| Nom | Seqüència | Direcció | Observacions |
|---------|---|----------------|---|
| XFP-Ntb | 5'-0-CAG-GGC-ACG-GGC-AGC-TTG-3' | Directa | Per comprovar les fusions en el N-terminal de la EYFP. |
| XFP-Ctb | 5'-TCC-GCC-CTG-AGC-AAA-GAC-C-3' | Complementària | Per comprovar les fusions en el C-terminal de la EYFP. |
| MZ104 | 5'-GGGATGACGCACAATCCCACTA-3' | Directa | Per comprovar la presència del promotor 35S |
| MZ107 | 5'-CGCAAGACCCGGCAACAGGATTC-3' | Complementària | Per comprovar la presència del terminador Tnos |
| BARrw | 5'-CACCATCGTCAACCACCTACATC-3' | Directa | Genotipació per al gen de resistència a l'herbicida BASTA |
| BARrw | 5'-TGTGCTCCAAGGACTTACAG-3' | Complementària | |
| LM1211 | 5'-GCTGGCCGATGGTTTCTAC-3' | Directa | Genotipació per al gen de resistència a l'herbicida Hlgromicina |
| LM1212 | 5'-GAATCCCGAATCGCCTC-3' | Complementària | |
| AM001 | 5'-GAAAATCCCATGATGGATAGCAAAAAGAAG-3' | Directa | Per realitzar la mutagènesi i aconseguir la construcció UFD-Ct Val617D |
| AM002 | 5'-CTTAGGGTACTACTATGCTTTTCTTC-3' | Complementària | |
| AM003 | 5'-GAAAATCCCATGATGGTGGCCAAAAGAAGATTAAGAG-3' | Directa | Per realitzar la mutagènesi i aconseguir la construcció ATSAE2 UFD-Ct Ser618D |
| AM004 | 5'-CTCTTATCTCTTTTGGCCACCATCATGGGATTTTC-3' | Complementària | |
| SMO20 | 5'-CTCCATTCTTAACGGAAAGC-3' | Directa | Seqüència interna de ATSAE2 |
| SM003 | 5'-TCAGGATCCGAGCCTGCTC-3' | Directa | Encebadors per realitzar PCR quantitativa de l'ATSAE2 |
| SM004 | 5'-TACTGGCTCGGCTTCAGAG-3' | Complementària | |
| SM005 | 5'-TGTGTGTGATATGTGATGTGTTAAGG-3' | Directa | Encebadors per realitzar PCR quantitativa de l'ATSUMO1 |
| SM006 | 5'-TCTGCAAAATCTCTAATGCCCAT-3' | Complementària | |
| SM009 | 5'-GCTGTGTGCTGTTAAGCTGAA-3' | Directa | Encebadors per realitzar PCR quantitativa de l'ATSC1 |
| SM010 | 5'-GCCACAAAACCATGAGATGA-3' | Complementària | |
| PR35FW | 5'-TAAAGTGGCCAAAATGATGC-3' | Directa | Encebadors per realitzar PCR quantitativa del gen control ATPR65 |
| PR35RW | 5'-GTTCTCCACAACCCGCTTGT-3' | Complementària | |
| UBC21FV | 5'-TCAAAATGGAACCGCTTGGGT-3' | Directa | Encebadors per realitzar PCR quantitativa del gen control l'AtUBC21 |
| UBC21RV | 5'-CACAGACTGAAGGCTCAAAG-3' | Complementària | |

Taula M3. Encebadors que s'han fet servir en aquest treball

1.3. Material vegetal

1.3.1. Ecotip Silvestre

En aquest treball s'han utilitzat plantes d'*Arabidopsis thaliana* de l'ecotip Columbia-0 (Col-0).

1.3.2. Línies transgèniques

- Plantes sobreexpressores de SUMO1: línia que sobreexpressa SUMO1 sota el promotor constitutiu 35S en un fons Col-0 (Lois et al. 2003).

- Plantes sobreexpressores SAE2^{UFDct}: Línies que sobreexpressen del domini UFD-Ct de la subunitat gran de l'enzim activador (AtSAE2) sota el control del promotor constitutiu 35S en un fons Col-0. (Castaño-Miquel et al. 2017).

- Plantes sobreexpressores de diferents variants del SAE2. Línies que sobreexpressen diferents variant del SAE2 sota el promotor endogen o sota el promotor 35S descrites a l'apartat (taula, apartat 3).

1.3.3. Línies mutants

- SALK_034008-*siz1-3* : Mutant d'inserció de T-DNA en la seqüència que codifica per a A la lligasa AtSIZ1 (Catala et al. 2007).

- *agb1-1*. Línia mutant que té afectada la subunitat β de la proteïna heterotrimèrica G i mostra una susceptibilitat augmentada a *P.cucmerina* com a conseqüència d'una desregulació de la composició de la paret cel·lular (Llorente et al. 2005).

- *shp1shp2*. Línia mutant que presenta llavors grans cedida pel laboratori de Lucia Colombo com a línia control per als anàlisis de la morfologia de la llavor (Liljegren et al. 2000).

1.3.4. Condicions de cultiu de plantes

Les plantes han estat cultivades en testos amb una barreja de torva 3:5, perlita 1:5 i vermiculita 1:5. Les plantes han estat cultivades en hivernacle o en cambres de cultiu controlades. Hivernacles: Les plantes van ser cultivades en condicions de dia llarg. Les condicions de cultiu han estat de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, una humitat ambiental del 49%. Les plantes han estat regades per inundació de les safates que contenen els testos, 3 cops per setmana.

1.3.5. Medis de cultiu de plantes

- Medi Murashige i Skoog (MS) ha segut l'utilitzat per créixer les plantes en plaques de Petri i en condicions estèrils. Composició MS pH 5.7 (0.5x): Murashige & Skoog (Duchefa). Vitamins 2.2 g/L, MES 0.5g/L. Ajustar el pH amb KOH. S'afegeix 8 g/L agar.

- Medi Gamborg B5 ha sigut l'utilitzat per créixer les plantes en cultiu líquid. Composició: B5: Gamborg B5 inclou vitamines B5 (Duchefa) 3.164 g/L, glucosa 20 g/L, MES 0.5g/L. Ajustar el pH amb KOH a 5.7.

1.3.6. Suplements dels medis de cultiu de plantes

Els suplement afegits als medis han estat antibiòtics i herbicides. A la taula M.1es mostren els diferents suplement utilitzats, les concentracions de les solucions d'estoc i el dissolvent en el que es preparen, i les concentracions de treball.

1.3.7. Condicions de cultiu *in vitro*

En condicions *in vitro*, les plantes van ser cultivades en cicles de dia llarg (LD), 16h de llum i 8h de foscor a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ o dia curt, en cicles de dia curt (SD), 8 hores de llum i 16h de foscor. En el cas que es duqués a terme un tractament de foscor, prèviament i un cop estratificades les llavors (48h en aigua, a 4°C) es realitza un tractament de 2h de llum per tal d'activar la germinació. En el cas del cultiu líquid els cultius van ser sotmesos a una agitació constant de 120 rpm.

2. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.1. Tècniques de biologia molecular dels àcids nucleics

2.1.1. Obtenció de DNA plasmídic

Minipreparació de DNA plasmídic. Es realitza amb el kit Miniprep de Promega, seguint les indicacions del fabricant.

2.1.2. Reaccions de modificació del DNA

Per a les reaccions de modificació de DNA realitzades, com ara la digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció, lligacions, desfosforilació d'extrems de DNA, etc. s'han utilitzat diferents enzims de restricció de DNA i lligases (Promega, Roche, NewEngland Biolabs), i s'han fet servir les condicions aconsellades pel fabricant en cada cas. És per això que en el present treball només es detallen aquelles que han estat de rellevant importància o bé si el protocol seguit suposa alguna modificació sobre l'original.

2.1.3. Transformació de cèl·lules competents d'E.coli per xoc tèrmic

La transformació de cèl·lules d'E.coli s'utilitza per amplificar DNA plasmídic o per l'expressió heteròloga de proteïnes dependent de la soca. Les cèl·lules competents, preparades segons es descriu a l'apartat 1.1.2

Es van transformar per xoc tèrmic segons el següent protocol.

Procediment:

1. Descongelar en gel el tub que conté una alíquota de cèl·lules competents.
2. Afegir 1-5 µl (10-20 ng) de DNA i barrejar suament.
3. Mantenir la barreja 30 minuts en gel. 4. Fer un xoc tèrmic 2 minuts a 42°C. 5.

Transferir el tub a gel durant 2 minuts.

6. Afegir 900 µl de medi LB fresc sense antibiòtics. Posar el tub en agitació a 220rpm a 37°C 1h.

7. Plaquejar diferents volums de la transformació en dues plaques de LB sòlid amb l'antibiòtic selectiu escaient.

8. Incubar els bacteris a 37°C O/N. Les colònies es seleccionen per PCR utilitzant encebadors específics.

2.1.4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Per tal d'amplificar fragments de DNA s'ha emprat el mètode de la reacció en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) (Saiki et al. 1988), fent servir oligonucleòtids específics i DNA plasmídic complementari (cDNA) o genòmic (segons el cas) com a substrat. La seva base teòrica es troba descrita en tots els manuals de biologia molecular. Per amplificar els fragments per PCR es van utilitzar enzims DNA polimerasa termoestable comercials. Es van utilitzar segons la seva disponibilitat, Pfu DNA Polymerase (Stratagene), Taq Polymerase (Promega) i Go Taq Polymerase (Promega). Totes elles es caracteritzen per tenir una baixa taxa d'error (HF, High Fidelity). Aquests enzims disposen dels seus propis tampons i es van utilitzar seguint les instruccions del fabricant. Els encebadors emprats per les PCR varen ser elaborats per Sigma-Aldrich. Les seves seqüències s'especifiquen a l'apartat 1.2.3.

2.1.4.1. Retrotranscripció

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per amplificar la primera cadena de cDNAs específics a partir de RNA total. En el nostre treball s'han emprat encebadors homòlegs a la seqüència d'interès. Per la síntesi de la primera cadena de cDNA s'ha utilitzat la M-MLV Reverse Transcriptase d'Invitrogen, enzim que permet la transcripció de fragments de RNA de fins a 7 Kb a partir de 1 ng-5 µg de RNA.

2.1.4.2. Amplificació per PCR

En cada cicle de PCR hi ha tres etapes que precisen temperatures diferents i es duen a terme en l'aparell de PCR o termociclador, el qual permet una transició molt ràpida entre una temperatura i una altra. Les tres etapes de cada cicle són:

1. Desnaturalització del DNA en presència dels oligonucleòtids encebadors. Es realitza a una temperatura alta, generalment 94°C, durant 30 segons.
2. Hibridació dels encebadors a les seqüències complementàries del DNA motlle a amplificar. Es realitza a la temperatura T_M de l'oligonucleòtid, que ve donada per la seqüència i la llargada d'aquest. Acostuma a estar compresa entre 45

i 65°C. El temps d'hibridació és d'uns 45 segons.

3. Un cop els encebadors s'han unit al DNA, actua la DNA polimerasa termoestable, sintetitzant les cadenes de DNA complementàries en direcció 5' a 3', amb activitat exonucleasa en direcció 3' a 5' proofreading per corregir els possibles errors en l'activitat anterior. Aquesta etapa es realitza a 72°C durant un temps que depèn de la mida del fragment a amplificar (aproximadament 1 minut per 1 kb de DNA).
4. En el cas de PCR de colònies, el DNA motlle de la PCR s'hi afegeix picant amb una punta la colònia i submergint la punta a la barreja de PCR. La comprovació dels fragments amplificats es realitza carregant una part del volum obtingut en un gel d'agarosa (apartat 2.1.4). Quan va ser necessari, els fragments obtinguts van ser clonats per posteriorment ser seqüenciats.

2.1.4.3. Separació de DNA en gels d'agarosa

Els productes de PCR o els fragments de DNA procedents de digestions s'han separat en gels d'agarosa/TAE amb agarosa 1% (p/v) i bromur d'etidi 0.05% (p/v), en TAE 1X, al costat d'un marcador de pes molecular adient per a la mida de banda esperada.

Solucions: - Tampó de càrrega 6X: glicerol 30% (v/v), xilencianol FF 0.25% (p/v), blau de bromofenol 0.25% (p/v), EDTA 0.5M pH 8. - Tampó TAE 10x: Tris acetat 0.4 M, EDTA 20 mM pH 8.

2.1.4.4. Seqüenciació del DNA

La determinació de les seqüències de DNA preparat ha estat realitzada pel Servei de Seqüenciació del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) mitjançant seqüenciació automàtica. La mitjana de lectura amb aquest mètode va ser de 600-700 pb. Les seqüències obtingudes han estat processades informàticament mitjançant programes bioinformàtics Vector NTI i programes gratuïts a Internet, com BLAST de l'NCBI, Fasta i Genedoc.

2.1.5. Purificació de fragments de DNA

El DNA va ser purificat seguint diferents protocols segons la seva procedència i la puresa final desitjada. A continuació es presenten els principals mètodes de purificació utilitzats.

2.1.6. Precipitació de DNA

Per la precipitació de fragments de DNA es va seguir el protocol de precipitació d'àcids nucleics per acetat de sodi (Sambrook, 2001).

Procediment:

1. Afegir 1 volum de fenol:cloroform, barrejar amb el vòrtex i centrifugar 5 min. a velocitat màxima. Recuperar la fase aquosa (superior).
2. Afegir 0.1 volums d'AcNa 3M pH 5.2, i 2.5 volums d'etanol absolut.
3. Barrejar i deixar 2-5 min. en gel.
4. Centrifugar 10 min. a velocitat màxima. Descartar el sobrenedant.
5. Afegir 250 µl d'etanol 70%. Centrifugar 5 min. a velocitat màxima i descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre l'àcid nucleic en 50 µl o el volum escaient d'aigua miliQ o tampó TE.

2.1.7. Mutagènesi dirigida per PCR

Mitjançant una reacció de PCR amb els oligonucleòtids adents i l'enzim DpnI (Promega) s'ha realitzat mutagènesi dirigida, seguint les especificacions del fabricant. L'enzim de restricció DpnI té la particularitat de tallar únicament llocs metilats, atacant exclusivament les cadenes parentals.

2.1.8. Obtenció de RNA total i PCR quantitativa.

L'ARN total dels teixits vegetals es va extreure utilitzant el Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega, Wisconsin, EUA) segons les instruccions del fabricant. El kit superíndex VILO (Invitrogen, Massachusetts, EUA) es va utilitzar per generar ADNc d'acord amb les instruccions del fabricant, usant 1,4 µg d'ARN total. L'abundància

relativa d'ARNm es va avaluar mitjançant PCR quantitativa a partir de la rtranscripció inversa (RT-qPCR) en un volum total de reacció de 20µl utilitzant LightCycler 480 SYBR Green I Màster (Roche, Basilea, Suïssa) en un LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland) amb 0,3µM de cadascun dels encebadors corresponents.

2.1.9. Quantificació d'àcids nucleics

La quantitat de DNA o de RNA present en una mostra es va estimar a partir de la mesura de l'absorbància a 260 nm. La puresa de les mostres d'àcids nucleics es va determinar calculant les relacions entre les absorbàncies a 260 nm i 280 nm. La relació entre aquestes dues absorbàncies indica la presència de proteïnes si dóna fora del rang de 1,7-2.

3. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PROTEÏNES

3.1. Obtenció d'extractes proteics de teixits vegetals.

Per a l'extracció de proteïnes es van utilitzar el següent mètode:

Procediment:

1. Triturar la mostra en nitrogen líquid.
2. Pesar la mostra.
3. Afegir 2µl de tampó d'extracció PE per mg de mostra.
4. Posar a la nòria 30 min a 4°C.
5. Centrifugar 20 min. A 4°C a màxima velocitat i recuperar el sobrenadant.
6. Mesurar la quantitat de proteïnes presents a la mostra mitjançant el mètode Bradford.
7. Congelar amb nitrogen líquid i conservar la mostra a -80°C.

Solucions:

- Tamó d'extracció PE: Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, Tritó X-100 0.2% (p/v) i inhibidors de proteases (PMSP (*phenylmethanesulphonylfluoride*) 1mM, Pepstatina 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, NEM (N-Etilmaleimida) 2mM, Iodoacetamida 10 mM).

3.2. Obtenció d'extractes proteics mitjançant fraccionament subcel·lular

L'obtenció d'extractes proteics del citosol i nucli d'arrels de plàntules d'Arabidopsis es va realitzar a partir de la modificació d'un mètode prèviament descrit (Calikowski & Meier 2006).

Procediment:

1. Les plàntules de les diferents línies analitzades són crescudes em Erlenmeyers de 250ml amb taps transpirables, en medi Gamborg pH 5.7. Més concretament es van créixer amb una agitació de 120 rpm, a la cambra *in vitro*, en conicions LD a una temperatura de 22°C durant 12 dies.
2. Un cop crescudes les plàntules es separen les arrels de les fulles.
3. Un total de 2 g d'arrels es tallen en presència de 8 ml d'etil èter i es renta amb el tampó d'extracció.

4. S'afegeix 4 ml de tampó d'extracció en un vas de precipitats de 15 l.
5. A continuació mitjançant un Polytron, s'homogenitza durant 10 minuts a una velocitat lenta de 0.4.
6. L'homogenitzat es filtra amb una membrana Miracloth (Millipore).
7. El filtrat es centrifuga durant 10 min x 1000g.
8. El sobrenedant constitueix la fracció citosòlica i el sediment la fracció nuclear amb altres membranes.
9. La Fracció nuclear es resuspen en uns 50µl de tampó d'Urea i es quantifica la quantitat de proteïnes.
10. La fracció citosòlica (500µl) i la fracció *input* (500 µl), es filtra i concentra amb un filtre de centrifuga Amico-Ultra 0.5ml 10K, durant 20min a màxima velocitat
11. A continuació a la fracció filtrada (aproximadament 50 µl) es renta afegint 450 µl de tampó d'Urea i es centrifuga 15 min a màxima velocitat.
12. Les fraccions filtrades (aproximadament 100 µl) són finalment quantificades per determinar el contingut de proteïna.

Solucions:

| Tampó d'extracció | Stock | Final |
|-------------------|---------|--------|
| KCl | 1M | 20mM |
| HEPES pH 7,4 | 0,5 | 20mM |
| Triton X-100 | 25% | 0,06% |
| Hexylen Glycol | 100% | 13,80% |
| Spermidina | 1 | 0,1mM |
| PMSF | 100 mM | 1mM |
| Iodoacetamida | 1 mg/mL | 1ug/mL |
| Leupeptina | 1 mg/mL | 1ug/mL |
| Pepstatina | 1M | 2mM |
| NEM | 500 mM | 10 mM |

| Tampó Urea | Stock | Final |
|----------------|---------|--------|
| Tris-HCl pH7,5 | 1M | 100 mM |
| Urea* | - | 8M |
| Tritón x-100 | 10% | 0,20% |
| Sarkosyl | 100% | 0,20% |
| PMSF | 100 mM | 1mM |
| Pepstatina | 1 mg/mL | 1ug/mL |
| Leupeptina | 1 mg/mL | 1ug/mL |
| NEM | 1M | 2mM |
| Iodoacetamida | 500 mM | 10 mM |

3.3. Quantificació de proteïnes

Les mostres extretes segons el protocol anterior van ser quantificades segons el mètode espectrofotomètric de Bradford amb el reactiu Biorad Protein Assay. En cada cas s'han realitzat repliques de les mostres a mesurar. Les mesures s'han realitzat en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595nm.

3.4. Separació electroforètica de proteïnes

Les proteïnes es van separar mitjançant electroforesi desnaturalitzant per proteïnes (SDS-PAGE) fent servir l'aparell vertical de Biorad, seguint les instruccions del fabricant.

Procediment:

1. Armar el sistema de preparació de gels.
2. Afegir el gel separador fins a uns 7cm d'alçada aproximadament. Afegir unes gotes d'isopropanol per cobrir la superfície exposada a l'oxigen atmosfèric, que inhibiria la polimerització. Deixar polimeritzar 1h.
3. Treure l'isopropanol. Afegir el gel apilador fins a l'extrem superior dels vidres i encaixar immediatament la pinta corresponent amb el número de pous adequats. Deixar polimeritzar el gel 1 h. S'han utilitzat vidres de 0.75mm de gruix.
4. Col·locar el gel al suport corresponent en la cubeta d'electroforesi. Afegir tampó d'electroforesi 1x fins vessar els pouets.
5. Preparar les mostres segons es descriu en l'apartat anterior, i afegir el volum adequat de tampó de càrrega 6x. Bullir les mostres 5 min. A 95°C.
6. Carregar el gel amb les mostres. Aplicar el voltatge apropiat per la correcta separació de les proteïnes. Es van fixar amperatges de 20-40mA, segons el número de gels que estaven migrant al sistema (1 ó 2). Un cop el front de migració arriba a l'extrem inferior del gel, aturar l'electroforesi.

Solucions

- Tampó d'electroforesi 10x: Tris base 0.25 M, Glicina 1.92M, SDS 1% (p/v).
- Tampó de càrrega 6x: Tris-HCl 0.35 pH 6.8, 30% glicerol (v/v), SDS 10% (p/v), DTT 0.6 M, blau de bromofenol 0.012% (p/v).

3.5. Anàlisi de proteïnes per transferència i immunodetecció (*Western-blot*)

A partir d'un gel SDS-PAGE s'ha realitzat la transferència de les proteïnes a membranes de PVDF seguint el mètode semi-sec. Es va fer servir l'aparell *Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Cell de BioRad* seguint les instruccions del fabricant. La detecció de les proteïnes es va fer servir per quimioluminescència utilitzant un anticòs primari específic contra la proteïna a detectar i un anticòs secundari anti-anticòs primari conjugat amb una peroxidasa de rave (GE Healthcare), que hidrolitza el reactiu quimioluminiscent ECL PLUS (ECL PLUS Western Blotting detection reagents, GE Healthcare).

Procediment

1. Recuperar el gel SDS-PAGE i descartar el gel apilador.
2. Rentar 10 segons el metanol sobrant de la membrana restant 10 segons amb H₂O miliQ i finalment mantenir-la en tampó de transferència.
3. Acoblar la membrana al gel entre fragments de paper gruixut absorbent de la mateixa mida i prèviament equilibrats amb el tampó de transferència.
4. Col·locar el muntatge en l'aparell de transferència i ajustar un voltatge de 20V durant 50 min.
5. Recuperar la membrana.
6. Bloquejar amb tampó TBST 1X +3% (p/v) de llet desnatada en pols durant 1h a temperatura ambient (TA) en agitació.
7. Retirar el bloqueig i afegir l'anticòs primari a la dilució corresponent en tampó TBST 1X +3% (p/v) de llet en pols a TA durant 1h en agitació. Es pot substituir aquesta incubació d'1h per O/N a 4°C.

8. Rentar la membrana amb TBST amb dos rentats ràpids i altres dos de 10 min. A TA i en agitació.
9. Incubar la membrana 45 minuts a TA amb el corresponent anticòs secundari en tampó TBST + 3% de llet en pols.
10. Repetir el pas 3 de rentats.
11. Eixugar la membrana per treure l'excés de TBST i afegir el reactiu ECL Plus. Revelar la membrana amb l'ajut de l'equip LAS4000(Fujifilm Life Science Products) variant els temps d'exposició fins aconseguir una resolució i contrast òptims de la imatge.

Solucions:

- Tampó de transferència: Tris 48 mM, glicina 39mM, metanol 10% (v/v).
- Tampó TBST: Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 20mM, Tween20 0.1% (v/v).

3.6. Anticossos utilitzats

3.6.1. Anticossos primaris

- Anti-SUMO. Anticòs policlonal. - Anti-SAE2: Anticòs policlonal.
- Anti-SCE: Anticòs policlonal.
- Anti-His: Anticòs policlonal. Anti Histidina.
- Anti-Histona H3. Anticòs policlonal (Abcam)
- Anti-HSP70. Anticòs policlonal

3.6.2. Anticossos secundaris

- Anti-rabbit: Anti sèrum de conill unit a la peroxidasa de rave.

3.7. Tinció de proteïnes

La tinció de gels i membranes es va realitzar amb la solució de tinció Coomassie.

Procediment:

1. Col·locar la membrana en solució de tinció durant 10 minuts a TA en agitació.

2. Treure la solució de tinció i afegir la solució de destinció. Mantenir en agitació i reemplaçar la solució tantes vegades com sigui necessari fins que la relació entre la intensitat de les bandes i el soroll de fons resulti òptima.

Solucions:

- Coomassie. Metanol 40% (v/v), àcid acètic glacial 10% (v/v), blau de Coomassie R-250 0.1% (p/v).
- Solució destinció Coomassie: etanol 40% (v/v), àcid acètic glacial 3% (v/v).

3.8. Expressió heteròloga de proteïnes a *E.coli*.

La soca BL21 d'*E.coli* va ser utilitzada per l'expressió de proteïnes. Després de transformar aquestes cèl·lules amb la construcció d'interès, es van sembrar en plaques amb el corresponent antibiòtic per tal d'obtenir colònies aïllades.

Procediment:

1. Créixer tota la nit a 37°C un precultiu, obtingut a partir d'una colònia aïllada, en 60ml de 2xTY amb el corresponent antibiòtic.
2. Inocular un erlenmeier amb 500 mL de 2xTY amb una dilució 1/50 del precultiu anterior i incubar a 37°C fins que el cultiu arribi a una DO_{600nm} de 0.6-0.8.
3. Induir durant 4 hores l'expressió de la proteïna, afegint al cultiu 0.1mM final d'IPTG.
4. Centrifugar a 6000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
5. Resuspendre el sediment anterior en 1/10 del volum de cultiu bacterià original amb tampó de lisi.
6. Incubar a 30 minuts a 4°C.
7. Sonicar; s'apliquen 3 polsos de 30 segons a 30W amb 1 minut d'interval entre ells.
8. Centrifugar a 18000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
9. El sobrenadant és filtrat amb un filbre de 0.45 µm i és destinat per a la purificació de la proteïna d'interès segons el mètode escaient.

Solucions:

- Tampó de lisi. Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 0.35 M, MgCl₂ 10 mM, B-mercaptoetanol 1 mM, NP40 0.1% (v/v), DNasa 50 mg/ml, lisozima 1 mg/mL i inhibidors de proteases (PMSP (*phenylmethanesulphonylfluoride*) 1mM, Pepstatina 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/ml).

3.9. Purificació de proteïnes

La sobreexpressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines o a la GST ens permet purificar-les mitjançant una resina (IMAC–Sepharose resin, GE Healthcare) o amb una glutatió-agarosa (GEHealthcare) respectivament. Les cèl·lules transformades amb el vector desitjat van ser crescudes i lisades. Es va empaquetar en una columna 3mL d'una suspensió 50% de resina Ni-NTA. Posteriorment es va procedir a la purificació del lisat del cultiu seguint les especificacions del fabricant per a cadascuna de les resines utilitzades.

3.10. Assaig del processament del SAE2.

Es van incubar 350µg d'extractes de proteïna purificada de teixit de roseta de 6 setmanes i de síliqua de Col-0 amb 10µg of proteïna recombinant His:UFDcT en presència del tampó d'extracció i els inhibidors de proteases. La reacció control es va dur a terme incubant la proteïna His:UFDcT sense cap extracte de planta. La reacció es va incubar durant 60 min a 32°C. Després a diferents temps, les reaccions es van arar mitjançant l'adició del tampó de càrrega i es van bullir durant 10 min. Una dilució 1:15 de cada mostra es va carregar i es va resoldre en un gel del 12% SDS-PAGE. Seguit d'un anàlisi amb immunodetecció amb l'anticòs anti-Histidines.

Per tal de purificar la proteïna HIS:UFDcT es va realitzar un anàlisi d'espectrometria de masses (MS). Les condicions d'escalat foren: 100µg de HIS:UFDcT incubades amb 3.5mg d'extractes proteics de roseta o síliqua de plantes Col-0 durant 60 min a 30°C. A continuació es va purificar la proteïna recombinant fent servir una columna d'IMAC-sepharose (GE Healthcare) segons les condicions especificades pel fabricant. Les elucions representatives de la purificació de la proteïna recombinant es van incubar amb els extractes de roseta o síliqua i es van concentrar en 40µL amb un filtre de centrifuga microcon®. El producte concentrat es va carregar i es va resoldre amb un gel 12% SDS-

PAGE i es va tenyir amb blau Coomassie. Les bandes es van tallar i es van tractar i analitzar mitjançant espectrometria de masses.

Solucions:

- Tamó d'extracció: Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, Tritó X-100 0.2% (p/v) i inhibidors de proteases (PMSP (*phenylmethanesulphonylfluoride*) 1mM, Pepstatina 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, NEM (n-Etilmaleimida) 2mM, Iodoacetamida 10 mM).

3.11. Assaig d'interacció amb importines α

La proteïna de fusió GST-importina es va incubar amb la proteïna d'His-2xFlag-EYFP-NLS en 20µl de tampó de reacció (20 mM Hepes-NaOH pH = 7) 0,1 M NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM d'EDTA, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, i 0,1% de BSA durant 60 min a temperatura ambient. Les reaccions es van sotmetre a electroforesi en condicions natives en un gel del 7,5% de poliacrilamida / tampó 1xTris-Glicine que conté DTT 1 mM i 10% Glicerol durant 90 min en un voltatge constant de 160V en una habitació freda (4°C) (Kosugi et al. 2008). Les proteïnes de fusió EYFP al gel es va observar amb un filtre verd amb un LAS400 analitzador d'imatges de fluorescència LAS400.

3.12. Anàlisi quantitatiu de la localització subcel·lular de proteïnes fluorescents.

La quantificació de la distribució subcel·lular citosol-nucli es va realitzar mitjançant un mètode prèviament desenvolupat en el nostre laboratori (Mas et al. 2016).

4. MÈTODES DE PLANTES

4.1. Esterilització de llavors

Les llavors d'*Arabidopsis* van ser esterilitzades per aquells experiments que implicaven sembrar-les per al cultiu en placa.

Procediment:

1. Realitzar 3 rentats amb solució d'esterilització. Entre un rentat i el següent agitar vigorosament amb vòrtex.
3. Deixar les llavors en la solució d'esterilització durant 10 min. en agitació. 3. Realitzar

4. 3 rentats amb aigua estèril miliQ. 4. Retirar l'aigua estèril.

Solucions: - Solució d'esterilització: Lleixiu 50% (v/v), Tritón X-100 0.01% (v/v).

Alternativament, per als assajos de germinació, les llavors es van esterilitzar amb vapors de lleixiu (100ml de lleixiu amb 3ml HCl) durant 2h en una cambra de buit.

4.2. Sembra de llavors

Depenent del tipus d'experiment que s'hagi dut a terme, les llavors s'han sembrat de la següent manera:

4.2.1. Sembra de llavors en grup sobre el medi de cultiu

Unes 1000-2000 llavors es sembren en grup directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de llavors de la generació T0, procedents de plantes transformades amb agrobacteri, d'entre les quals es volem seleccionar aquelles que continguin el transgen.

Procediment:

1. Resuspendre les llavors en 2.5 mL d'una solució estèril d'agarosa 0.1% (p/v), que permet que les llavors s'escampin per la superfície del medi sense que s'agreguin.

2. Abocar les llavors en la solució d'agarosa sobre el medi sòlid MS 0.5x amb l'antibiòtic de selecció corresponent i l'antibiòtic cefotaxima per eliminar les possibles restes d'agrobacteri, escampar-les per tota la placa i deixa-les assecar sota la campana amb les plaques obertes.

4.2.2. Sembra de llavors una a una sobre el medi de cultiu

Les llavors es sembren d'una en una directament sobre el medi de cultiu quan es tracta de facilitar el seu recompte (per exemple, en els estudis de segregació d'un transgen) o per als experiments fisiològics (apartat 2.3.5) en una densitat de 100 llavors per placa.

Procediment:

1. Resuspènere les llavors en aigua estèril.

2. Pipetejar les llavors amb una pipeta P1000 i deixar-les anar una a una sobre el medi sòlid corresponent contactant la punta de la pipeta amb el medi.

Independentment del sistema de sembra utilitzat, un cop sembrades les llavors, les plaques es segellen amb cinta porosa micropore i s'emmagatzemen en fosc a 4°C durant entre 3 i 5 dies. Aquest procés, conegut com estratificació, permet el trencament de la dormància de les llavors, assegurant la germinació sincronitzada.

4.3. Obtenció de plantes transgèniques

Transformació de plantes d'Arabidopsis Plantes d'Arabidopsis de l'ecotip silvestre Col-0 es van transformar per floral dip segons el mètode descrit per (Clough i Bent 1998), amb un cultiu d'A.tumefaciens portador de la construcció que en cada cas es volia introduir a la planta (apartat 1.4.1.3).

Procediment:

1. Cultivar les plantes d'Arabidopsis a transformar en testos a l'hivernacle. En testos de 11.5 cm de diàmetre amb la barreja de substrat coberta per una reixeta, es sembren unes 8-10 llavors, densitat que permetrà un creixement òptim de la planta.
2. Quan les plantes han desenvolupat inflorescències de 5-7 cm (aproximadament 6 setmanes després de la sembra), tallar les inflorescències a ran de roseta (tallar la inflorescència principal de la planta fa que es formin noves tiges florals laterals, d'aquesta manera augmenten el número de tiges florals susceptibles a ser transformades). Després de 9-10 dies aquestes tiges florals estan en un estadi òptim per a la transformació.
3. Dos dies abans de la transformació, inocular 2 mL de medi 2xTY amb els antibiòtics adequats amb la soca de l'agrobacteri portadora de la construcció a transformar. Incubar O/N a 28°C en agitació.
4. Inocular un cultiu de 1 L de medi 2xTY amb els antibiòtics adequats amb 1 mL del precultiu. Incubar O/N a 28°C en agitació.
5. Centrifugar el cultiu 10 minuts a 4000xg. Descartar el sobrenedant.

6. Resuspendre les cèl·lules en 300 mL de sacarosa 5% (p/v).
7. Just abans de transformar les plantes afegir 0.02% (v/v) de Silvet al cultiu d'agrobacteri.
8. Abocar el cultiu en un recipient adequat i submergir-hi les inflorescències de les plantes durant 10 segons. Convé regar les plantes abans de la transformació, perquè l'aigua saturarà el substrat en cas de que aquest entri en contacte amb la solució d'agrobacteri i no l'absorirà, impedit futures contaminacions en les plantes. La reixeta que hem posat als testos en el moment de la sembra també impedeix el contacte del substrat amb la solució d'agrobacteri al posar els testos boca avall en el moment de la transformació.
9. Deixar els testos en posició horitzontal en una safata sobre paper de filtre, que absorirà l'excés d'agrobacteri, i cobrir-la amb un plàstic.
10. Mantenir la safata durant 2-4 dies al fitotrò amb baixa intensitat de llum.
11. Passat aquest temps, retirar el plàstic que cobreix la safata, el paper de filtre i posar les plantes en posició vertical per a ser cultivades normalment a l'hivernacle.
12. Recollir les llavors d'aquestes plantes transformades (T0) i sembrar-les en medi MS amb l'antibiòtic de selecció adequat més cefotaxima (**Figura M1**)
13. Repetir el pas anterior amb la següent generació de llavors (T1) seleccionant els individus que present un 75% de resistència. Es a dir els individus que presenten una única inserció i per tant son heterozigots per al transgen. (**Figura M1**)
14. Repetir un altre cop el pas anterior per analitzar la generació T2 i seleccionar els individus homozigots per al transgen, és a dir, els que presenten una descendència 100% resistent (**Figura M1**).

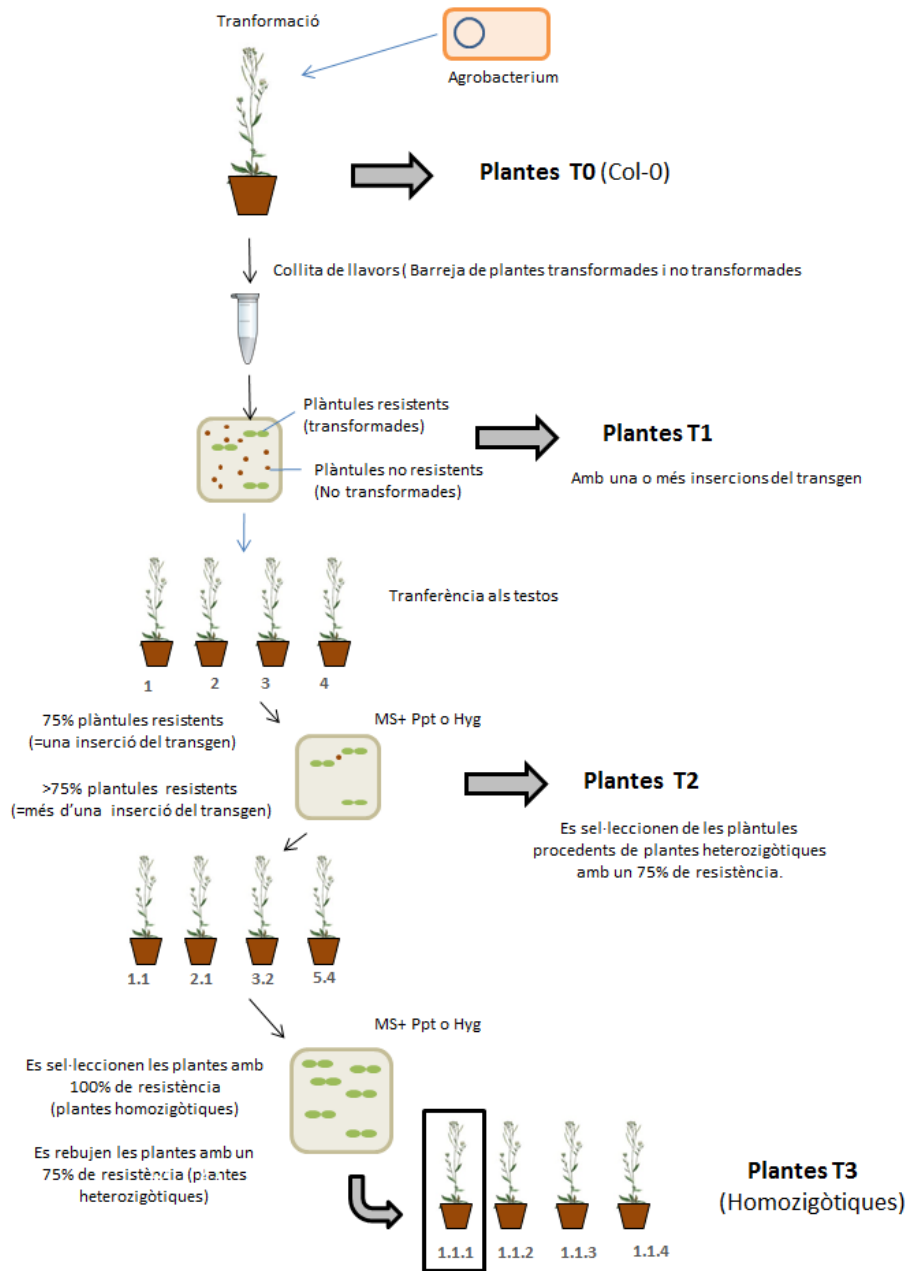


Figura M1. Generació de línies transgèniques homozigòtiques. Plantes d'ecòtip silvestre (Col-0) es van transformar amb *Agrobacterium* fent servir diferents vectors amb diverses versions del SAE2 mitjançant el sistema *floral dipping* (Clough & Bent 1998). Es representa les diferents generacions i seleccions que es realitzen per l'obtenció de plantes homozigòtiques amb una única inserció del transgèn d'interès.

4.4. Anàlisi molecular de les plantes mutants.

4.4.1. Obtenció de ADN genòmic de planta.

Per a l'extracció del DNA genòmic de les plantes hem seguit el protocol descrit per Edwards et al. (1991).

Procediment:

1. Macerar el teixit (una fulla jove, síliqua o unes quantes llavors) en un tub eppendorf durant més de 15 segons amb un èmbol de plàstic (pellet pestle polypropylene, SIGMA-Aldrich)
2. Afegir 400 µl de tampó d'extracció, i acabar de macerar el teixit.
3. Barrejar amb el vòrtex.
4. Centrifugar 1 minut a 13000 rpm.
5. Descartar el sediment.
6. Barrejar el sobrenedant (400 µl) amb 400 µl d'isopropanol.
7. Incubar a TA durant 2 min. 8. 9. Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
8. Descartar el sobrenedant.
9. Rentar el sediment amb 700 µl d'etanol 70%.
10. Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
11. Descartar el sobrenedant.
12. Resuspendre el sediment en 100 µl d'aigua destil·lada.
13. Guardar a -20°C.

Solucions: - Tampó d'extracció: Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM i SDS 0.5%.

4.4.2. Comprovació del genotip per PCR

La tècnica de la PCR s'utilitza per detectar ràpidament la presència d'un transgen introduït a la planta, utilitzant oligonucleòtids de l'element d'inserció de cada línia i de la regió genòmica flanquejant al seu lloc d'inserció. La reacció de PCR utilitza com a motlle 2 µl de DNA procedent de l'extracció de DNA genòmic (apartat 2.3.4.1) i una parella d'encebadors adequada.

4.5. Obtenció de protoplastos

Per a l'obtenció de protoplastos del mesòfil de les fulles d'Arabidopsis, es va fer servir un protocol prèviament desenvolupat i millorat al nostre laboratori (Schapire & Lois 2016). Aquest protocol utilitza fulles d'Arabidopsis crescudes en condicions de dia llarg (LD). Un cop es treuen les parets cel·lulars i s'eliminen fent servir una solució que conté cel·lulasa fúngica i macerozima, els protoplasts són alliberats, rentats i finalment recol·lectats.

Procediment:

1. Es tallen tires d'uns 35cm de cinta d'autoclau .
2. Es tallen fulles de 4–5-cm de plantes de 4 to 5 setmanes crescudes en condicions LD a 22°C.
3. Es col·loquen les fulles amb la cara de l'anvers tocant la cinta d'autoclau.
4. Es repeteix el pas 2 i 3 amb un total de 7 fulles.
5. Es col·loca cinta Magic TM al revers de les fulles i amb cura s'aixafa per tal d'adherir-les.
6. Amb cura es treu la cinta MagicTM per tal de treure la epidermis de les fulles adherides
7. Les cintes amb les fulles es transfereixen a una placa de petri que conté solució enzimàtica (20ml).
8. Les fulles s'incuben en agitació (40rpm) durant 90 min a llum baixa i a temperatura ambient (22–25 °C).
9. Amb cura es transfereixen la solució enzimàtica que conté protoplastos a un falcon de 50ml, filtrant aquesta solució amb un filtre de 70 µm.
10. Es centrifuga a temperatura ambient dos minuts a 200 x g. Es descarta el sobrenadant fent servir una pipeta de Pasteur.
11. Es resuspén el sediment amb protoplasts amb la solució W5 mitjançant inversió del tub.

12. Es repeteix el procés 10 i 11 i els protoplastos es mantenen en gel fins la seva utilització.

Solucions:

- Solució enzimàtica: 1.5 % cel·lulasa, 0.3 % macerozima, 0.4 M mannitol, 20 mM KCl. Aquesta solució s'agita i s'escalfa a 55 °C durant 10 min i es refreda a temperatura ambient abans d'afegir 10 mM CaCl₂
- Solució de rentat W5: 154 mM NaCl, 125 mM CaCl, 25 mM KCl, 2 mM MES (pH 5.6). To prepare 500 ml of W5 solution, mix 15.4 ml of 5 M NaCl, 62.5 ml of 1 M CaCl₂.

4.6. Mesura de fenotips

4.6.1. Mesura de la producció relativa de llavors

La producció de llavors per a cadascuna de les línies transgèniques analitzades es va determinar mitjançant el pes total de les llavors produïdes per cada planta analitzada als dos mesos de creixement en condicions de dia llarg (LD). Degut a la variabilitat de la producció entre les diferents rèpliques biològiques analitzades, es va calcular la producció relativa definida com el pes total de les llavors de cada planta en relació a la mitja produïda en cada rèplica biològica.

4.6.2. Anàlisi de l'àrea de la llavor

L'àrea de les llavors va ser analitzada amb el programari lliure SmartGrain <http://www.kazusa.or.jp/phenotyping/smartgrain/index.html> (Tanabata et al. 2012). Per a cada línia es va quantificar l'àrea de 15-20 llavors en cadascuna de les rèpliques analitzades en un total 4 rèpliques biològiques o collites independents.

4.6.3. Anàlisi de la longitud de les arrels i els hipocòtils

Les anàlisis de fenotip de les plàntules (arrel i hipocòtils) es van realitzar sobre imatges digitals utilitzant el programa lliure Image J (National Institute of Health ImageJ software. Bethesda, MD, USA. <https://rsb.info.nih.gov/ij>). Per a les mesures dels hipocòtils es van col·locar plans sobre plaques d'agar per poder prendre les imatges. Es van analitzar un mínim de 15 plàntules per a cada tractament, i cada experiment es va

repetir almenys 3 cops. En aquest tipus d'anàlisi es representa la mitjana, la mediana de les mesures en un diagrama de caixa i es realitza un t-test per determinar si existeixen diferències significatives entre les línies.

4.6.4. Anàlisi de l'àrea de la roseta i la longitud dels pecíols de les fulles.

Les plantes van ser crescudes en condicions de dia llarg a 22 °C durant 21 dies. L'anàlisi de l'àrea de la roseta de les plantes es va realitzar mitjançant el programari lliure ImageJ. Més concretament l'àrea de la roseta es va mesurar mitjançant el programa ImageJ i més concretament amb el dibuix del contorn de la roseta fent servir l'opció de selecció a mà alçada. L'anàlisi dels pecíols es va realitzar amb el mateix programari mitjançant la mesura de la longitud dels pecíols de les fulles 3,4,5 de cada planta amb l'opció línies segmentades. En aquest tipus d'anàlisi es representa la mitjana, la mediana de les mesures en un diagrama de caixa i es realitza un t-test per determinar si existeixen diferències significatives entre les línies.

4.6.5. Mesura de la floració

Les plantes van ser crescudes en condicions de dia llarg a 22 °C durant 21 dies. Es va analitzar la floració de les diferents línies mitjançant el monitoratge del nombre de dies transcorreguts així com el nombre de fulles presents a la roseta quan la tija té una altura d'1cm.

BIBLIOGRAFIA

- Aida, M. et al., 2004. The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell*, 119(1), pp.109–120.
- Alfano, J.R. & Collmer, A., 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual review of phytopathology*, 42, pp.385–414. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283671> [Accessed August 22, 2016].
- Ali-Rachedi, S. et al., 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 219(3), pp.479–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060827> [Accessed August 17, 2016].
- Alvarez-Buylla, E.R. et al., 2010. Flower Development. *The Arabidopsis Book*, 8, p.e0127. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0127> [Accessed August 16, 2016].
- von Arnim, A. & Deng, X.-W., 1996. LIGHT CONTROL OF SEEDLING DEVELOPMENT. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), pp.215–243. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.47.1.215> [Accessed August 16, 2016].
- Arsovski, A.A. et al., 2012. Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 10, p.e0147. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0147> [Accessed August 16, 2016].
- Augustine, R.C. et al., 2016. Defining the SUMO System in Maize: SUMOylation Is Up-Regulated During Endosperm Development and Rapidly Induced by Stress. *Plant Physiology*, p.pp.00353.2016. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.16.00353> [Accessed July 12, 2016].
- Augustine, R.C. et al., 2009. Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 6(1), pp.223–232. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2649401&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2016].
- Bartetzko, V. et al., 2009. The Xanthomonas campestris pv. vesicatoria type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(6), pp.655–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445590> [Accessed August 22, 2016].
- Bayer, P. et al., 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology*, 280(2), pp.275–286.
- Becker, M.G. et al., 2014. Genomic dissection of the seed. *Frontiers in Plant Science*,

- 5(September), pp.1–16. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00464/abstract>.
- Bentsink, L. et al., 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), pp.17042–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065317> [Accessed August 17, 2016].
- Bentsink, L. & Koornneef, M., 2008. Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book*, 6, p.e0119. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0119> [Accessed August 16, 2016].
- Bernier-Villamor, V. et al., 2002. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 108(3), pp.345–356.
- Beth Mudgett, M., 2005. NEW INSIGHTS TO THE FUNCTION OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIAL TYPE III EFFECTORS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), pp.509–531. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144218> [Accessed August 14, 2016].
- Bewley, J.D. et al., 2013. Germination. In *Seeds*. New York, NY: Springer New York, pp. 133–181. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4693-4_4 [Accessed August 17, 2016].
- Bewley, J.D. & Black, M., 1994. *Seeds : physiology of development and germination*, Plenum Press.
- Bewley, J.D., 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell American Society of Plant Physiologists*, 9, pp.1055–1.
- Beyer, A.R. et al., 2015. The anaplasma phagocytophilum effector AmpA hijacks host cell SUMOylation. *Cellular Microbiology*, 17(4), pp.504–519.
- Block, A. et al., 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, pp.396–403.
- Boggio, R., Passafaro, A. & Chiocca, S., 2007. Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: A viral strategy to counteract sumoylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), pp.15376–15382.
- Bonshtien, A. et al., 2005. Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(4), pp.300–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15828682> [Accessed August 22, 2016].
- Bossis, G. et al., 2005. Down-Regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 Dimer Activity by Sumoylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), pp.6964–6979. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.25.16.6964-6979.2005> [Accessed August 7, 2016].
- Bossis, G. et al., 2006. SUMO: regulating the regulator. *Cell Division*, 1(1), p.13. Available

- at: <http://celldiv.biomedcentral.com/articles/10.1186/1747-1028-1-13> [Accessed August 7, 2016].
- Budhiraja, R. et al., 2009. Substrates related to chromatin and to RNA-dependent processes are modified by Arabidopsis SUMO isoforms that differ in a conserved residue with influence on desumoylation. *Plant physiology*, 149(3), pp.1529–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2649401&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- van den Burg, H.A. et al., 2010. Arabidopsis Small Ubiquitin-Like Modifier Paralogs Have Distinct Functions in Development and Defense. *The Plant Cell*, 22(6), pp.1998–2016. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.109.070961>.
- Calikowski, T.T. & Meier, I., 2006. Isolation of nuclear proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 323, pp.393–402.
- Canonne, J. et al., 2011. The Xanthomonas type III effector XopD targets the Arabidopsis transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *The Plant cell*, 23(9), pp.3498–511. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917550> [Accessed August 13, 2016].
- Cao, D. et al., 2005. Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta*, 223(1), pp.105–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034591> [Accessed August 17, 2016].
- Capili, A.D. & Lima, C.D., 2007. *Structure and Analysis of a Complex between SUMO and Ubc9 Illustrates Features of a Conserved E2-Ubl Interaction*,
- Carlucci, A. et al., 2012. Plectosphaerella species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, pp.34–48.
- Castaño-Miquel, L. et al., 2013. Diversification of SUMO-Activating Enzyme in Arabidopsis: Implications in SUMO Conjugation. *Molecular Plant*, 6(5), pp.1646–1660.
- Castaño-Miquel, L. et al., 2017. SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Molecular Plant*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205217300084>.
- Castaño-Miquel, L., Seguí, J. & Lois, L.M., 2011. Distinctive properties of Arabidopsis SUMO paralogues support the in vivo predominant role of AtSUMO1/2 isoforms. *The Biochemical journal*, 436(3), pp.581–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3580314&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Castaño Miquel, L., 2015. Caracterización molecular y funcional de Small-Ubiquitin-related Modifier en Arabidopsis thaliana.
- Castillo, A.G. et al., 2004. Interaction between a Geminivirus Replication Protein and the Plant Sumoylation System. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 78(6), pp.2758–2769.

- Castro, P.H. et al., 2015. SIZ1-Dependent Post-Translational Modification by SUMO Modulates Sugar Signaling and Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 56(12), pp.2297–311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468507> [Accessed July 13, 2016].
- Castro, P.H. et al., 2012. SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), pp.3269–3283.
- Catala, R. et al., 2007. The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant cell*, 19(9), pp.2952–66. Available at: <http://www.plantcell.org/content/19/9/2952.full>.
- Chaikam, V. & Karlson, D.T., 2010. Response and transcriptional regulation of rice SUMOylation system during development and stress conditions. *BMB reports*, 43(2), pp.103–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193128> [Accessed July 11, 2016].
- Chaves, I. et al., 2011. The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), pp.335–364. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-042110-103759> [Accessed August 16, 2016].
- Chen, C.-C. et al., 2011a. *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 is involved in excess copper tolerance. *Plant physiology*, 156(4), pp.2225–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632972> [Accessed July 13, 2016].
- Chen, C.-C. et al., 2011b. *Arabidopsis* SUMO E3 Ligase SIZ1 Is Involved in Excess Copper Tolerance. *Plant physiology*, 156(4), pp.2225–2234.
- Cheong, M.S. et al., 2009. Specific domain structures control abscisic acid-, salicylic acid-, and stress-mediated SIZ1 phenotypes. *Plant physiology*, 151(4), pp.1930–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837819> [Accessed July 13, 2016].
- Chosed, R. et al., 2006. Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: *Arabidopsis* SUMOylation. *Biochemical Journal*, 398(3), pp.521–529. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16740136.
- Chosed, R. et al., 2007. Structural analysis of *Xanthomonas* XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitin-like protein proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), pp.6773–6782.
- Choudhary, C. et al., 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5942), pp.834–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608861>.
- Clough, S.J. & Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 16(6), pp.735–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069079> [Accessed August 25, 2016].

- Cohen-Peer, R. et al., 2010. Sumoylation of Arabidopsis heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant Molecular Biology*, 74(1), pp.33–45.
- Colby, T., 2006. SUMO-Conjugating and SUMO-Deconjugating Enzymes from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1), pp.318–332. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.085415>.
- Conti, L. et al., 2009. OTS1 and OTS2 SUMO proteases link plant development and survival under salt stress. *Plant Signaling and Behavior*, 4(3), pp.225–227. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-62549151722&partnerID=tZOtx3y1>.
- Conti, L. et al., 2008. Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20(10), pp.2894–908. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2590731&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Conti, L. et al., 2014. Small Ubiquitin-like Modifier Protein SUMO Enables Plants to Control Growth Independently of the Phytohormone Gibberellin. *Developmental Cell*, 28(1), pp.102–110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.004>.
- Crawford, N.M. & Forde, B.G., 2002. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book*, 1(3), p.e0011. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0011>.
- Van Daele, I. et al., 2012. A comparative study of seed yield parameters in Arabidopsis thaliana mutants and transgenics. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4), pp.488–500.
- Dang, C. V & Lee, W.M., 1988. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Molecular and cellular biology*, 8(10), pp.4048–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3054508> [Accessed August 23, 2016].
- Dean, R. et al., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), pp.414–430.
- Deng, X.W. et al., 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405(6785), pp.462–466. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35013076> [Accessed August 16, 2016].
- Depaux, a et al., 2007. A crosstalk between hSiah2 and Pias E3-ligases modulates Pias-dependent activation. *Oncogene*, 26(46), pp.6665–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17533377>.
- Dingwall, C. & Laskey, R.A., 1991. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends in biochemical sciences*, 16(12), pp.478–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664152> [Accessed August 23, 2016].
- Dodd, A.N., 2005. Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science*, 309(5734), pp.630–633. Available at:

<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1115581>.

- Duan, K. et al., 2008. Characterization of a sub-family of Arabidopsis genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 54(6), pp.965–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18315545> [Accessed August 11, 2016].
- Durrant, W.E. & Dong, X., 2004. Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology*, 42, pp.185–209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283665> [Accessed August 18, 2016].
- Elrouby, N., 2015. Analysis of Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Targets Reflects the Essential Nature of Protein SUMOylation and Provides Insight to Elucidate the Role of SUMO in Plant Development. *Plant physiology*, 169(2), pp.1006–17. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/169/2/1006.full>.
- Elrouby, N., 2014. Extent and significance of non-covalent SUMO interactions in plant development. *Plant signaling & behavior*, 9, p.e27948. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4091521&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Elrouby, N. et al., 2013. Identification of Arabidopsis SUMO-interacting proteins that regulate chromatin activity and developmental transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, pp.19956–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24255109>.
- Elrouby, N. & Coupland, G., 2010. Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), pp.17415–17420.
- Finch-Savage, W.E. & Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. *The New phytologist*, 171(3), pp.501–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16866955> [Accessed August 11, 2016].
- Footitt, S. et al., 2013. Temperature, light and nitrate sensing coordinate Arabidopsis seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 74(6), pp.1003–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590427> [Accessed August 17, 2016].
- Garcia-Dominguez, M., March-Diaz, R. & Reyes, J.C., 2008. The PHD domain of plant PIAS proteins mediates sumoylation of bromodomain GTE proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp.21469–21477.
- Garcia-Dominguez, M. & Reyes, J.C., 2009. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789, pp.451–459.
- Gareau, J.R. & Lima, C.D., 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Publishing Group*, 11.
- Gill, G., 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(5), pp.536–541.

- Giraudat, J. et al., 1992. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *The Plant cell*, 4(10), pp.1251–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1359917> [Accessed August 17, 2016].
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, pp.205–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16078883> [Accessed August 18, 2016].
- Goldstein, G. et al., 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), pp.11–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1078892> [Accessed August 20, 2016].
- Golebiowski, F. et al., 2009. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science signaling*, 2(72), p.ra24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471022> [Accessed July 13, 2016].
- Görllich, D. & Kutay, U., 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, pp.607–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611974> [Accessed August 23, 2016].
- Grau-Bové, X., Sebé-Pedrós, A. & Ruiz-Trillo, I., 2015. The eukaryotic ancestor had a complex ubiquitin signaling system of archaeal origin. *Molecular biology and evolution*, 32(3), pp.726–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4327156&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Griffiths, J. et al., 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant cell*, 18(12), pp.3399–414. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194763> [Accessed August 17, 2016].
- Hardeland, U. et al., 2002. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *The EMBO journal*, 21(6), pp.1456–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11889051> [Accessed August 21, 2016].
- Hay, R.T., 2005. SUMO: A history of modification. *Molecular Cell*, 18(1), pp.1–12.
- Hendriks, I.A. & Vertegaal, A.C.O., 2016. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(9), pp.581–95. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm.2016.81>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27435506>.
- Hermkes, R. et al., 2011. Distinct roles for Arabidopsis SUMO protease ESD4 and its closest homolog ELS1. *Planta*, 233(1), pp.63–73.
- Hershko, a, Ciechanover, a & Varshavsky, a, 2000. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nature medicine*, 6(10), pp.1073–1081.
- Hietakangas, V. et al., 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), pp.45–50.

Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503698102> [Accessed August 7, 2016].

- Hirayama, T. & Shinozaki, K., 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, 12(8), pp.343–351.
- Ho, C.-W., Chen, H.-T. & Hwang, J., 2011. UBC9 Autosumoylation Negatively Regulates Sumoylation of Septins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), pp.21826–21834. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.234914> [Accessed August 7, 2016].
- Hochstrasser, M., 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(March).
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L. & Soppe, W.J.J., 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179(1), pp.33–54. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x> [Accessed August 17, 2016].
- Hotson, A. et al., 2003. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology*, 50(2), pp.377–389. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x> [Accessed August 14, 2016].
- Hotson, A. & Mudgett, M.B., 2004. Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: Identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), pp.384–390.
- Huang, L. et al., 2009. The Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *Plant Journal*, 60(4), pp.666–678.
- Isayenkov, S. V., 2014. Plant vacuoles: Physiological roles and mechanisms of vacuolar sorting and vesicular trafficking. *Cytology and Genetics*, 48(2), pp.127–137. Available at: <http://dx.doi.org/10.3103/S0095452714020042>.
- Ishida, T. et al., 2012. MMS21/HPY2 and SIZ1, Two Arabidopsis SUMO E3 Ligases, Have Distinct Functions in Development. *PLoS ONE*, 7(10), pp.1–10.
- Ishida, T. et al., 2009. SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), pp.2284–2297. Available at: <http://www.plantcell.org/content/21/8/2284.abstract>.
- Iuchi, S. et al., 2007. Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 50(6), pp.958–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521411> [Accessed August 17, 2016].
- Jiang, L. et al., 2001. The protein storage vacuole: A unique compound organelle. *Journal of Cell Biology*, 155(6), pp.991–1002.
- Jin, J.B. et al., 2008. The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a

- salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant Journal*, 53(3), pp.530–540.
- Jing, Y. et al., 2013. *Arabidopsis* Chromatin Remodeling Factor PICKLE Interacts with Transcription Factor HY5 to Regulate Hypocotyl Cell Elongation. *The Plant Cell*, 25(1), pp.242–256. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.112.105742> [Accessed August 16, 2016].
- Johnson, E.S., 2004. P <sc>ROTEIN</sc> M <sc>ODIFICATION BY</sc> SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), pp.355–382. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118>.
- Johnson, E.S. & Gupta, A.A., 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106(6), pp.735–744.
- Kalderon, D. et al., 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 Pt 2), pp.499–509. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6096007> [Accessed August 23, 2016].
- Kerscher, O., 2007. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports*, 8(6), pp.550–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545995> [Accessed August 25, 2016].
- Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M., 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp.159–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753028>.
- Khan, M. et al., 2014. Interplay between phosphorylation and SUMOylation events determines CESTA protein fate in brassinosteroid signalling. *Nature Communications*, 5, p.4687. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms5687> [Accessed August 7, 2016].
- Kiba, T. et al., 2007. Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 19(8), pp.2516–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2002626&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Kim, D.Y. et al., 2015. *Arabidopsis* CMT3 activity is positively regulated by AtSIZ1-mediated sumoylation. *Plant Science*, 239, pp.209–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.003>.
- Kim, S.-I. et al., 2015. E3 SUMO ligase AtSIZ1 positively regulates SLY1-mediated GA signalling and plant development. *The Biochemical journal*, 469(2), pp.299–314. Available at: <http://www.biochemj.org/content/469/2/299.abstract>.
- Kim, S.-I. et al., 2016. The E3 SUMO ligase AtSIZ1 functions in seed germination in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*. Available at:

<http://doi.wiley.com/10.1111/ppl.12462>.

- Klug, H. et al., 2013. Ubc9 sumoylation controls SUMO chain formation and meiotic synapsis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*, 50(5), pp.625–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23644018> [Accessed August 7, 2016].
- Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J. V, Mann, M., Sixma, T.K., et al., 2007. Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *The EMBO Journal*, 26(11), pp.2797–2807. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601711> [Accessed August 5, 2016].
- Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J. V, Mann, M. & Sixma, T.K., 2007. Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *The EMBO journal*, 26(11), pp.2797–807. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1888673&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Knipscheer, P. et al., 2008. Ubc9 Sumoylation Regulates SUMO Target Discrimination. *Molecular Cell*, 31(3), pp.371–382.
- Kong, X. et al., 2017. *Arabidopsis* SUMO protease ASP1 positively regulates flowering time partially through regulating FLC stability. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(1), pp.15–29. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jipb.12509>.
- Koornneef, M. et al., 1982. The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 61(4), pp.385–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270501> [Accessed August 17, 2016].
- Kosugi, S. et al., 2008. Design of Peptide Inhibitors for the Importin α/β Nuclear Import Pathway by Activity-Based Profiling. *Chemistry and Biology*, 15(9), pp.940–949.
- Kosugi, S. et al., 2009. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin?? *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), pp.478–485.
- Kotak, S. et al., 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), pp.310–316.
- Kurepa, J. et al., 2003. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of sumo1 and -2 conjugates is increased by stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), pp.6862–6872.
- Kwak, J.S. et al., 2016. *Arabidopsis* HIGH PLOIDY2 Sumoylates and Stabilizes Flowering Locus C through Its E3 Ligase Activity. *Frontiers in plant science*, 7(April), p.530.
- Lange, A. et al., 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of biological chemistry*, 282(8), pp.5101–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170104> [Accessed August 23, 2016].
- Le, N.-T. et al., 2017. Sub-cellular localization specific SUMOylation in the heart.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443917300315>.
- Lee, I. & Schindelin, H., 2008. Structural Insights into E1-Catalyzed Ubiquitin Activation and Transfer to Conjugating Enzymes. *Cell*, 134(2), pp.268–278.
- Lee, J. et al., 2007. Salicylic acid-mediated innate immunity in Arabidopsis is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant Journal*, 49(1), pp.79–90.
- Lee, S. et al., 2002. Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & development*, 16(5), pp.646–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877383> [Accessed August 17, 2016].
- Lefebvre, V. et al., 2006. Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 45(3), pp.309–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412079> [Accessed August 17, 2016].
- Léon-Kloosterziel, K.M. et al., 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 10(4), pp.655–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893542> [Accessed August 17, 2016].
- Li, J. et al., 2010. Arabidopsis Transcription Factor ELONGATED HYPOCOTYL5 Plays a Role in the Feedback Regulation of Phytochrome A Signaling. *THE PLANT CELL ONLINE*, 22(11), pp.3634–3649. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.075788> [Accessed August 16, 2016].
- Li, S.J. & Hochstrasser, M., 2003. The Ulp1 SUMO isopeptidase: Distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1069–1081.
- Liljegren, S.J. et al., 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, 404(6779), pp.766–70. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v404/n6779/abs/404766a0.html%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/35008089%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783890>.
- Lin, D. et al., 2002. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), pp.21740–21748.
- Lin, X.-L. et al., 2016. An Arabidopsis SUMO E3 Ligase, SIZ1, Negatively Regulates Photomorphogenesis by Promoting COP1 Activity. *PLoS genetics*, 12(4), p.e1006016. Available at: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006016>.
- Ling, Y. et al., 2012. Mutation in SUMO E3 ligase, SIZ1, disrupts the mature female gametophyte in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(1).
- Liu, B., Lois, L.M. & Reverter, D., 2017. Structural analysis and evolution of specificity of

- the SUMO UFD E1-E2 interactions. *Scientific Reports*, 7, p.41998. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep41998>.
- Liu, M. et al., 2014. SUMO E3 ligase AtMMS21 is required for normal meiosis and gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), p.153. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24893774.
- Llorente, F. et al., 2005. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal*, 43(2), pp.165–180. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2005.02440.x> [Accessed August 5, 2016].
- Lois, L.M., 2010. Diversity of the SUMOylation machinery in plants. *Biochemical Society transactions*, 38(Pt 1), pp.60–64.
- Lois, L.M. & Lima, C.D., 2005. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *The EMBO journal*, 24(3), pp.439–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=548657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lois, L.M., Lima, C.D. & Chua, N.-H., 2003. Small Ubiquitin-Like Modifier Modulates Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(>6), pp.1347–1359. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.009902> [Accessed August 5, 2016].
- Lopez-Molina, L. et al., 2003. AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes AB15 protein degradation. *Genes & Development*, 17, pp.410–418.
- López-Torrejón, G. et al., 2013. Identification of SUMO targets by a novel proteomic approach in plants(F). *Journal of integrative plant biology*, 55(1), pp.96–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164430> [Accessed August 22, 2016].
- Lu, X.-D. et al., 2015. Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1-SPA1 dissociation and photomorphogenic development in Arabidopsis. *Molecular plant*, 8(3), pp.467–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744387> [Accessed August 16, 2016].
- Luo, Q. et al., 2014. COP1 and phyB Physically Interact with PIL1 to Regulate Its Stability and Photomorphogenic Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(6), pp.2441–2456. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.121657> [Accessed August 16, 2016].
- Mahajan, R. et al., 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88(1), pp.97–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019411> [Accessed August 21, 2016].

- Mahajan, R., Gerace, L. & Melchior, F., 1998. Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *The Journal of cell biology*, 140(2), pp.259–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442102> [Accessed August 21, 2016].
- Mas, A., Amenós, M. & Lois, L.M., 2016. Quantitative Analysis of Subcellular Distribution of the SUMO Conjugation System by Confocal Microscopy Imaging. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1450, pp.135–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27424751> [Accessed August 13, 2016].
- Matic, I. et al., 2010. Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Molecular Cell*, 39(4), pp.641–652. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.026>.
- Matsuoka, S. et al., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316(5828), pp.1160–1166. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1140321> <http://www.sciencemag.org/content/316/5828/1160.full.pdf>.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. & Blobel, G., 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology*, 135(6), pp.1457–1470.
- McGinnis, K.M. et al., 2003. The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant cell*, 15(5), pp.1120–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724538> [Accessed August 17, 2016].
- Meier, I. & Somers, D.E., 2011. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), pp.538–546.
- Merkle, T., 2001. Nuclear import and export of proteins in plants: A tool for the regulation of signalling. *Planta*, 213(4), pp.499–517.
- Miller, M.J. et al., 2010. Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), pp.16512–16517. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004181107> [Accessed August 10, 2016].
- Miller, M.J. et al., 2013. Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in Arabidopsis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(2), pp.449–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3567865&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197790>.
- Miller, M.J. & Vierstra, R.D., 2011. Mass spectrometric identification of SUMO substrates provides insights into heat stress-induced SUMOylation in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(1), pp.130–3. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21270536> [Accessed July 13, 2016].
- Miura, K. et al., 2011. Increased tolerance to salt stress in the phosphate-accumulating Arabidopsis mutants *siz1* and *pho2*. *Planta*, 234(6), pp.1191–1199.
- Miura, K. et al., 2007. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(4), pp.1403–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1913760&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Miura, K. et al., 2010. SIZ1 controls cell growth and plant development in Arabidopsis through salicylic acid. *Plant & cell physiology*, 51(1), pp.103–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007967> [Accessed July 12, 2016].
- Miura, K. et al., 2013. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in Arabidopsis. *Plant Journal*, 73(1), pp.91–104.
- Miura, K. et al., 2009. Sumoylation of ABI5 by the Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), pp.5418–23. Available at: <http://www.pnas.org/content/106/13/5418.abstract>.
- Miura, K. et al., 2005. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), pp.7760–5. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/21/7760>.
- Miura, K. & Hasegawa, P.M., 2010. Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends in Cell Biology*, 20(4), pp.223–232. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.007>.
- Miura, K. & Ohta, M., 2010. SIZ1, a small ubiquitin-related modifier ligase, controls cold signaling through regulation of salicylic acid accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 167(7), pp.555–560.
- Mockler, T.C., Michael, T.P. & Priest, H.D., 2007. The Diurnal Project : Diurnal and Circadian Expression Profiling , Model-based Pattern Matching , and Promoter Analysis The Diurnal Project : Diurnal and Circadian Expression Profiling , Model-based Pattern Matching , and Promoter Analysis. , LXXII, pp.353–363.
- de Montaigu, A., Tóth, R. & Coupland, G., 2010. Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics*, 26(7), pp.296–306.
- Moutty, M.C., Sakin, V. & Melchior, F., 2011. Importin α/β mediates nuclear import of individual SUMO E1 subunits and of the holo-enzyme. *Molecular biology of the cell*, 22, pp.652–660.
- Mukherjee, S. et al., 2006. Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777), pp.1211–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728640> [Accessed August 22, 2016].

- Mukherjee, S., Hao, Y.-H. & Orth, K., 2007. A newly discovered post-translational modification--the acetylation of serine and threonine residues. *Trends in biochemical sciences*, 32(5), pp.210–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412595> [Accessed August 22, 2016].
- Muller, S. et al., 2000. c-Jun and p53 Activity Is Modulated by SUMO-1 Modification. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), pp.13321–13329. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.18.13321> [Accessed August 7, 2016].
- Mur, L.A.J. et al., 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental botany*, 59(3), pp.501–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079135> [Accessed August 18, 2016].
- Murtas, G. et al., 2003. A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *The Plant cell*, 15(10), pp.2308–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=197297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nakabayashi, K. et al., 2012. The time required for dormancy release in Arabidopsis is determined by DELAY OF GERMINATION1 protein levels in freshly harvested seeds. *The Plant cell*, 24(7), pp.2826–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829147> [Accessed August 17, 2016].
- Nambara, E. et al., 2010. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20(2), p.55. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0960258510000012 [Accessed August 17, 2016].
- Nigam, N. et al., 2008. SUMO-conjugating enzyme (Sce) and FK506-binding protein (FKBP) encoding rice (*Oryza sativa* L.) genes: genome-wide analysis, expression studies and evidence for their involvement in abiotic stress response. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(4), pp.371–383. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-008-0318-5> [Accessed August 10, 2016].
- Nito, K. et al., 2013. Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell reports*, 3(6), pp.1970–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746445> [Accessed August 16, 2016].
- Niwa, Y., Yamashino, T. & Mizuno, T., 2009. The Circadian Clock Regulates the Photoperiodic Response of Hypocotyl Elongation through a Coincidence Mechanism in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 50(4), pp.838–854. Available at: <https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pcp028> [Accessed March 9, 2017].
- Novatchkova, M. et al., 2004. SUMO conjugation in plants. *Planta*, 220(1), pp.1–8.
- Okada, S. et al., 2009. Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO pathways in E. coli: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant & cell physiology*, 50(6), pp.1049–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376783> [Accessed August 10, 2016].

- Okamoto, M. et al., 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant physiology*, 141(1), pp.97–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543410> [Accessed August 17, 2016].
- Olsen, S.K. et al., 2010. Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature*, 463(7283), pp.906–912. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2866016&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20164921.
- Orth, K. et al., 2000. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5496), pp.1594–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090361> [Accessed August 22, 2016].
- Orth, K., 2002. Function of the Yersinia effector YopJ. *Current opinion in microbiology*, 5(1), pp.38–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834367> [Accessed August 22, 2016].
- Park, B.S., Song, J.T. & Seo, H.S., 2011. Arabidopsis nitrate reductase activity is stimulated by the E3 SUMO ligase AtSIZ1. *Nature communications*, 2(July), p.400. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160146&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Park, H.C. et al., 2011. Identification and molecular properties of SUMO-binding proteins in Arabidopsis. *Molecules and Cells*, 32(2), pp.143–151. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10059-011-2297-3> [Accessed August 10, 2016].
- Park, H.J. et al., 2011. SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and Cells*, 32(4), pp.305–316.
- Park, H.J. & Yun, D.J., 2013. SUMO proteins grapple with biotic and abiotic stresses in Arabidopsis. *Journal of Plant Biology*, 56(2), pp.77–84.
- Pedmale, U. V., Celaya, R.B. & Liscum, E., 2010. Phototropism: Mechanism and Outcomes. *The Arabidopsis Book*, 8, p.e0125. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0125> [Accessed August 16, 2016].
- Pemberton, L.F. & Paschal, B.M., 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(3), pp.187–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702987> [Accessed August 23, 2016].
- Peng, J. & Harberd, N.P., 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current opinion in plant biology*, 5(5), pp.376–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183174> [Accessed August 17, 2016].
- Pichler, A. et al., 2005. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural & molecular biology*, 12(3), pp.264–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723079>.
- Pichler, A. et al., 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*,

108(1), pp.109–120.

- Piskurewicz, U. & Lopez-Molina, L., 2009. The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant signaling & behavior*, 4(1), pp.63–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704711> [Accessed August 17, 2016].
- Plechanovová, A. et al., 2012. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature*, 489(7414), pp.115–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842904> [Accessed August 21, 2016].
- Reeves, P.H. et al., 2002. early in short days 4, a mutation in Arabidopsis that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor FLC. *Development*, 129(23), pp.5349–5361. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12403707> <http://dev.biologists.org/content/129/23/5349.full.pdf>.
- Reiter, K. et al., 2013. Identification of biochemically distinct properties of the small ubiquitin-related modifier (SUMO) conjugation pathway in Plasmodium falciparum. *The Journal of biological chemistry*, 288(39), pp.27724–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943616> [Accessed August 5, 2016].
- Rizzini, L. et al., 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), pp.103–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454788> [Accessed August 16, 2016].
- Robbins, J. et al., 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64(3), pp.615–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991323> [Accessed August 23, 2016].
- Roden, J. et al., 2004. Characterization of the Xanthomonas AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17(6), pp.633–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195946>.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C. & Hay, R.T., 2001. SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp.12654–12659.
- Rubio, V. et al., 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & development*, 15(16), pp.2122–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511543> [Accessed August 11, 2016].
- Rytinki, M.M. et al., 2009. PIAS proteins: Pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(18), pp.3029–3041.
- Sadanandom, A. et al., 2015. SUMOylation of phytochrome-B negatively regulates light-induced signaling in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), pp.11108–11113. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/35/11108>.

- Saijo, Y. et al., 2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Development*, 17(21), pp.2642–2647. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1122903> [Accessed August 16, 2016].
- Saiki, R. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), pp.487–491. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2448875>.
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., et al., 2015. Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host and Microbe*, 18(2), pp.169–182.
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Nomoto, M., et al., 2015. Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, 18, pp.169–182. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.005> [Accessed August 14, 2016].
- Sánchez-Durán, M.A. et al., 2011. Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. *Journal of virology*, 85(19), pp.9789–800. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3196459&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Saracco, S.A. et al., Genetic Analysis of SUMOylation in Arabidopsis: Conjugation of SUMO1 and SUMO2 to Nuclear Proteins Is Essential 1[OA].
- Saracco, S. a et al., 2007. Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant physiology*, 145(1), pp.119–134.
- Schapiro, A.L. & Lois, L.M., 2016. Plant Signal Transduction. , 479, pp.79–88. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-289-2>.
- Schulman, B.A., 2011. Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 20(12), pp.1941–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012881> [Accessed August 22, 2016].
- Schwechheimer, C., 2008. Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Current opinion in plant biology*, 11(1), pp.9–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077204> [Accessed August 17, 2016].
- Seo, H.S. et al., 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, 423(6943), pp.995–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827204> [Accessed August 16, 2016].
- Sharrocks, A.D., 2006. PIAS proteins and transcriptional regulation - More than just SUMO E3 ligases? *Genes and Development*, 20(7), pp.754–758.
- Son, G.H. et al., 2014. FLC-mediated flowering repression is positively regulated by sumoylation. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), pp.339–351.

- Song, J. et al., 2004. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), pp.14373–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388847> [Accessed August 21, 2016].
- Srilunchang, K. et al., 2010. DiSUMO-like DSUL is required for nuclei positioning, cell specification and viability during female gametophyte maturation in maize. *Development (Cambridge, England)*, 137(2), pp.333–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20040499> [Accessed August 5, 2016].
- Srivastava, A.K. et al., 2016. SUMO is a critical regulator of salt stress responses in rice. *Plant Physiology*, 170(April), p.pp.01530.2015. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.15.01530>.
- Stulemeijer, I.J.E. & Joosten, M.H.A.J., 2008. Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Molecular plant pathology*, 9(4), pp.545–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18705867> [Accessed August 18, 2016].
- Sun, T.-P. & Gubler, F., 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 55, pp.197–223. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377219> [Accessed August 17, 2016].
- Sun, X. et al., 2010. Transcriptional and hormonal signaling control of Arabidopsis seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), pp.611–620. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.009>.
- Sydorsky, Y. et al., 2010. A novel mechanism for SUMO system control: regulated Ulp1 nucleolar sequestration. *Molecular and cellular biology*, 30(18), pp.4452–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937538&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Tamura, K. & Hara-Nishimura, I., 2014. Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants. *Frontiers in plant science*, 5(April), p.118. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3980095&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Tanabata, T. et al., 2012. SmartGrain: High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis. *Plant Physiology*, 160(4), pp.1871–1880.
- Tatham, M.H. et al., 2008. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*, 10(5), pp.538–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408734> [Accessed August 21, 2016].
- Thangasamy, S. et al., 2011. Rice SIZ1, a SUMO E3 ligase, controls spikelet fertility through regulation of anther dehiscence. *New Phytologist*, 189(3), pp.869–882. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2010.03538.x> [Accessed July 12, 2016].
- Tomanov, K. et al., 2014. Arabidopsis PIAL1 and 2 promote SUMO chain formation as

- E4-type SUMO ligases and are involved in stress responses and sulfur metabolism. *The Plant cell*, 26(11), pp.4547–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4277223&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Tomanov, K. et al., 2013. Small Ubiquitin-Like Modifier Conjugating Enzyme with Active Site Mutation Acts as Dominant Negative Inhibitor of SUMO Conjugation in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(1), pp.75–82.
- Truong, K., Lee, T.D., Li, B., et al., 2012. Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), pp.42611–42619.
- Truong, K., Lee, T.D. & Chen, Y., 2012. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), pp.15154–15163.
- Ueguchi-Tanaka, M. et al., 2007. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *The Plant cell*, 19(7), pp.2140–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644730> [Accessed August 17, 2016].
- Uzunova, K. et al., 2007. Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *The Journal of biological chemistry*, 282(47), pp.34167–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728242> [Accessed August 21, 2016].
- Vailleau, F. et al., 2002. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), pp.10179–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119395> [Accessed August 22, 2016].
- Vertegaal, A.C.O., 2011. Uncovering ubiquitin and ubiquitin-like signaling networks. *Chemical Reviews*, 111(12), pp.7923–7940.
- Vethantham, V. & Manley, J.L., 2009. SUMO Regulation of Cellular Processes. *Processing*, pp.41–57. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-90-481-2649-1>.
- Vierstra, R.D., 2012. The Expanding Universe of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifiers. *Plant Physiology*, 160(1), pp.2–14.
- Walden, H., Podgorski, M.S. & Schulman, B. a, 2003. Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature*, 422(6929), pp.330–334. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v422/n6929/pdf/nature01456.pdf>.
- Wang, H. et al., 2011a. OsSIZ1 Regulates the Vegetative Growth and Reproductive Development in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2), pp.411–417. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11105-010-0232-y> [Accessed July 12, 2016].
- Wang, H. et al., 2011b. OsSIZ1 Regulates the Vegetative Growth and Reproductive Development in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2), pp.411–417.

- Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11105-010-0232-y> [Accessed August 5, 2016].
- Wang, H. & Deng, X.W., 2004. Phytochrome Signaling Mechanism*. *The Arabidopsis Book*, 3, p.e0074.1. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0074.1> [Accessed August 16, 2016].
- Wang, J. et al., 2007. The intrinsic affinity between E2 and the Cys domain of E1 in ubiquitin-like modifications. *Molecular cell*, 27(2), pp.228–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643372> [Accessed August 21, 2016].
- Wasik, U. & Filipek, A., 2014. Non-nuclear function of sumoylated proteins.
- Watts, F.Z., 2013. Starting and stopping SUMOylation: What regulates the regulator? *Chromosoma*, 122(6), pp.451–463.
- Wellmer, F. et al., 2006. Genome-wide analysis of gene expression during early Arabidopsis flower development. *PLoS Genetics*, 2(7), pp.1012–1024.
- Werner, A., Flotho, A. & Melchior, F., 2012. The RanBP2/RanGAP1 *SUMO1/Ubc9 Complex Is a Multisubunit SUMO E3 Ligase. *Molecular Cell*, 46(3), pp.287–298. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.017>.
- Wilkinson, K. a. & Henley, J.M., 2012. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochemical Journal*, 428(2), pp.133–145.
- Xie, Y. et al., 2007. The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *The Journal of biological chemistry*, 282(47), pp.34176–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848550> [Accessed August 21, 2016].
- Xiong, R. & Wang, A., 2013. SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with N1b, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip mosaic virus, is required for viral infection. *Journal of virology*, 87(8), pp.4704–15. Available at: [/pmc/articles/PMC3624346/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3624346/?report=abstract).
- Xu, D. et al., 2015. Arabidopsis COP1 SUPPRESSOR 2 Represses COP1 E3 Ubiquitin Ligase Activity through Their Coiled-Coil Domains Association X. Chen, ed. *PLOS Genetics*, 11(12), p.e1005747. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005747> [Accessed August 16, 2016].
- Xu, D. et al., 2014. The RING-Finger E3 Ubiquitin Ligase COP1 SUPPRESSOR1 Negatively Regulates COP1 Abundance in Maintaining COP1 Homeostasis in Dark-Grown Arabidopsis Seedlings. *The Plant cell*, 26(5), pp.1981–1991. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24838976> [Accessed August 16, 2016].
- Xu, P. et al., 2013. AtMMS21, an SMC5/6 complex subunit, is involved in stem cell niche maintenance and DNA damage responses in Arabidopsis roots. *Plant physiology*, 161(4), pp.1755–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426194> [Accessed July 12, 2016].
- Xu, P. & Yang, C., 2013. Emerging role of SUMOylation in plant development. *Plant signaling & behavior*, 8(7), p.e24727. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3907438&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

- Xu, X. et al., 2014. PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress Photomorphogenesis in Arabidopsis. *The Plant cell*, 26(5), pp.1992–2006. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858936> [Accessed August 16, 2016].
- Xu, Y. et al., 2014. Structural insight into SUMO chain recognition and manipulation by the ubiquitin ligase RNF4. *Nature communications*, 5, p.4217. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969970> [Accessed August 21, 2016].
- Yamauchi, Y. et al., 2007. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed Arabidopsis thaliana seeds. *Plant & cell physiology*, 48(3), pp.555–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289793> [Accessed August 17, 2016].
- Yang, S.-H. et al., 2006. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal*, 25(21), pp.5083–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1630412&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Yates, G., Srivastava, A.K. & Sadanandom, A., 2016. SUMO proteases: Uncovering the roles of deSUMOylation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 67(9), pp.2541–2548.
- Yoo, C.Y. et al., 2006. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant physiology*, 142(4), pp.1548–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041025> [Accessed July 13, 2016].
- Yu, X. et al., 2010. The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis Book*, 8, p.e0135. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0135> [Accessed August 16, 2016].
- Zhang, S., Qi, Y. & Yang, C., 2010. Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21 regulates root meristem development. *Plant signaling & behavior*, 5(1), pp.53–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592809> [Accessed July 12, 2016].
- Zhao, M. et al., 2015. Arabidopsis histone demethylases LDL1 and LDL2 control primary seed dormancy by regulating DELAY OF GERMINATION 1 and ABA signaling-related genes. *Frontiers in plant science*, 6, p.159. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852712> [Accessed August 17, 2016].
- Zheng, Y., Schumaker, K.S. & Guo, Y., 2012. Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), pp.12822–12827. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202630109> [Accessed August 13, 2016].

- Zhou, W., Ryan, J.J. & Zhou, H., 2004. Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), pp.32262–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166219> [Accessed July 13, 2016].
- Zipfel, C., 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1), pp.10–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206360> [Accessed August 18, 2016].

ANEX 1.

Mas, A., Amenós, M. & Lois, L.M., 2016. Quantitative Analysis of Subcellular Distribution of the SUMO Conjugation System by Confocal Microscopy Imaging. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1450, pp.135–50.

ANEX 2.

Castaño-Miquel, L. et al., 2017. SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. Molecular Plant.

Chapter 11

Quantitative Analysis of Subcellular Distribution of the SUMO Conjugation System by Confocal Microscopy Imaging

Abraham Mas, Montse Amenós, and L. Maria Lois

Abstract

Different studies point to an enrichment in SUMO conjugation in the cell nucleus, although non-nuclear SUMO targets also exist. In general, the study of subcellular localization of proteins is essential for understanding their function within a cell. Fluorescence microscopy is a powerful tool for studying subcellular protein partitioning in living cells, since fluorescent proteins can be fused to proteins of interest to determine their localization. Subcellular distribution of proteins can be influenced by binding to other biomolecules and by posttranslational modifications. Sometimes these changes affect only a portion of the protein pool or have a partial effect, and a quantitative evaluation of fluorescence images is required to identify protein redistribution among subcellular compartments. In order to obtain accurate data about the relative subcellular distribution of SUMO conjugation machinery members, and to identify the molecular determinants involved in their localization, we have applied quantitative confocal microscopy imaging. In this chapter, we will describe the fluorescent protein fusions used in these experiments, and how to measure, evaluate, and compare average fluorescence intensities in cellular compartments by image-based analysis. We show the distribution of some components of the *Arabidopsis* SUMOylation machinery in epidermal onion cells and how they change their distribution in the presence of interacting partners or even when its activity is affected.

Key words Subcellular localization, Confocal microscopy, Fluorescence, Intensity, Quantification, SUMOylation

1 Introduction

Subcellular localization is essential to protein function since it determines the access of proteins to interacting partners and post-translational modification machineries and enables the integration of proteins into functional biological networks [1].

Fluorescence microscopy is a powerful tool to study subcellular localization, protein–protein interactions, and intracellular dynamics of fluorophore tagged proteins [2]. The use of the green fluorescent protein (GFP) and its variants for generation of fluorescent fusion proteins facilitates the *in vivo* analysis of protein

dynamics relevant to cell biological processes [3]. Usually, for analysis of subcellular localization, the translational fusion of the protein of interest with a fluorescent protein is transiently expressed in plants cells and examined with confocal microscopy.

The subcellular distribution of many proteins can be influenced by binding to other biomolecules and by posttranslational modification, including SUMOylation, phosphorylation, acetylation, ubiquitylation, farnesylation, and proteolytic processing [1]. When subcellular redistribution is only partial, changes in fluorescence intensity in specific cellular components could be difficult to visually distinguish and, to circumvent this limitation, it is highly recommended to include quantitative evaluation of fluorescence images [4]. However, few works have addressed how to obtain accurate data of protein subcellular localization by quantitative confocal microscopy analysis, since the majority of subcellular localization studies have been qualitative in nature and nonrelated to plant cell biology research.

SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) is a small protein that is covalently attached to lysine residues of target proteins via a reversible posttranslational modification. SUMO attachment is regulated by the sequential action of the heterodimer SUMO-activating E1-enzyme (SAE2/SAE1), the SUMO-conjugating E2-enzyme (SCE1), and E3-ligase enzymes [5]. As protein modifier, SUMO modulates protein activity through regulation of subcellular localization, protein activity and stability, and protein–protein interactions [6]. SUMOylation occurs predominantly in the nucleus, but nonnuclear proteins have also been identified as SUMO conjugation targets [7]. However, it is unclear whether SUMOylation enzymes are translocated out of the nucleus to catalyze SUMOylation in other cellular compartments. Interestingly, in mammals, both SUMO-E1 activating enzyme subunits have distinct functional nuclear localization signals, NLSs, although the NLS present at the E1 large subunit Uba2 is the only one required for the efficient import of the E1 complex into the nucleus [8]. Moreover, regulation of *HsE1* localization has been proposed to be also dependent on posttranslational modification by SUMO at the C-terminal domain, which would be required for its nuclear retention [9]. In addition to the SUMO machinery components, SUMO can modulate substrate subcellular localization through covalent modification of the substrate, or through noncovalent interactions mediated by SUMO interacting motifs, SIM, in the protein target, or both. A well reported example of subcellular distribution regulation by SUMO is the tumor suppressor PML. PML localizes in nuclear bodies and, in addition to be modified by SUMO, it contains a SUMO binding motif that is independent of its SUMOylation sites and necessary for nuclear bodies localization [10].

In plants, SUMO conjugation has been involved in the regulation of abiotic stress and defense responses, plant development,

and flowering [11]. The Arabidopsis SUMO E1-activating enzyme displays nuclear localization like their human and yeast orthologues, consistent with the nuclear enrichment of SUMO targets identified in different studies [12, 13]. The E1 nuclear localization is determined by a conserved NLS located at the SAE2 E1-large subunit C-terminal tail [14]. Other members of the SUMOylation machinery are also localized to the nucleus, such as the SIZ1 E3 ligase that is present in the nucleoplasm and nuclear bodies [15]; the SUMO protease ESD4 that is enriched at the periphery of the nucleus [16]; and the SUMO proteases OST1 and OST2 that also localize to the nucleus, although OST1 is exclusively localized to the nucleoplasm while OST2 displays a nuclear punctuate pattern [17]. Other members of the SUMOylation machinery display a localization distributed among the nucleus and the cytosol such as SUMO1/2 [18], the E2 conjugating enzyme [18], and the E3 ligase MMS21 [19].

This protocol describes in detail a confocal image-based method to quantify and analyze the subcellular localization of some of the Arabidopsis SUMOylation machinery components. Specifically, we show that subcellular distribution of the SUMO E2-conjugating enzyme SCE1 is sensitive to its catalytic activity and to coexpression with SUMO1. We show that SCE1 was localized preferentially in the nucleus but could be also found in the cytosolic compartment. A point mutation in the SCE1 catalytic site, SCE1C94S, prevented efficient nuclear localization, suggesting a possible coupling of the catalytic activity to subcellular distribution. On the contrary, when SCE1 and SUMO1 were coexpressed, both proteins strongly colocalized in the nucleus and a significant signal reduction was observed in the cytosol. The quantitative analysis of the obtained confocal images allowed the statistical analysis of the observed subcellular protein dynamics. In this protocol, we describe the methods involving *in vivo* transient protein expression, image acquisition, quantification, and statistical analysis.

2 Materials

2.1 Vectors

All constructs were previously generated [18] and the map is shown in Fig. 1.

1. pWEN24 encoding ECFP.
2. pWEN25 encoding EYFP.
3. pWEN24 encoding the protein fusion ECFP:SUMO1 mature form (Met1-Gly93).
4. pWEN25 encoding the protein fusion EYFP:SCE1.
5. pWEN25 encoding the protein fusion EYFP:SCE1 catalytic inactive form C94S.

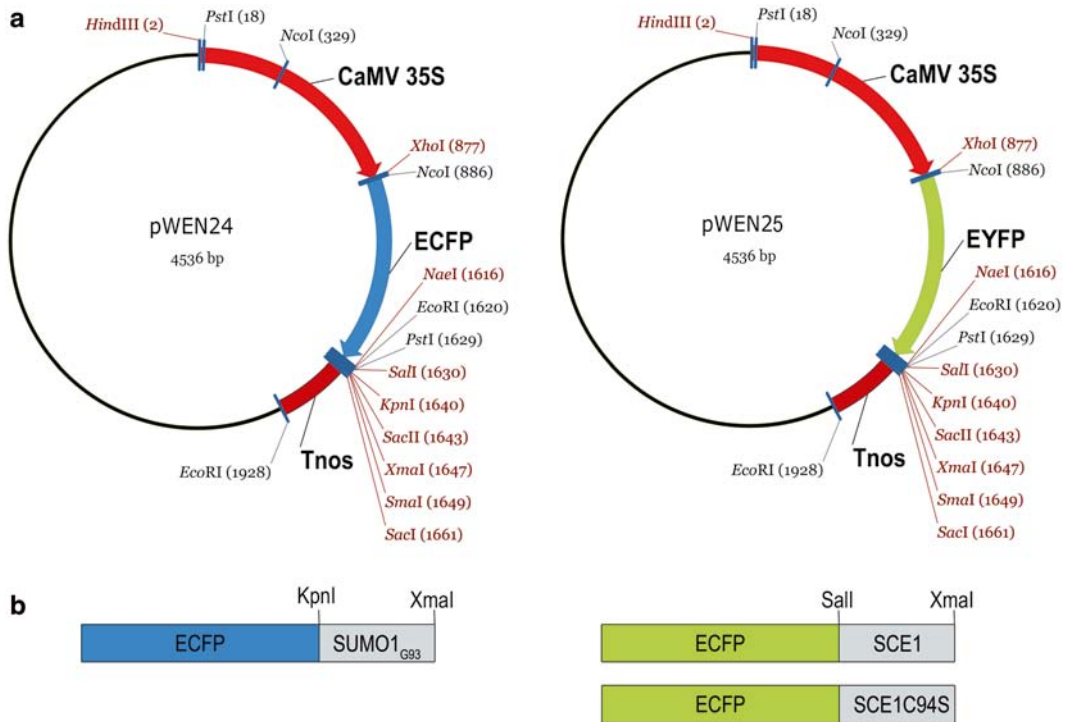


Fig. 1 Constructs used in this protocol for biolistic transient transformation. **(a)** pWEN24 (encoding the ECFP) and pWEN25 (encoding the EYFP) vectors were used as FP localization controls, and they were used for generating the ECFP::SUMO1, ECFP::SCE1, and ECFP::SCE1C94S protein fusion variants. The schematic representation of the protein fusions expressed in onion cells in this protocol are shown in panel **(b)**

2.2 Plant Tissue

Epidermis from inner onion leaves obtained at local stores (*see Note 1*).

2.3 Bombardment Equipment

1. PDS-1000/He System (BIO-RAD) Biolistic Particle Delivery System.
2. Macrocarriers Ref. 1652335, BIO-RAD.
3. Macrocarriers holders Ref. 1652322, BIO-RAD.
4. 1100 psi rupture disks Ref. 1652326, BIO-RAD.
5. Stopping screens Ref. 1652336, BIO-RAD.
6. Tungsten M17-Microcarriers Ref. 1652268, BIO-RAD.

2.4 Reagents

1. Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega) or similar.
2. Calcium Chloride Ref. C-4901 (Sigma Aldrich).
3. Spermidine Ref. S2626 (Sigma Aldrich).
4. Ethanol absolute, reagent grade ACS, ISO (Scharlau).

2.5 Microscopy Equipment

1. Surgical blades.
2. Microscope slides and cover slips.
3. Leica SPS confocal Laser Scanning Microscope.

2.6 Software

1. Leica SPS confocal software.
2. ImageJ freeware (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and MS Excel.

3 Methods

3.1 Design and Generation of Fluorescence Chimeric Proteins

Choose a fluorescence protein for protein fusion chimera construction according to the available image acquisition equipment, biological sample restrictions, structural and functional organization of the protein of interest, and experimental design. The Green Fluorescence Protein (GFP) and its color genetic variants, as for example Yellow Fluoresce Protein (YFP), Cyan Fluorescence Protein (CFP), or Red Fluorescence Protein (RFP), are widely used in subcellular localization studies. Instruments with simple optical setup can easily distinguish between fluorescence proteins having none or minimal emission overlaps. We used as example (ECFP/EYFP) for the subcellular localization quantification of our proteins of interest as described in **item 2.1**, Subheading **2** (*see Note 2*).

Proteins of interest were fused at the C-terminus of fluorescent protein using standard molecular biology techniques. As for SUMO1, only N-terminal fusions (ECFP:SUMO) can be performed since the C-terminal fusion (SUMO:ECFP) would generate a nonconjugable SUMO form that could result in localization artifacts (*see Note 3*). Protein fusion expression was regulated by the strong and constitutive CaMV 35S promoter.

3.2 Biolistic Bombardment: Microcarrier Preparation

All steps were performed at room temperature and nonsterile conditions. Purity of used reagents meets the ACS reagent grade.

1. Weigh out 60 mg of microparticles into a 1.5 ml microfuge tube.
2. Add 1 ml of 70% ethanol (v/v).
3. Vortex vigorously for 3–5 min (a platform vortex is useful).
4. Allow the particles to soak in 70% ethanol for 15 min.
5. Pellet the microparticles by spinning for 5 s in a microfuge.
6. Remove and discard the supernatant.
7. Add 1 ml of autoclaved water in order to wash microparticles.
8. Vortex vigorously for 1 min.
9. Allow the particles to settle for 1 min.
10. Pellet the microparticles by briefly spinning in a microfuge.
11. Remove the liquid and discard.
12. Repeat **7–11** two additional times.
13. After the third wash, add 1 ml of sterile 50% glycerol to bring the microparticle concentration to 30 mg/ml (*see Note 4*).

3.3 Biolistic Bombardment: Coating Washed Microcarriers with DNA

1. Vortex prepared microcarriers for 5 min on a platform vortex to resuspend and disrupt agglomerated particles (*see Note 5*).
2. Transfer 12.5 μl of microcarriers to a 1.5 ml microcentrifuge tube.
3. Add 1–2 μg of DNA in a maximum volume of 2–3 μl (*see Note 6*).
4. Add the precipitation solution (12.5 μl 2.5 M CaCl_2 and 5 μl of 0.1 M spermidine) (*see Note 7*).
5. Vortex vigorously for 3 min.
6. Allow the particles to settle for 1 min.
7. Pellet the microcarriers by spinning 5 s in a microfuge.
8. Remove the supernatant and discard.
9. Add 200 μl of 70 % ethanol.
10. Pellet the microcarriers by spinning 5 s in a microfuge.
11. Remove the supernatant and discard.
12. Add 200 μl of 100 % ethanol.
13. Pellet the microcarriers by spinning 5 s in a microfuge.
14. Remove the supernatant and discard.
15. Add 20 μl of 100 % ethanol.
16. Gently resuspend the pellet by tapping the side of the tube several times, followed by vortexing for 2–3 s (*see Note 8*).

3.4 Performing Bombardment

1. Prepare the onion samples by cutting the fresh inner leaves of the onion. Prepare three leaves for performing a triplicate transformation of each DNA sample.
2. Place the macrocarrier into the macrocarrier holder. Load 6 μl of microcarriers coated with DNA onto a macrocarrier. Prepare macrocarrier triplicates for each DNA sample (*see Note 9*).
3. Transfer selected macrocarriers to individual Petri dishes for easier handling.
4. Check helium supply, 200 psi in excess of desired rupture pressure (*see Note 10*).
5. Turn on the vacuum source and power ON the PDS-1000/He unit (*see Note 11*).
6. Load the rupture disk into retaining cap and tighten with torque wrench.
7. Load macrocarrier and stopping screen into the microcarrier launch assembly.
8. Place microcarrier launch assembly and target tissue in chamber and close door (*see Note 12*).
9. Generate vacuum in the chamber until a 27-mmHg (0.063 atm) pressure is reached and hold it (*see Note 13*).

10. Fire button continuously depressed until rupture disk burst and release Fire button (*see Note 14*).
11. Release vacuum from chamber.
12. Remove target tissue from chamber and unload macrocarrier, stopping screen from microcarrier launch assembly and broken rupture disk.
13. Repeat **steps 6–12** for each replicate.
14. Remove helium pressure from the system (after all experiments are completed).
15. Place the onion leaves over filter paper soaked in water and wrap in aluminum foil. Leave it at room temperature in the dark.

3.5 Fluorescence Protein Detection and Imaging

1. Screen plant samples under a fluorescence stereomicroscope to check if transient expression was successful 16 h after bombarding.
2. Cut with surgical blades an appropriate onion leaf piece containing cells exhibiting strong fluorescence, as a result of having a good transformation rate and expression level.
3. Remove the epidermal cell layer of the selected onion leaf area and place it on a microscopic slide containing a drop of water. Cover with a cover slip.
4. Set up all the hardware parameters and imaging settings of your confocal laser scanning microscope, and activate the sequential mode imaging in order to collect the fluorescence of coexpressed fluorophores independently (*see Note 15*).
5. Place the microscopic slide under a 20× objective in the confocal microscope in order to observe complete single onion cells.
6. Take a z-stack of a cell fixing the upper and lower limits of the z-series with a step size of 1 μm to reach the maximum cell depth (Fig. 2a) The maximum cell depth of the z-series is defined as the depth necessary for covering the maximum cell area and the whole nuclear volume (*see Note 16*).
7. Monitor image saturation degree under the imaging settings selected for EYFP imaging. Select HiLo Lut mode and scan the defined maximum cell depth for detecting saturated pixels, which appear highlighted on the screen.
8. Adjust gain parameter for generating an image displaying the minimum saturated pixels that ensure the full range quantification from 0 to 65553 in a 16 bit color depth. The presence of a portion of saturated pixels is necessary when comparing cell compartments displaying large differences in fluorescence intensities, such as nucleus versus cytosol, in order to measure significant fluorescence signal from the compartment exhibiting less intensity (the cytosol in this case).

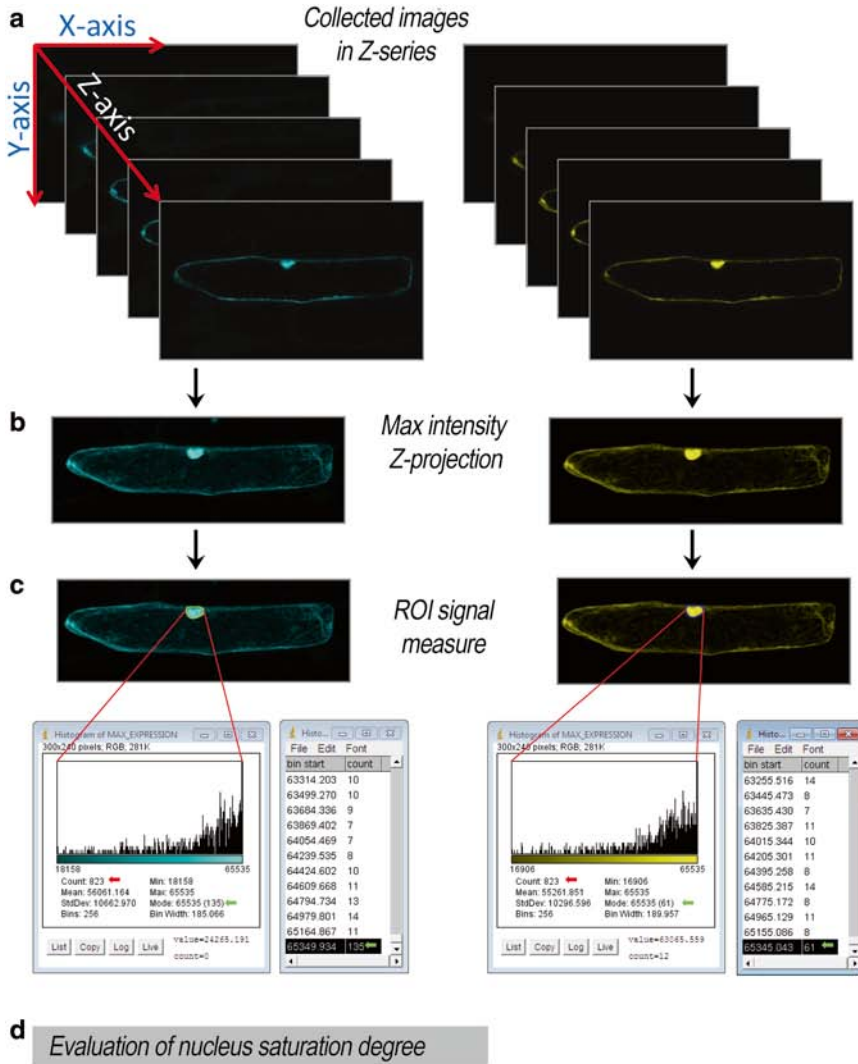
9. Repeat **steps 7–8** for ECFP imaging.
10. Collect the z-stack series for EYFP, ECFP, and transmission light.

3.6 Average Fluorescence Intensity Measurements

1. Open collected z-stack image series with ImageJ software using split channel mode (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).
2. In the main menu, select the *image/stacks/z-projection/max intensity* option for generating the maximum projection of the z-series corresponding to the cell being analyzed (Fig. 2b) (*see Note 17*).
3. Check the nucleus saturation pixel degree: draw a circular region of interest (ROI) comprising the whole nucleus by using the freehand selection tool, open the *analyze/histogram* window (Ctrl+H) and determine the portion of saturated pixels contained in the ROI (Fig. 2c) We used as a criterion not analyzing images displaying fluorescence saturation for more than 20% of captured pixels (we estimate that pixels contained in the final upper bin of the histogram display fluorescence saturation or are very close to it) (Fig. 2d) (*see step 8* in Subheading 3.3).
4. With the *drawing/freehand selection tool*, draw in the maximum intensity projection image a first region of interest (ROI1) following the perimeter of the nucleus and click on the *Add button* on the *ROI manager* window. Then make a ROI2 enclosing cytosol but excluding the nucleus and click on the *Add button* on the *ROI manager* window. Finally, make a third ROI outside of the cell as a control of the background, for which we use the same area as the cytosol (Fig. 3a), click on the *Add button* on the *ROI manager* window. To analyze ROIs of the same size, for example cytosol and background, the selected ROI can be dragged with the cursor to other region of interest.
5. From the main menu open *Analyze/Set measurements* window and select *Area* and *Mean Gray Value* in the check box list (Fig. 3b). Next, open the ROI manager window (main menu\analyze\tools) and select both check boxes (show all and labels) (Fig. 3c) (*see Note 18*).
6. On the *ROI manager* window, select all generated ROIs and click on the *Measure button*. The Results window containing the information regarding the Areas and Average intensities for the selected ROIs will open (Fig. 3d).

3.7 Statistical Analysis of Average Fluorescence Intensity

The average fluorescence intensity in specific cellular compartments such as nucleus and cytosol must be quantified for each cell as follows:



$$\% \text{ Saturation} = \frac{\text{Saturated pixels (counts contained in the final upper bin)}}{\text{Total pixels (total counts)}} * 100$$

$$\% \text{ Saturation} = \frac{135}{823} * 100 = 16.4\%$$

$$\% \text{ Saturation} = \frac{61}{823} * 100 = 7.4\%$$

Fig. 2 Imaging of fluorescence protein detection. **(a)** Collected images in Z-series. **(b)** Maximum intensity Z-projection of the image stack. **(c)** The evaluation of nucleus saturation degree is estimated using the histogram tool. The histogram is built counting 823 pixels (Count) distributed among 256 bins. **(d)** The saturation degree is calculated as the relation between the number of saturated pixels (pixels contained in the final upper bin; *green arrow*) and the total pixels (*red arrow*). For instance, in the case of the ECFP, 135 pixels displays intensities between 65349 and the upper limit 65535, comprising the 17.2% of the total pixels

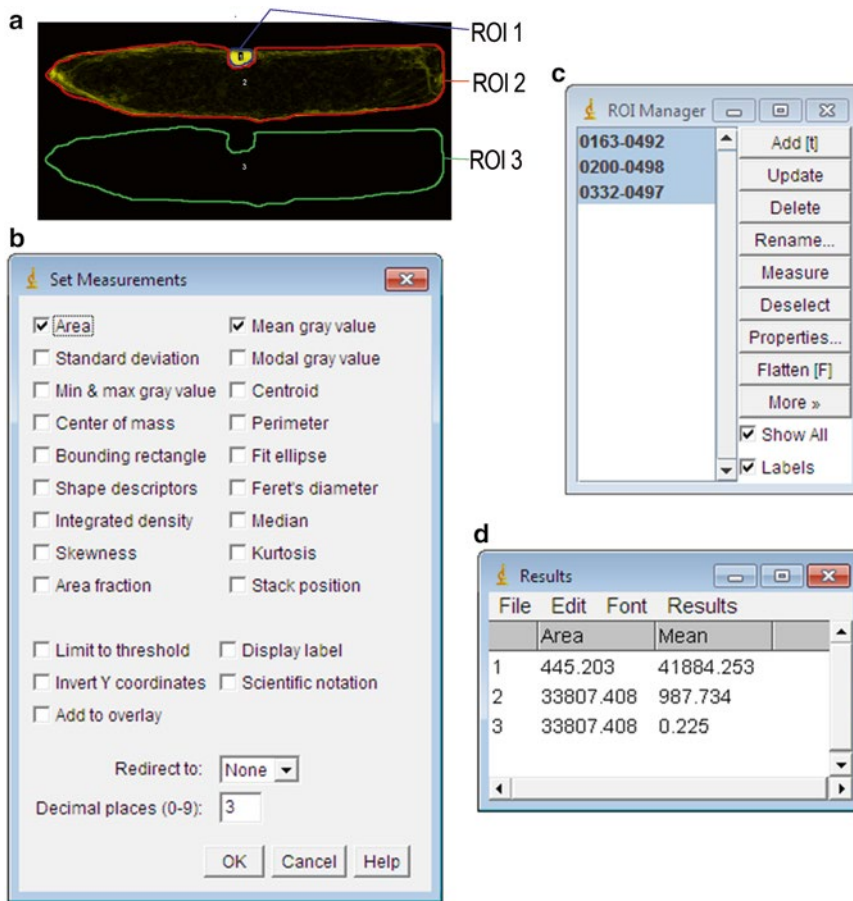


Fig. 3 Average fluorescence intensity measurement. (a) Multi ROI fluorescence intensity measurements by ImageJ. ROI1, nucleus. ROI2, cytosol. ROI 3, background. (b) *Set measurements* window. (c) *ROI manager* window with selected ROIs. (d) *Results* window displaying Area and mean intensity measurements of the selected ROIs

1. Copy data from **step 6** in Subheading 3.4 to an Excel file.
2. Remove the value of the background (BG) average to the nucleus and cytosolic mean intensity value.
3. Calculate the cytosolic and nuclear Integrated Density (ID) as the product of the cytosol or nuclear Area and the corrected Mean intensity without the background (*see Note 19*).

$$ID_{\text{nucleus}} = \text{ROI1 area} \times (\text{ROI1 mean intensity} - \text{ROI3 background intensity})$$

$$ID_{\text{cytosol}} = \text{ROI2 area} \times (\text{ROI2 mean intensity} - \text{ROI3 background intensity})$$

4. Calculate the Cytosol Fluorescence Ratio. In order to compare between different transformed cells, the Cytosol Fluorescence Ratio is calculated as a measure of the cytosolic signal enrichment.

$$\text{Cytosol Fluorescence Ratio} = \frac{\text{ID}_{\text{cytosol}}}{\text{ID}_{\text{nucleus}} + \text{ID}_{\text{cytosol}}}$$

At least seven cells must be analyzed in each transformation experiment.

5. Repeat **steps 1–3** for each fluorescence channel analyzed.
6. Calculate and plot the average of all obtained ratios and the corresponding standard errors (*see* **Note 20**).

As a practical example for the present protocol, we have analyzed the quantitative subcellular distribution of the SUMO E2 conjugating enzyme, SCE1, and evaluated the effect of SUMO coexpression and/or its catalytic activity on its localization. In Fig. 4, we show that SCE1 was localized preferentially in the nucleus but could also be found in the cytosolic compartment, consistent with a potential role for SCE1 in SUMOylating cytoplasmic proteins. A point mutation in the SCE1 catalytic site, SCE1C94S, prevented efficient nuclear localization, suggesting a possible coupling of catalytic activity to cellular localization. On the contrary, when SCE1a was coexpressed with SUMO1, both proteins colocalized strongly in the nucleus, with little signal detected in the cytoplasm. The effect of SUMO1 on SCE1 nuclear enrichment is not observed when the activity mutant SCE1C94S was coexpressed with SUMO, supporting a potential coupling of the catalytic activity to cellular localization (Fig. 4a). These observations were supported by quantitative data obtained applying the present protocol (Fig. 4b).

4 Notes

1. For biolistic bombardment assay we recommend to use fresh inner onion leaves as plant tissue because it is easy to obtain and, after peeling, it provides living cells in a monolayer, which facilitates confocal microscopy imaging. The cells of this tissue can be efficiently transformed since the microcarriers bombardment can be spread over a large homogenous area, without nonoverlying cell layers intercepting some of the particles delivered. Moreover, this tissue consists of large cells containing big nucleus and cytosol and, more interestingly, no chlorophyll interference, which makes them easy to analyze. Alternatively, *Arabidopsis* roots are also suitable for this technique.
2. Optimal transformation and expression efficiency is obtained by using small plasmids such as the ones proposed in this protocol.
3. In absence of information about structural and functional protein organization, protein fusions should be performed at FP

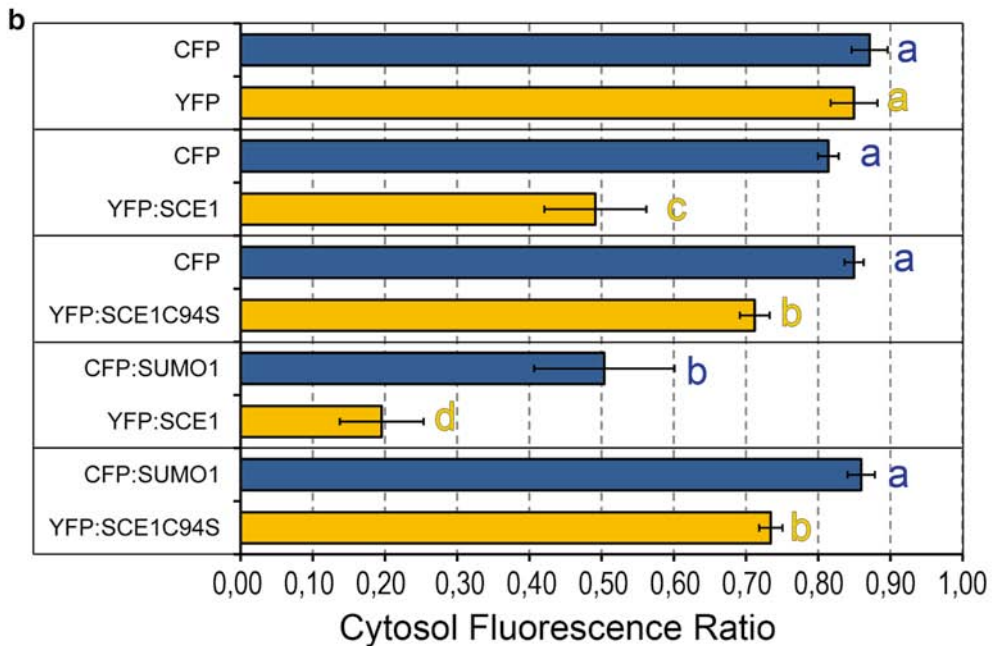
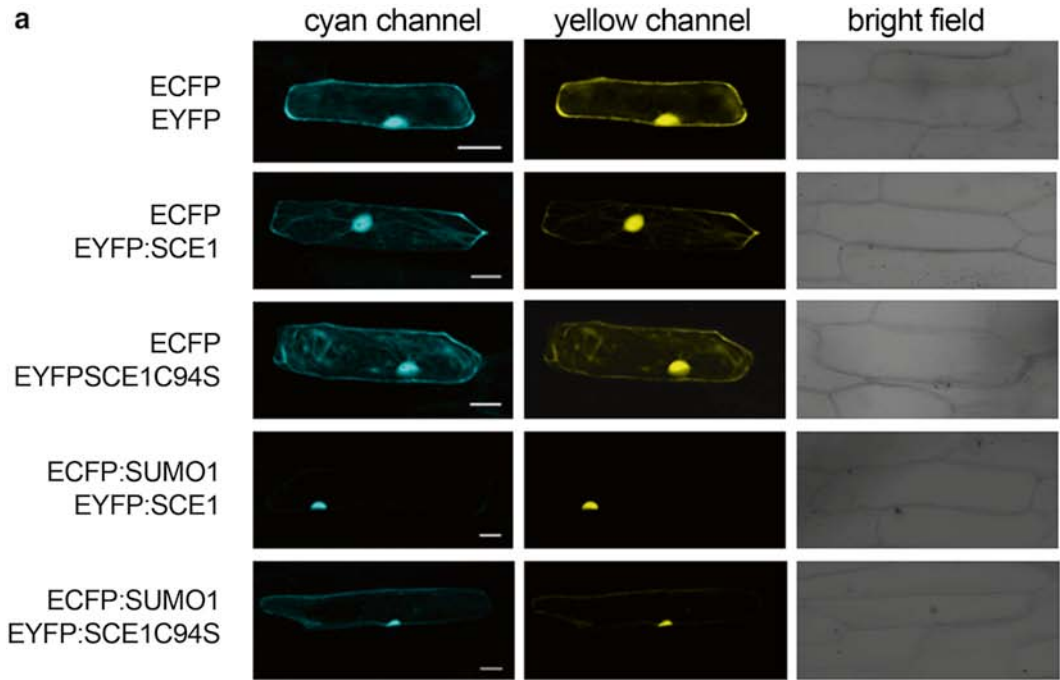


Fig. 4 Subcellular localization of *Arabidopsis* SCE1 and SUMO1. **(a)** Epidermal onion cells were transiently transformed with vectors expressing the following fluorescence proteins as indicated on the left: EYFP + ECFP, ECFP + EYFP:SCE1, ECFP + EYFP:SCE1C94S catalytic mutant, ECFP:SUMO1 + EYFP:SCE1, and ECFP:SUMO1 + EYFP:SCE1C94S catalytic mutant. Bars = 50 μ m. **(b)** Cytosol Fluorescence Ratio was measured for at least seven cells in each experiment as indicated in the present protocol. Average values and standard error are shown in the plot. *T*-test was performed for each fluorophore and letters next to the bars indicate those proteins displaying a significant distinct subcellular localization ($p \leq 0.02$)

C-terminus and N-terminus to corroborate that localization is not affected by the position of the fluorescent protein.

4. Tungsten aliquots should be stored at -20°C to prevent oxidation. Avoid using old aliquots which will reduce the transformation efficiency of the assay.
5. When removing aliquots of microcarriers, it is important to continuously vortex the tube containing the microcarriers to maximize uniform sampling. When pipetting aliquots, hold the microcentrifuge tube firmly at the top while continually vortexing the base of the tube.
6. In the case of a cotransformation, for allowing equal transformation efficiency, both plasmids must be mixed before adding the microcarriers to the DNA sample. It is also desirable to use plasmids of similar size.
7. It is highly recommended to handle spermidine in one-use aliquots since freezing can affect its stability as well as transformation efficiency of the assay.
8. The DNA-coated microcarriers can be stored at -20°C for few days, although is better to use it immediately.
9. The edge of the macrocarrier should be securely inserted under the lip of the macrocarrier holder. In case that there are not enough macrocarrier holders for all the samples, DNA-coated microcarriers can be loaded on the macrocarrier and transfer to the holder before performing the bombardment (in this case, we keep the prepared macrocarriers in Petri dishes labeled according to the DNA construct used).
10. 1100 psi rupture disks are recommended for plant tissues so the helium supply should have a pressure of 1300 psi.
11. It is recommended that vacuum generation and release are performed at the highest speed.
12. One of the most important parameters to optimize is target shelf placement within the bombardment chamber. This placement directly affects the distance that the microcarriers travel to the target cells for microcarrier penetration and transformation. We recommend starting with the closest second position to the stopping screen.
13. Set the vacuum switch on the PDS-1000/He (middle red control switch) to VAC position. When the desired vacuum level is reached, hold the chamber vacuum at that level by quickly pressing the vacuum control switch through the middle VENT position to the bottom HOLD position.
14. With the vacuum level in the bombardment chamber stabilized, press and hold the FIRE switch to allow helium pressure to build inside the gas acceleration tube that is sealed by a selected rupture disk. A small pop will be heard when the rupture

disk burst. The rupture disk should burst within 10% of the indicated rupture pressure and within 11–13 s. Release the FIRE switch immediately after the disk ruptures to avoid wasting helium.

15. For accurate quantitative evaluation and comparison of average fluorescence intensities, we recommend using a confocal microscopy with high chromatic resolution with 16 Bits and 65535 grey levels. It is also highly recommended to take images with the same hardware parameters such as objective, laser power, pinhole opening, gain, offset values, and zoom factor as well as to prepare and analyze all experimental variants at the same time under the same conditions. All of this will allow reducing the influence of experimental conditions on the fluorescence intensity measurement and quantification. Regarding to laser power, adjust the intensity in order to avoid photodamage and photobleaching of the fluorescence. Try to use the minimum amount of laser power to get sufficient signal at gain levels that not result in too much background (700–800av). To enhance the quality of your image acquisition, a double scan or an average line of two from the image acquisition set up is recommended since it will diminish the background. The pinhole aperture can be increased if photodamage is observed due to laser illumination or if electronic noise occurs when the photomultiplied gain is increased. Take into account that the more you open the pinhole the more noise fluorescence you have, losing confocality.
16. To eliminate the influence of the imaging depth on the fluorescence intensity, avoid plant cells with the nucleus located deeper, and start the z-series from the surface of the cell, otherwise the quality of images collected from deeper layers is worse due to the dispersion of laser light and the quantification and comparison of fluorescence intensity will be not appropriate. We have consider the maximum cell depth of the z-series as the depth necessary for covering the maximum cell area and the whole nuclear volume since we assume that half of the cell is more or less symmetrical to the other half. The main advantage of this maximum cell depth set up consists in a reduction of layer number in the z-series, which translates into shorter acquisition time and fluorescence photobleaching decrease.
17. In this method we perform the fluorescence intensity quantification in a maximum intensity projection, which is defined as an output image each of whose pixels contains the maximum value over all images in the stack at the particular pixel location.
18. The area is defined as the area of selection in square pixels. The Mean Grey Value, or average intensity, is the sum of the gray values of all the pixels in the selection divided by the number of pixels.

19. Integrated Density (ID) is an appropriate descriptor that allows comparing the cytosolic and nucleus intensity within cells with different size.
20. Perform statistical analysis applying the T-test (significant differences are considered when $p \leq 0.02$).

Acknowledgments

This work was supported by the European Research Council (grant ERC-2007-StG-205927) and Departament d'Innovació, Universitats i Empresa from the Generalitat de Catalunya (Xarxa de Referència en Biotecnologia and 2014SGR447). A.M. was supported by predoctoral fellowships FPU12/05292. This article is based upon work from COST Action (PROTEOSTASIS BM1307), supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). We thank Reyes Benlloch for critical reading.

References

1. Hung MC, Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 124(Pt 20):3381–3392. doi:10.1242/jcs.089110
2. Waters JC (2009) Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 185(7):1135–1148. doi:10.1083/jcb.200903097
3. Hanson MR, Kohler RH (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* 52(356):529–539
4. Lichocka M, Schmelzer E (2014) Subcellular localization experiments and FRET-FLIM measurements in plants. *Bio Protoc* 4(1):e1018, <http://www.bio-protocol.org/e1018>
5. Ulrich H (2009) The SUMO system: an overview. In: Ulrich H (ed) *SUMO protocols*, vol 497, *Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 3–16. doi:10.1007/978-1-59745-566-4_1
6. Wilkinson KA, Henley JM (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428(2):133–145
7. Wasik U, Filipek A (2014) Non-nuclear function of sumoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843(12):2878–2885. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.07.018
8. Moutty MC, Sakin V, Melchior F (2011) Importin alpha/beta mediates nuclear import of individual SUMO E1 subunits and of the holo-enzyme. *Mol Biol Cell* 22(5):652–660
9. Truong K, Lee TD, Li BZ, Chen Y (2012) Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *J Biol Chem* 287(51):42611–42619. doi:10.1074/jbc.M112.420877
10. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24(3):331–339. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.013
11. Lois LM (2010) Diversity of the SUMOylation machinery in plants. *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1):60–64. doi:10.1042/BST0380060
12. Miller MJ, Scaf M, Rytz TC, Hubler SL, Smith LM, Vierstra RD (2013) Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* 12(2):449–463
13. Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua Z, Vierstra RD (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16512
14. Castaño-Miquel L, Seguí J, Manrique S, Teixeira I, Carretero-Paulet L, Atencio F, Lois LM (2013) Diversification of SUMO-activating enzyme in Arabidopsis: implications in SUMO conjugation. *Mol Plant* 6(5):1646–1660. doi:10.1093/mp/sst049
15. Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses.

- Proc Natl Acad Sci U S A 102(21): 7760–7765
16. Murtas G, Reeves PH, Fu YF, Bancroft I, Dean C, Coupland G (2003) A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell* 15(10):2308–2319
 17. Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P, Sadanandom A (2008) Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(10):2894–2908
 18. Lois LM, Lima CD, Chua NH (2003) Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 15(6): 1347–1359
 19. Huang L, Yang S, Zhang S, Liu M, Lai J, Qi Y, Shi S, Wang J, Wang Y, Xie Q, Yang C (2009) The Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *Plant J* 60(999A): 666–678

SUMOylation Inhibition Mediated by Disruption of SUMO E1-E2 Interactions Confers Plant Susceptibility to Necrotrophic Fungal Pathogens

Laura Castaño-Miquel, Abraham Mas, Inês Teixeira, Josep Seguí, Anna Perearnau, Bhagyasree N. Thampi, Arnaldo L. Schapire, Natalia Rodrigo, Gaele La Verde, Silvia Manrique, Maria Coca and L. Maria Lois*

Center for Research in Agricultural Genomics – CRAG, Edifici CRAG-Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), 08193 Barcelona, Spain

*Correspondence: L. Maria Lois (maria.lois@cragenomica.es)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.007>

ABSTRACT

Protein modification by SUMO modulates essential biological processes in eukaryotes. SUMOylation is facilitated by sequential action of the E1-activating, E2-conjugating, and E3-ligase enzymes. In plants, SUMO regulates plant development and stress responses, which are key determinants in agricultural productivity. To generate additional tools for advancing our knowledge about the SUMO biology, we have developed a strategy for inhibiting *in vivo* SUMO conjugation based on disruption of SUMO E1-E2 interactions through expression of E1 SAE2^{UFDCt} domain. Targeted mutagenesis and phylogenetic analyses revealed that this inhibition involves a short motif in SAE2^{UFDCt} highly divergent across kingdoms. Transgenic plants expressing the SAE2^{UFDCt} domain displayed dose-dependent inhibition of SUMO conjugation, and have revealed the existence of a post-transcriptional mechanism that regulates SUMO E2 conjugating enzyme levels. Interestingly, these transgenic plants displayed increased susceptibility to necrotrophic fungal infections by *Botrytis cinerea* and *Plectosphaerella cucumerina*. Early after fungal inoculation, host SUMO conjugation was post-transcriptionally downregulated, suggesting that targeting SUMOylation machinery could constitute a novel mechanism for fungal pathogenicity. These findings support the role of SUMOylation as a mechanism involved in plant protection from environmental stresses. In addition, the strategy for inhibiting SUMO conjugation *in vivo* described in this study might be applicable in important crop plants and other non-plant organisms regardless of their genetic complexity.

Key words: SUMO inhibition, development, flowering, necrotrophic fungi, E1-activating enzyme, E1-E2 interaction disruption

Castaño-Miquel L., Mas A., Teixeira I., Seguí J., Perearnau A., Thampi B.N., Schapire A.L., Rodrigo N., La Verde G., Manrique S., Coca M., and Lois L.M. (2017). SUMOylation Inhibition Mediated by Disruption of SUMO E1-E2 Interactions Confers Plant Susceptibility to Necrotrophic Fungal Pathogens. *Mol. Plant*. ■ ■, 1–12.

INTRODUCTION

In response to external and internal cues, plants develop finely tuned growth programs adapted to environmental conditions and developmental stage (Naseem et al., 2015). Protein post-translational regulation by small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation has emerged as a major molecular mechanism regulating plant growth and stress responses. As ubiquitin, SUMO is attached to protein targets through sequential reactions catalyzed by the E1, E2, and E3 enzymes (Gareau and Lima, 2010). SUMO proteases are responsible for SUMO maturation and deconjugation (Gareau and Lima, 2010).

SUMO activation is a two-step ATP-dependent reaction catalyzed by the heterodimeric E1-activating enzyme, SAE2/SAE1, which is the first control point to enter the conjugation cascade (Supplemental Figure 1) (Walden et al., 2003; Castaño-Miquel et al., 2011). SAE2 is structured in four functional domains: adenylation, catalytic cysteine (SAE2^{Cys}), ubiquitin-fold (domain structurally resembling ubiquitin, SAE2^{UFDCt}), and C-terminal (SAE2^{Ct}) domains (Lois and Lima, 2005). The E1 activating

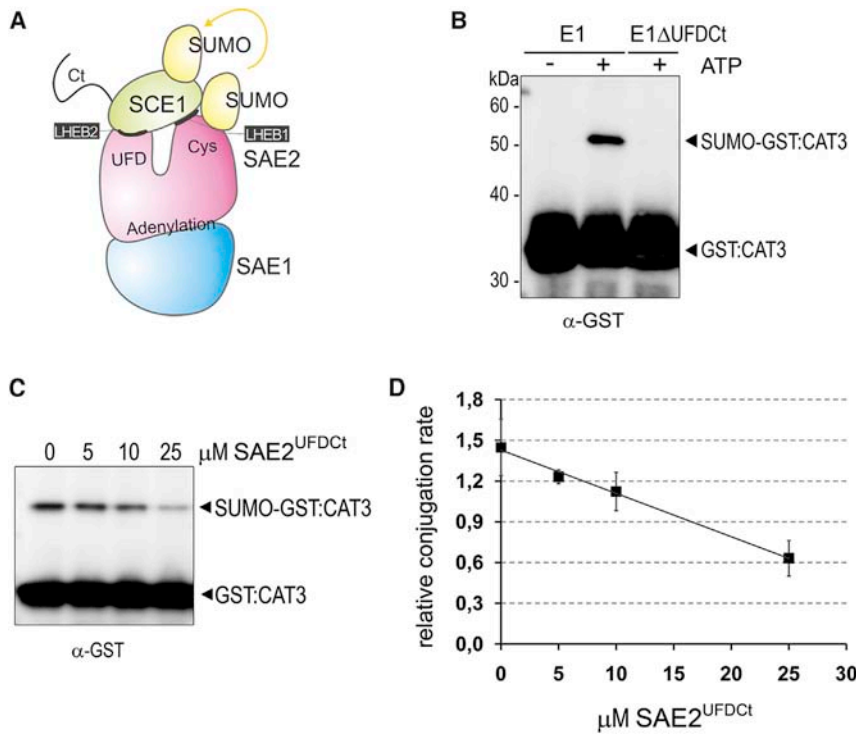


Figure 1. Engineering SUMO Activating Enzyme Large Subunit, SAE2, for SUMOylation Inhibition by Blocking E1 (SAE2/SAE1) and E2 (SCE1) Interactions.

(A) Schematic representation of protein-protein interactions during SUMO transfer from the E1 to the E2.

(B) SAE2^{UFDct} domain (Ser436-Glu625) is essential for SUMO conjugation *in vitro*. SUMOylation assays were performed in the presence of *Arabidopsis* E1 (SAE2/SAE1a) or the deletion mutant E1ΔUFDct (SAE2 ΔUFDct/SAE1a), SUMO2, SCE1, and GST:CAT3Ct as substrate. Reactions in the absence of ATP were performed as negative control. Reaction mixtures were incubated at 37°C and stopped after 15 min of incubation. Reaction products were resolved by SDS-PAGE and examined by immunoblot analysis with anti-GST antibodies.

(C and D) SAE2^{UFDct} inhibits SUMO conjugation *in vitro*. **(C)** SUMOylation assays were performed at 37°C in the presence of E1, SUMO2, SCE1, and GST:CAT3Ct as a substrate, and in the absence or increasing amounts of SAE2^{UFDct}. Reaction mixtures were stopped after 30 min and products were analyzed as in **(B)**. Reactions were performed in quadruplicates and relative GST:CAT3Ct sumoylation quantified. Average values and SEM bars are plotted on the graph **(D)**.

enzyme small subunit, SAE1, contributes the essential Arg21 to the adenylation domain (Lee and Schindelin, 2008). The adenylation domain is responsible for SUMO recognition and SUMO C-terminal adenylation. After adenylation, the SUMO C-terminal adenylate establishes a thioester bond with the E1 catalytic cysteine. Following thioester bond formation, SUMO can be transferred to the E2-conjugating enzyme in a reaction that involves E2 recruitment through the two interacting surfaces (Lois and Lima, 2005; Wang et al., 2007, 2010; Reiter et al., 2015) (Figure 1A). On one hand, the SAE2^{UFD} domain establishes contacts with residues located at the α1-helix and the β1β2-loop of the E2 conjugating enzyme (Wang et al., 2009, 2010; Reiter et al., 2015). On the other, the SAE2^{Cys} domain interacts with residues located at the E2 α4 N-terminus (Wang et al., 2007). Although both interactions surfaces involved SAE2 residues present in loops, SAE2^{UFD}-E2 interactions display higher affinity ($K_D = 1.2 \mu\text{M}$) (Reiter et al., 2013) than SAE2^{Cys}-E2 interactions ($K_D = 80 \mu\text{M}$) (Wang et al., 2007), supporting a major role of the SAE2^{UFD} domain in E2 recruitment. Even though the SAE2^{UFD} domain is essential in yeast (Lois and Lima, 2005), it remains unclear whether SAE2^{UFD} is sufficient for efficient E2 recruitment *in vivo*.

In plants, SUMOylation has been shown to modulate plant hormone signaling (Lois et al., 2003; Miura et al., 2009; Conti et al., 2014), root stem cell maintenance (Xu et al., 2013), and responses to abiotic and biotic stress (Lois, 2010). Many of the plant biological processes regulated by SUMOylation have been uncovered by the analysis of proteases and SUMO E3 ligase mutant plants, which display pleiotropic growth defects and reduced viability (Murtas et al., 2003; Miura et al., 2005; Huang et al., 2009; Ishida et al., 2009). Nonetheless, some of these mutations have also been proposed to confer adaptive

responses to some stresses, such as salt, drought, resistance to plant viruses, and salicylic acid-mediated plant immunity (Yoo et al., 2006; Lee et al., 2007; Miura et al., 2011, 2013; Saleh et al., 2015).

Despite the important agronomic traits regulated by SUMO, most research studies on SUMOylation have been mainly limited to model plants, such as *Arabidopsis* and rice (Wang et al., 2011), due to the lack of molecular tools specific to other economically relevant plants. On the other hand, plants harboring mutations in main components of the SUMOylation machinery, such as *Arabidopsis* *siz1* (Miura et al., 2010), *mms21* (Huang et al., 2009; Ishida et al., 2009), or *esd4* (Murtas et al., 2003), display severe growth defects that are dependent on salicylic acid accumulation (Miura et al., 2010; Villajuana-Bonequi et al., 2014). The development of tools alternative to null mutants are of great interest in overcoming these technical constraints.

Considering the relevance of SUMO as a major post-translational modification, it is expected that novel biological functions regulated by SUMO remain to be uncovered. Necrotrophic pathogens, such as *Botrytis cinerea* and *Plectosphaerella cucumerina*, promote host cell death to acquire nutrients for proliferation on dead and decaying tissues. Defense responses regulated by the salicylic acid-dependent pathway and associated to programmed cell death are effective against biotrophic pathogens; however, they benefit necrotrophic pathogens. Control of necrotrophic infections is achieved by a different set of defense responses activated by jasmonic acid and ethylene signaling (Glazebrook, 2005). Despite recent progress, how plants perceive and respond to necrotrophy is behind our understanding of plant responses to biotrophy (Mengiste, 2012).

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

Molecular Plant

Here, we have developed an innovative strategy for inhibiting SUMO conjugation *in vivo* as an alternative to knock-out mutants, which are lethal, in the case of E1-activating and E2-conjugating enzymes, or display strong pleiotropic phenotypes, in the case of E3 ligases. We have shown that SAE2^{UFD^{Ct}} functions as a SUMO conjugation inhibitor both *in vitro* and *in vivo* in a dose-dependent manner, through a mechanism based on its ability to establish non-covalent interactions with the SUMO E2-conjugating enzyme. Our results showed that the SAE2^{UFD^{Ct}} domain is sufficient for E2 recruitment *in vivo*, providing a novel molecular target for developing small molecule SUMO conjugation inhibitors. SAE2^{UFD^{Ct}} expression is robust and stable through plant generations, and has allowed a novel post-transcriptional regulation of *in vivo* SUMO E2-conjugating enzyme levels to be uncovered. In addition, the study of these plants has facilitated the identification of a novel role of SUMO in defense responses against necrotrophic fungal pathogens. The use of SAE2^{UFD^{Ct}} expressing lines have provided an advantage over the use of *siz1* E3 ligase knock-out mutants by allowing the analysis of plant susceptibility to fungal pathogens under different degrees of SUMOylation inhibition. Our results indicate that SUMOylation is required for resistance to necrotrophic fungal attacks. During infection, free and conjugated SUMO, the E1-activating enzyme large subunit SAE2, and the E2-conjugating enzyme SCE1 diminished. In summary, we provide a novel strategy for SUMOylation inhibition that is easy to implement in any transformable plant regardless of its genetic complexity, which has been validated by uncovering a novel regulatory role of SUMO in defense responses to necrotrophic fungi. Our findings suggest that depleting host SUMO conjugation machinery could constitute a novel mechanism for fungal pathogenicity.

RESULTS

SAE2^{UFD^{Ct}} Is Essential for *Arabidopsis* SUMO E1 Activity and, as Independent Domain, Inhibits SUMO Conjugation

To develop an innovative strategy for inhibiting SUMOylation that could be easily implemented in any transformable organism of interest, plant, or animal, we have exploited the disruption of SUMO E1-activating and E2-conjugating enzyme interactions (Figure 1A). Previous studies identified two independent regions in the SUMO E1 large subunit SAE2 involved in E2 interactions located at the SAE2 Cys domain and ubiquitin-fold domain (UFD), respectively. We performed comparative analyses of SAE2 protein orthologs from human, yeast, and *Arabidopsis*, and found that SAE2 regions involved in E2 interactions exhibited a conservation degree from two- to six-fold lower than the conservation displayed by the SAE2 domains in which they are contained, the full UFD or full Cys domain, respectively (Supplemental Figure 2). This localized divergence suggests that these regions, which we have named LHEB1 and LHEB2 (low homology region involved in E2 binding 1 and 2), have optimized cognate interactions across evolution. From the E2 side, the region involved in SAE2 binding is better conserved across species and also participates in SUMO non-covalent interactions (Wang et al., 2010), which are necessary for polySUMO chain formation (Capili and Lima, 2007; Knipscheer et al., 2007; Castaño-Miquel et al., 2011). To avoid interfering with protein-protein interactions other than E1-E2 interactions, we designed a strategy based on SAE2^{UFD^{Ct}}

domain engineering. The SAE2^{UFD^{Ct}} domain includes residues from Ser436 to Glu625. In SUMO conjugation assays *in vitro*, the *Arabidopsis* SAE2^{UFD^{Ct}} domain is essential for SUMO conjugation and, when included as an independent domain in the assays, the SAE2^{UFD^{Ct}} domain displayed the capacity to inhibit SUMO conjugation in a dose-dependent manner (Figure 1C and 1D). The SAE2^{UFD^{Ct}} domain was also competent to inhibit SUMOylation of SCE1, which further supports the role of the SAE2^{UFD^{Ct}} domain in the direct disruption of E1-E2 interactions (Supplemental Figure 4).

The SAE2^{UFD^{Ct}} LHEB2 Region Has a Major Role in SAE2^{UFD^{Ct}}-SCE1 Non-covalent Interactions

Previous structural studies suggested that yeast LHEB2 establishes hydrophobic and ionic interactions with Ubc9 (yeast SUMO E2 enzyme), which involve one Leu and two Asp residues, respectively (Wang et al., 2010). Due to the low homology between *Arabidopsis* and yeast LHEB2 regions (6% of sequence identity), it was not possible to unequivocally identify the corresponding functional residues in *Arabidopsis* SAE2. Instead, we performed comparative analyses of LHEB2 sequence conservation among plant SAE2 orthologs and their corresponding UFD domain assigned according to sequence homology. The identified SAE2^{UFD} sequences were realigned and the resulting alignment was used to perform phylogenetic analyses of the UFD (Supplemental Figure 3A) or the LHEB2 domain (Figure 2A) sequences. The resulting parsimony phylogenetic trees showed that the evolutionary relationships among the SAE2^{UFD} domain sequences were consistent with taxonomic lineages. On the contrary, when the evolutionary relationship between LHEB2 sequences was analyzed, the resulting clades were not consistent with taxonomic lineages (Supplemental Figure 3B and 3C), supporting the hypothesis that the LHEB2 domain has undergone higher diversification than the overall SAE2 sequence. The LHEB2 consensus sequence was determined for angiosperms, lower plants, and algae (Figure 2B), and their comparative analysis showed that the LHEB2 domain displayed differences in sequence length and composition among these evolutionary groups.

From the angiosperm LHEB2 consensus sequence, we selected hydrophobic and acidic amino acid residues that could potentially be involved in E2 binding according to previous reports in yeast (Wang et al., 2010) (Figure 2B and Supplemental Figure 2). To analyze the role of the selected residues in E2 binding, we introduced four single mutations into SAE2^{UFD^{Ct}}, L476A, L477A, D485A, and D486A, and tested their effect in SAE2^{UFD^{Ct}}-E2 interactions in pull-down assays *in vitro*. All SAE2^{UFD^{Ct}} mutant forms were impaired in E2 binding, although this defect was more prominent in L476A and D485A mutant forms (Figure 2C and 2D). These results were consistent with a major role of polar and hydrophobic interactions in E2 binding. Also, these results showed that amino acid residues in SAE2^{UFD^{Ct}} LHEB2 are crucial for establishing SUMO E1-E2 interactions.

Constitutive Expression of SAE2^{UFD^{Ct}} Domain Confers Attenuated Developmental Defects Displayed by SUMOylation-Impaired Plants

To test the capacity of the SAE2^{UFD^{Ct}} domain to inhibit SUMO conjugation *in vivo*, we generated transgenic plants expressing *Arabidopsis* SAE2^{UFD^{Ct}} domain under the control of the CaMV

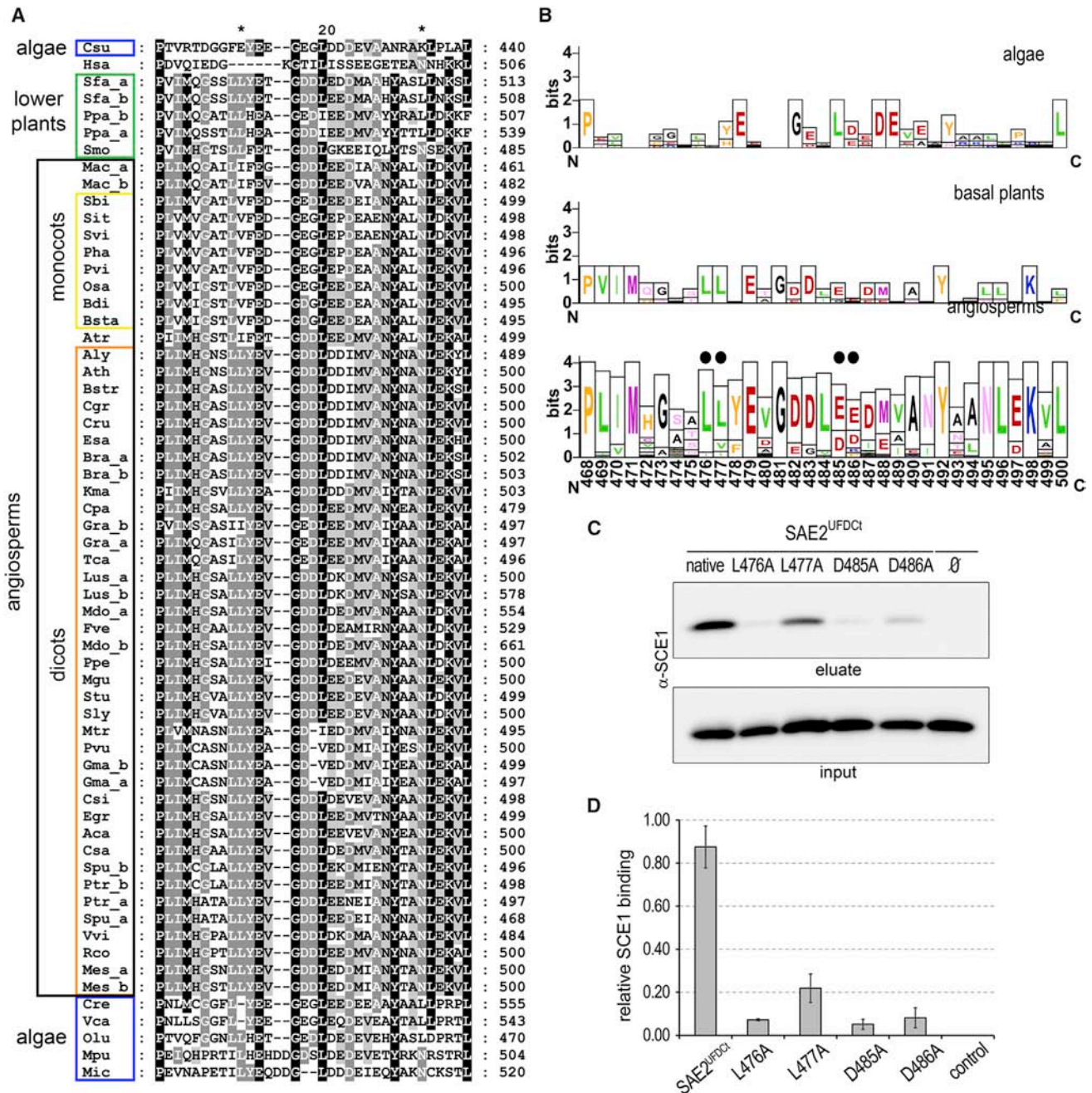


Figure 2. Molecular Analysis of SAE2^{UFD_{C1}}-SCE1 Interactions.

(A) Viridiplantae (green algae and land plants) SAE2 LHEB2 sequence alignment. Sequence identity is indicated by black background and white letters (90%), gray background and white letters (70%), and light-gray background and black letters (50%). Gaps in the alignment due to insertions or deletions are indicated by dashed lines. Residue numbers are shown to the right side of the sequences. Sequence names correspond to the first letter of the genus followed by the two first letters of the species (e.g., *Arabidopsis thaliana*, *Ath*). Sequences are listed in Supplemental Table 1.

(B) Graphical representation of plant LHEB2 consensus sequence determined from dicot and monocot SAE2^{UFD_{C1}} sequence alignment. The overall height of the stack indicates the sequence conservation at that position, while the height of symbols within the stack indicates the relative frequency of each amino acid at that position. Amino acids predicted to have a role in SAE2^{UFD_{C1}}-E2 interactions are indicated by black dots.

(C) *In vitro* polyHis pull-down assay of *Arabidopsis* SCE1 using His:SAE2^{UFD_{C1}} or its mutant variants as a bait. Incubations in the absence of the bait were used as negative controls (∅).

(D) Aliquots of input and eluate fractions were resolved by SDS-PAGE and SCE1 levels were analyzed by immunoblotting. Assays were performed in triplicates and relative SCE1 levels quantified. Average values and SE bars are plotted on the graph.

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

Molecular Plant

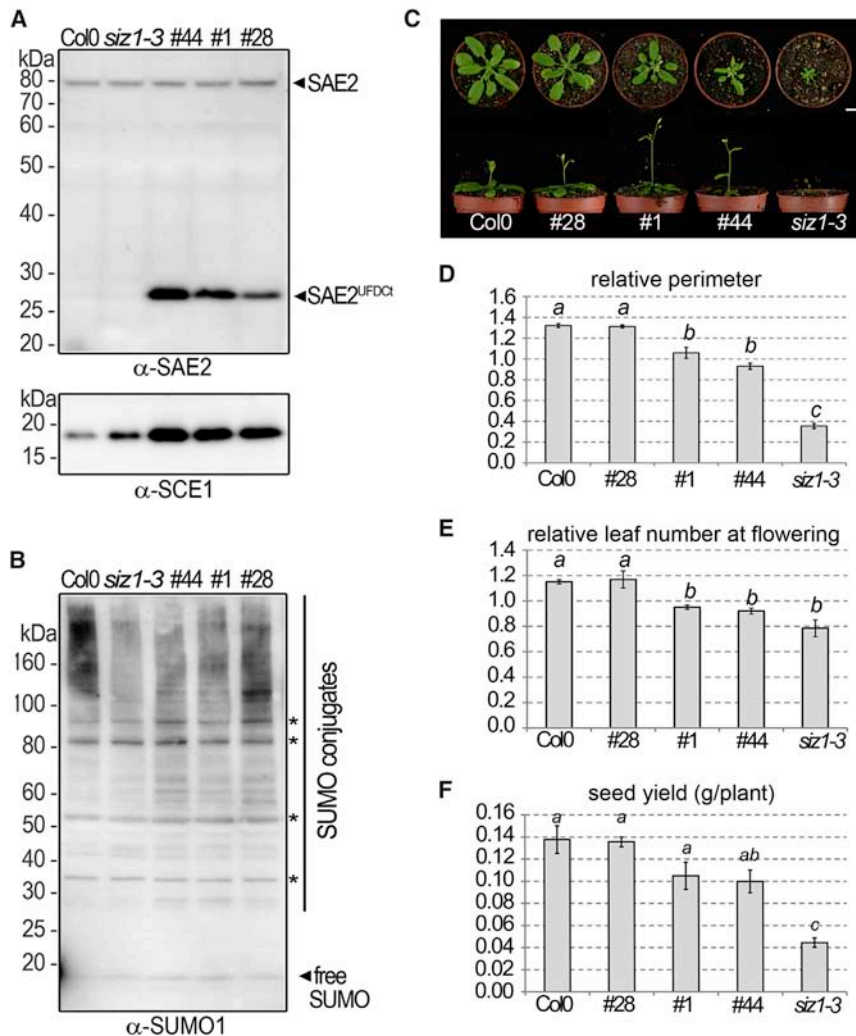


Figure 3. Effect of SAE2^{UFDct} Expression in Endogenous SUMO Conjugation and Plant Development.

(A and B) Effect of SAE2^{UFDct} expression on SUMO conjugates SAE2 and SCE1 levels. Total protein extracts from 4-day-old seedlings were resolved by SDS-PAGE and examined by immunoblot analysis with (A) anti-SAE2, anti-SCE1, and (B) anti-SUMO1 antibodies. Bands that are not significantly reduced in SUMOylation-deficient plants are indicated by asterisks.

(C) Developmental stage of 3-week-old plants grown under long-day conditions. Scale bar represents 1 cm. Top and lateral views of representative plants are shown.

(D) Rosette perimeter according to ellipse perimeter defined by the three most external leaf tips from each rosette. Average values and SEM from relative values obtained in four biological replicates are plotted on the graph.

(E) Rosette leaf number at flowering was scored when the inflorescence had reached 1 cm. Average values and SEM from relative values obtained in four biological replicates are plotted on the graph.

(F) Seeds were harvested from individual fully dried plants and their weight measured. Average values and SEM from relative values obtained in three biological replicates are plotted on the graph. *t*-Test was performed, and groups with the same letter denote no statistically significant differences between them ($p > 0.05$).

35S promoter. Among the obtained transgenic plants, three independent lines expressing from lower to higher levels of SAE2^{UFDct}, #28, #1, and #44, were selected for further characterization (Figure 3A, top). In these plants, accumulation of SUMO conjugates was diminished in direct relation to SAE2^{UFDct} expression levels (Figure 3B and Supplemental Figure 5). As controls, we included Columbia-0 (Col-0) and *siz1-3* mutant plants, which displayed the highest and the lowest SUMO conjugate accumulation levels among the analyzed lines, respectively. Remarkably, SCE1 levels were significantly increased in these plants (Figure 3A, bottom), and this increment was proportional to SAE2^{UFDct} expression levels. In contrast, SAE2 endogenous levels were not altered. The analysis of mRNA SCE1 levels revealed no significant differences between SUMOylation-impaired plants and control Col-0 plants (Supplemental Figure 7), suggesting that regulation of endogenous SCE1 protein levels would involve a novel post-transcriptional mechanism.

The phenotypic analysis showed that SAE2^{UFDct}-expressing plants displayed developmental alterations present in SUMOylation-deficient plants, such as reduced plant size (Figure 3C and 3D), early flowering (Figure 3E), and reduced

seed yield (Figure 3F) (Lois, 2010). The extent of these alterations was consistent with a gradual SUMO conjugation inhibition between the different transgenic lines and was maintained through generations. In addition, SAE2^{UFDct} expression impaired desiccation-induced SUMO conjugate accumulation and conferred plant susceptibility to drought (Supplemental Figure 6), both responses characteristic of the SUMO E3 ligase mutant *siz1-3* (Catala et al., 2007).

At the molecular level, we characterized the capacity of SAE2^{UFDct} to interact with SCE1 as a mechanism of SUMO conjugation inhibition. In transient expression experiments in onion cells, SCE1 localized to the nucleus and the cytosol while the SAE2^{UFDct} domain localized exclusively to the nucleus, which is consistent with the presence of a nuclear localization signal in the SAE2 C-terminal tail (Castaño-Miquel et al., 2013). When SAE2^{UFDct} and SCE1 were co-expressed, SCE1 localized exclusively to the nucleus, suggesting that the SCE1 cytosolic fraction was recruited to the nucleus by SAE2^{UFDct} (Figure 4A). To further test the SAE2^{UFDct}-E2 interactions *in vivo*, we performed immunoprecipitation assays in protein extracts from line #44 of SAE2^{UFDct}-expressing plants. The SUMO-E2-conjugating enzyme SCE1 was specifically co-immunoprecipitated when anti-SAE2 antibodies were used, but not in the presence of pre-immunization antibodies, further supporting that the SAE2^{UFDct} domain is competent for E2 recruitment *in vivo* (Figure 4B).

Molecular Plant

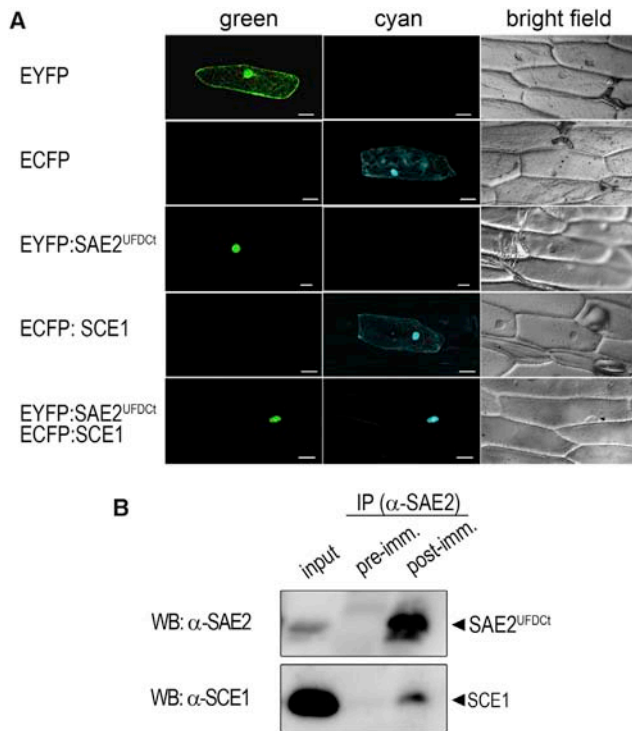


Figure 4. Analysis of SAE2^{UFDCt}-SCE1 Interactions In Vivo.

(A) SAE2^{UFDCt} and SCE1 co-localize in the nucleus of onion cells. SAE2^{UFDCt} fused to enhanced YFP (EYFP) and SCE1 fused to ECFP were transiently expressed in onion epidermal cells, individually or co-expressed. Cells expressing EYFP or ECFP were used as control. Light-transmission images of the fluorescent protein-expressing cells are shown next to the corresponding fluorescence image. Scale bars, 50 μ m. (B) Total protein extracts from *Arabidopsis* plants expressing the SAE2^{UFDCt} domain (line #44) were subjected to immunoprecipitation with pre-immune serum or SAE2 post-immunization serum. Input and immunoprecipitated protein fractions were analyzed by immunoblotting using anti-SAE2 or anti-SCE1 antibodies.

Plants with Impaired SUMOylation Exhibit Enhanced Susceptibility to Fungal Pathogen Infection

To further validate the developed strategy for inhibiting SUMO conjugation *in vivo*, we investigated a novel role of protein SUMOylation in plant defense against fungal pathogens. For this purpose, several *Arabidopsis* genotypes with altered SUMOylation activity were challenged with two different necrotrophic pathogens, namely *B. cinerea* and *P. cucumerina*. The selected plants accounted for increased SUMOylation, SUMO1-ox plants (Lois et al., 2003), and diminished SUMOylation, including SUMOylation-deficient SAE2^{UFDCt}-expressing plants lines #28, #1, and #44, and *siz1-3* mutant plants. The progress of diseases was macroscopically examined and compared with wild-type plants. Disease lesions caused by *B. cinerea* were first visible as discrete necrotic spots at 2 days post infection (dpi) in those lines impaired in SUMOylation, whereas in the wild-type and *SUM1-ox* leaves necrosis appeared later, at 3 dpi (Figure 5A). These lesions expanded and caused maceration on the inoculated leaves in the next few days, developing more quickly on the *siz1-3*- and the SAE2^{UFDCt}-expressing lines (Figure 5A). At 15 dpi, most of inoculated *siz1-3* mutant and transgenic plants from lines #1 and #44 were dead, whereas most of the wild-type, *SUM1-ox*, and

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

line #28 plants remained alive and survived the disease under these experimental conditions (Figure 5B). These results suggest that protein SUMOylation is required for resistance to *B. cinerea* fungal infection. Similarly, the plants impaired in SUMOylation showed enhanced susceptibility to the fungal pathogen *P. cucumerina*, as they displayed necrosis on the majority of leaves at 7 dpi (Figure 5C) that expanded through the petioles and reached the vascular system, causing approximately 50% decay of plants at 10 dpi (Figure 5D). This phenotype differed from the moderate susceptibility shown by the wild-type and *SUM1-ox* plants, in which necrotic spots in most of the leaves were observed, although complete necrosis only developed in basal leaves and most of the inoculated plants survived (Figure 5C and 5D). In these experiments, the *agb1-1* mutant (Llorente et al., 2005), which displays an enhanced susceptibility to *P. cucumerina*, was used as positive control of fungal infection. These macroscopic disease symptoms were associated with a higher fungal growth on *siz1-3* or SAE2^{UFDCt} leaves, as revealed by trypan blue staining of fungal hyphae (Figure 5E). The SUMOylation-deficient leaves and the *agb1-1* mutant supported an increased fungal growth, consistent with the displayed plant susceptibility. The *SUM1-ox* and wild-type plants with high and basal SUMOylation profiles, respectively, showed moderate susceptibility, whereas the SAE2^{UFDCt} lines and *siz1-3* mutant plants with reduced SUMOylation conjugates showed high susceptibility to *P. cucumerina* (Figure 5F).

To better understand the requirement of SUMOylation for necrotrophic pathogen resistance, we analyzed the molecular dynamics of SUMO, free and conjugated, and two members of the SUMOylation machinery, the SUMO-activating enzyme large subunit SAE2 and the SUMO-conjugating enzyme SCE1, during *P. cucumerina* infection of wild-type Col-0 plants. At 3 hours post infection (hpi), a transient and significant increment in SUMO conjugates was observed, followed by a gradual reduction of SUMO conjugates reaching a 50% reduction at 48 hpi, which did not correlate with an accumulation of free SUMO. On the contrary, free SUMO levels were also reduced during infection (Figure 6A and 6C), indicating that the reduction of SUMO conjugates is not a consequence of active deconjugation. Similarly, SAE2 and SCE1 protein levels diminished during infection, although with slightly different dynamics. SCE1 levels were gradually reduced, whereas SAE2 levels were maintained up to 24 hpi and then reduced at 48 hpi (Figure 6A, 6D, and 6E). After 7 dpi, dead plants were clearly observed (Supplemental Figure 8). The analysis of mRNA SUMO1, SAE2, and SCE1 levels did not reveal fluctuations that would account for the reduction in protein levels (Figure 6B). These results suggest that reduction of SUMO, SAE2, and SCE1 protein levels in response to necrotrophic fungal infection is post-transcriptionally controlled.

DISCUSSION

Taking advantage of the highly specific protein-protein interactions among cognate enzymes that mediate SUMO conjugation to substrates, we have developed a novel strategy for achieving inhibition of SUMO conjugation *in vivo* based on disruption of SUMO E1-E2 interactions. We have validated this strategy for uncovering a novel role of SUMO conjugation in defense responses to necrotrophic fungal pathogens.

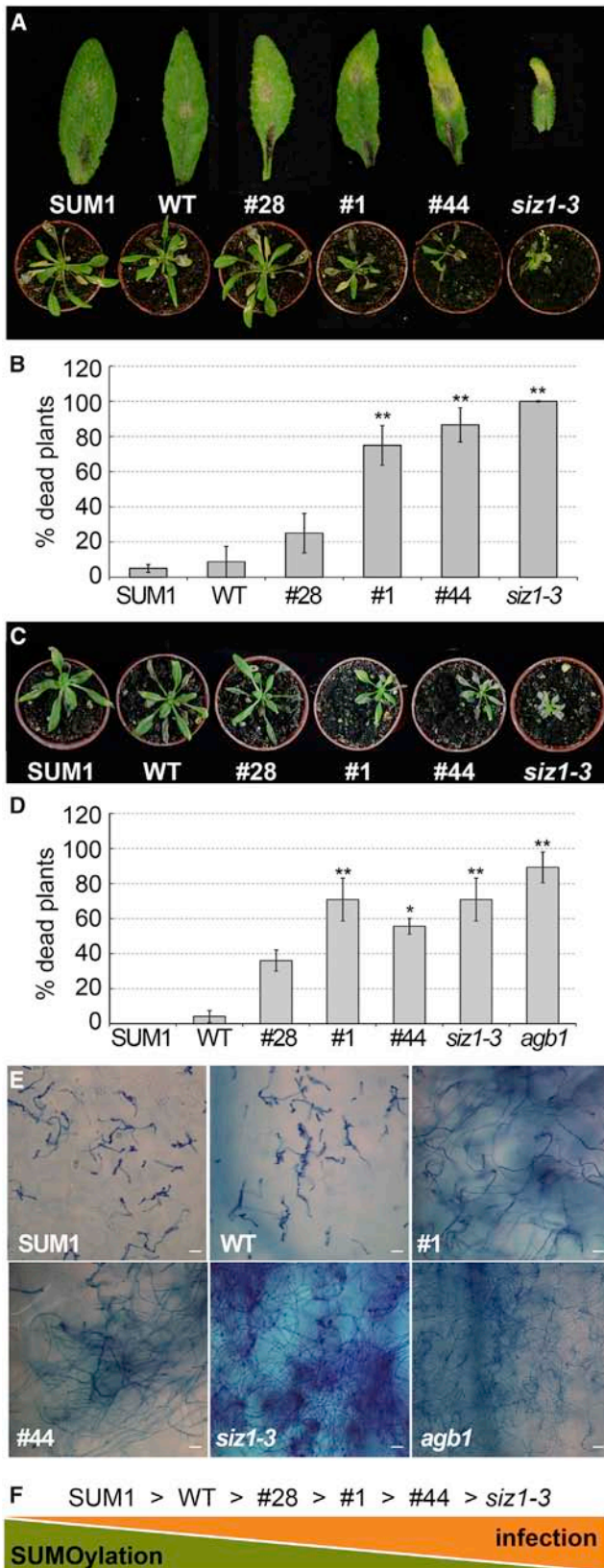


Figure 5. Sumoylation Is Required for Fungal Resistance.

Susceptibility of the indicated *Arabidopsis* genotypes with altered SUMOylation activity to *Botrytis cinerea* (A and B) and *Plectosphaerella cucumerina* (C–E) infection.

Structure-Based SUMO Conjugation Inhibition

Since SUMOylation is an essential process, the use of knockout mutants affecting the first steps in the SUMO conjugation pathway, such as the E1-activating or the E2-conjugating enzymes, is compromised. As a result, the use of knockout mutants has been limited to the study of specific E3 ligase-dependent functions, such as SIZ1 or MMS21, which are the only SUMO E3 ligases described in *Arabidopsis*. Null *siz1* and *mms21* mutant plants display dramatic pleiotropic growth defects (Ishida et al., 2009; Miura et al., 2010), which could raise concerns about the direct role of SUMO in the reported biological functions. In addition, the dependence of the *siz1* phenotype on growth conditions has generated contradictory observations regarding its role in drought responses (Catala et al., 2007; Miura et al., 2013), accentuating the need for alternative genetic tools. The strategy that we have developed renders plants without compromised viability and facilitates the study of physiological processes over a range of SUMOylation inhibition, establishing dose-dependent responses. Both aspects constitute an advantage over the use of null E3 ligase mutants.

Previous attempts aimed to inhibit *in vivo* SUMOylation by expressing a SUMO E2-inactive mutant, but resulted in transgene silencing after few generations (Lois et al., 2003; Tomanov et al., 2013). In contrast, the expression of the SAE2^{UFDCT} domain is maintained through generations. In addition, inhibition of protein functions has some advantages over applying RNA interference approaches such as avoiding off-target effects (Jackson and Linsley, 2010), and it is easier to implement in species with high genome complexity, such as some crops, than approaches involving multiple knockout or knockdown mutant generation. Considering the mentioned aspects, SAE2^{UFDCT} expression is a reliable and novel approach to inhibit SUMO conjugation *in vivo* that could contribute to accelerating our knowledge of how SUMO regulates traits affecting productivity of important crops.

New Mechanistic Insights into *In Vivo* SUMO Conjugation

To our knowledge, this is the first report describing that the disruption of SUMO E1–E2 interactions is a valid strategy for inhibiting SUMO conjugation *in vivo*, and supports a major role

(A) Top: representative leaves detached from drop inoculated plants (10^6 spores/ml) with early disease symptoms at 3 dpi. Bottom: phenotype of plants at 7 dpi that were inoculated on four leaves per plant.

(B) Percentage of dead plants at 15 dpi. Average values and SEM were calculated from five independent assays in which eight plants per genotype were analyzed.

(C) Phenotypical appearance of representative plants at 7 days after spray inoculation with a 10^5 spores/ml suspension.

(D) Percentage of dead plants at 10 dpi. Average values and SEM were calculated from three independent assays in which eight plants per genotype were analyzed.

(E) Trypan blue staining of *P. cucumerina* fungal hyphae growing on leaves at 3 dpi. Scale bars, 20 μ m.

(F) Representative scheme of protein SUMOylation levels and fungal infection susceptibility.

Asterisks denote statistically significant differences with wild-type plants (Tukey's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

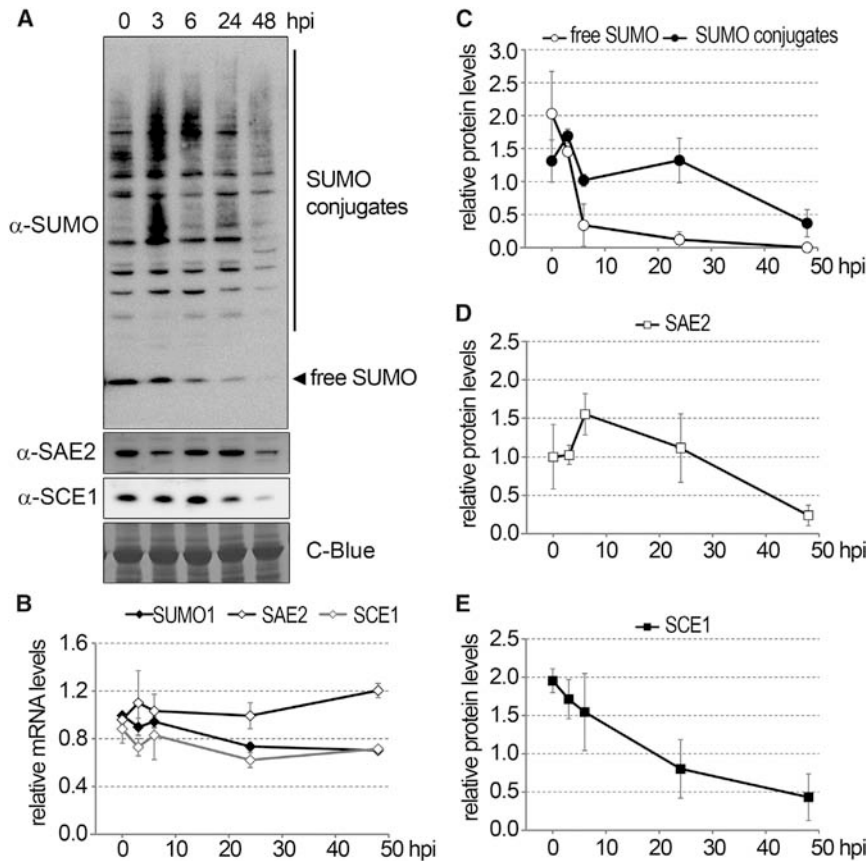


Figure 6. SUMO Conjugates and SUMO Conjugation Machinery Components SAE2 and SCE1 Protein Levels Diminish during Fungal Infection.

(A) Total protein extracts from 21-day-old seedlings, before infection (0) or after 3, 6, 24, and 48 hpi (hours post infection) were resolved by SDS-PAGE and examined by immunoblot analysis with anti-SUMO1, anti-SAE2, and anti-SCE1 antibodies.

(B) mRNA levels corresponding to SUMO1, E1-activating enzyme large subunit (SAE2), and E2-conjugating enzyme (SCE1) were quantified by qPCR. Collected data were normalized by using AtUBC21 as a reference gene.

(C–E) Relative protein levels were quantified from the same biological samples as in (B) and average values and SEM were plotted on the corresponding graphs. Quantifications were performed from two or three biological replicates.

for the SAE2^{UFDCt} domain in E2 recruitment *in vivo*. Disruption of protein–protein interactions potentially offers advantages over single enzyme inhibition related to increased affinity and specificity (Zinzalla, 2013). Accordingly, the low conservation displayed by the LHEB2 sequences suggests that these regions have evolved to optimize E1–E2 cognate interactions. Supporting this hypothesis, previous studies performed by us and others showed that the *in vitro* efficiency of the human SUMO conjugation system was dramatically reduced when the human E2-conjugating enzyme was replaced by the *Arabidopsis* (Lois et al., 2003) or *Plasmodium falciparum* (Reiter et al., 2013) SUMO E2 orthologs. Also, as result of this divergence the identification of specific amino acids displaying a major contribution to these interactions is not possible by sequence homology between evolutionary distant organisms, such as yeast and plants. By using mutagenesis analysis, we have identified residues necessary for SAE2^{UFDCt}–E2 interactions that are present with a high frequency in the angiosperm SAE2 sequences analyzed, but not in lower plants, consistent with the proposed higher divergence rate of this region.

In addition, we have uncovered a novel post-transcriptional regulation of SUMO E2 levels, which accumulate in direct relation to the SAE2^{UFDCt} expression levels. Previous studies reported an accumulation of the E2 in *siz1* mutant plants and suggested the existence of a compensatory mechanism that was not analyzed (Saracco et al., 2007). We have observed similar E2 accumulation in *siz1* mutant plants, but this accumulation was much higher in SAE2^{UFDCt}-expressing plants even though they

displayed less dramatic defects in SUMO conjugate accumulation than in *siz1* mutant plants. This is particularly evident in the case of the transgenic line expressing the lowest SAE2^{UFDCt} levels, line #28, which had a minor effect on SUMO conjugate accumulation; consequently, plants did not display obvious developmental defects under standard growth conditions. These results provide evidence for the existence of an unknown *in vivo* SUMOylation regulation mechanism based on the control of E2 levels. We speculate that the SCE1–SAE2^{UFDCt} complex could mediate SCE1 stabilization. *In planta*, such mechanisms could facilitate the coordination between E1 and E2 levels to modulate SUMO conjugation rate.

SUMOylation Is Required for Resistance to Plant Necrotrophic Fungal Pathogens

In recent years post-translational modification mechanisms have emerged as key players in the plant defense responses to pathogens. The role of phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation, nitrosylation, and glycosylation has been described in plant immunity (Lee et al., 2007; Stulemeijer and Joosten, 2008). Since previous studies did not identify alterations in *siz1* mutant plant susceptibility to necrotrophic pathogens, we evaluated a potential role of SUMO in this process that could potentially be *SIZ1* independent. We found that transgenic plants expressing the SAE2^{UFDCt} domain displayed increased sensitivity to the tested fungi. Surprisingly, when we included *siz1* mutant plants in the assays, we observed that they also displayed sensitivity to necrotrophic fungal pathogens. Response variability of *siz1* mutant plants upon stress was previously observed in drought tolerance studies (Catala et al., 2007; Miura et al., 2013), stressing the need for alternative and more reliable approaches to study the role of SUMOylation in plants, such as the strategy described here. In fact, SAE2^{UFDCt}-expressing plants also displayed increased drought sensitivity, supporting the findings of Catala et al. (2007).

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

Defense responses regulated by the salicylic acid-dependent pathway and associated with programmed cell death, which are effective against biotrophic pathogens, benefit necrotrophic pathogens. The null *siz1* mutant plants are characterized by high contents of salicylic acid, which results in higher expression of PR genes inducing a constitutive systemic acquired resistance, leading to an increased resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Lee et al., 2007; van den Burg et al., 2010). Therefore, the *siz1* susceptibility to necrotrophic pathogens that we observed is consistent with salicylic acid accumulation in these plants.

To further understand the role of SUMOylation in pathogen defense, we determined protein dynamics of SUMO conjugation machinery members, SUMO E1-activating enzyme large subunit, E2-conjugating enzyme, and free and conjugated SUMO, during the first 48 hpi, when physical damage was not observed. Although the different components follow distinct dynamics, at 48 hpi a general depletion of the SUMOylation system was observed, which did not correlate with significant alterations in mRNA levels, suggesting the existence of a post-transcriptional regulation. Since SUMOylation inhibition results in cell death (Miura et al., 2010), it is plausible that necrotrophic fungi could induce SUMOylation machinery depletion as a mechanism of pathogenicity. Supporting this hypothesis, the role of some bacterial pathogen effectors targeting the host SUMOylation machinery is well described. As such, the *Xanthomonas campestris* effectors XopD and AvrXv4 act as SUMO proteases (Chosed et al., 2007), resulting in the disruption of SUMO homeostasis in the cell (Hotson and Mudgett, 2004; Roden et al., 2004), which favors infection progression. In viral infections, the essential proteins for viral replication AL1 and REP interact with SUMO E2-conjugation enzyme, altering the cell SUMO conjugation capacity (Castillo et al., 2004; Sanchez-Duran et al., 2011). This manipulation of SUMOylation machinery by pathogens is a strategy also present in animal viruses and bacteria (Boggio et al., 2007; Ribet et al., 2010; Beyer et al., 2015). The existence of similar strategies used by fungi during host infections remains to be elucidated.

Overall, we have validated the disruption of SUMO E1 and E2 interactions as a reliable strategy for inhibiting SUMO conjugation *in vivo*, which could be applied to accelerate the understanding of SUMOylation in organisms for which genetic tools are not available, such as economically relevant crops. Also, this validation constitutes a starting point from which to develop novel agrochemicals for selective modulation of plant stress responses such as plant immunity. Finally, we have shown the advantage of this strategy over the use of null mutants, which sometimes deliver contradictory results, by identifying a novel role of SUMO in defense responses against necrotrophic fungal pathogens. Additional studies will be necessary to elucidate the molecular mechanisms involved in SUMO conjugation machinery depletion during fungal infection.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

For *in vitro* cultures, seeds were stratified for 3 days, plated on Murashige and Skoog salts (pH 5.7) (Duchefa), supplemented with 0.8% BactoAgar (Difco), and transferred to a tissue culture room in a long-day (LD) photo-

period (16 h light/8 h dark) at 22°C. For soil cultures, plants were grown in growth chambers under LD photoperiod at 22°C. For immunoprecipitation assays, seedlings of SAE2^{UFDCT} expressing line #44 were germinated and grown in Gamborg liquid medium for 11 days in constant agitation (120 rpm) under LD photoperiod culture room. Plants were immediately frozen with N₂ and stored at -80°C.

In Vitro SUMO Conjugation

A detailed protocol for reconstituting an *in vitro* SUMO conjugation assay covering all steps from protein preparation to assay development and kinetics quantification is described in Castaño-Miquel and Lois (2016). In brief, in conjugation assays we used the C-terminal tail of the *Arabidopsis* Catalase 3 (419–472) fused to GST, GST:AtCAT3Ct as a substrate. Reactions were carried out at 37°C in 25-μL reaction mixtures containing 1 mM ATP, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.5), 0.1% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 2 μM SUMO, 0.5 μM AtSAE2/AtSAE1a, 0.5 μM AtSCE1, and 5 μM GST-AtCAT3Ct. After the specified incubation time, reactions were stopped by the addition of protein-loading buffer, incubated at 70°C for 10 min, and 10-μL aliquots were resolved by SDS-PAGE. Reaction products were detected by immunoblot analysis with anti-GST polyclonal antibodies (Sigma, G7781). Luminescence signal generated by ECL Prime assay (GE Healthcare) was captured with a CCD camera (LAS4000, Fujifilm) and quantified with Multigauge software (Fujifilm). Each data point was normalized to the average of all data points obtained from each analyzed membrane to remove variability resulting from antibody incubations and time-exposure differences. The normalized values were used to calculate the corresponding slopes (relative luminescence signal versus time). The average slope from at least three independent experiments is shown.

In Vitro Pull-Down Assay

One hundred μM His:AtSAE2^{UFDCT} or its mutant variants L476A, L477A, D485A, and D486A, and 25 μM AtSCE1 were incubated in 40 μL of binding buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, and 20 mM imidazole) for 1 h at 4°C. Next, 10 μL of Ni²⁺-IMAC-Sepharose resin was added to the binding mixture and incubated for 30 min at 4°C. The binding mixture was transferred to micro bio-spin chromatography columns (Bio-Rad, 732–6203) and the resin was washed three times with 20 μL of binding buffer and a final wash of 40 μL of binding buffer. The proteins bound to the resin were eluted with 20 μL of binding buffer containing 300 mM imidazole. 0.5 μL of the input and 1 μL of the eluate fractions, respectively, were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with anti-SCE1 antibodies.

Transient Expression of Fluorescent Protein Fusions in Onion Cells

SAE2^{UFDCT} and SCE1 were fused in frame to the 3' end of the coding sequences of yellow fluorescent protein (YFP) or cyan fluorescent protein (CFP), respectively, downstream of the 35S constitutive promoter. Onion epidermal cells were bombarded with 5 μg of each DNA construct using a helium biolistic gun (Bio-Rad). Treated epidermal cells were kept in the dark at room temperature for 16 h before analysis by confocal microscopy (Confocal Olympus FV 1000). YFP was excited with a 515-nm argon laser and images collected with a 550- to 630-nm range. CFP was excited with a 405-nm argon laser and images collected in the 460- to 500-nm range. Imaging of YFP and CFP and transmissible light image collection were performed sequentially. Samples were scanned with the z-stack mode and image stacks projection was calculated with ImageJ software (Rasband, 1997–2009).

Protein Extraction and Immunoblot

Anti-SUMO1/2, anti-SAE2, and anti-SCE1 polyclonal antisera were generated previously (Castaño-Miquel et al., 2011). Plant tissue was ground in liquid nitrogen and proteins extracted with 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM N-ethylmaleimide, 10 mM iodoacetamide, and

Molecular Plant

5 mM EDTA. Total protein (18 μ g) was resolved under reducing conditions by using SDS-polyacrylamide gels and NuPage Novex 4%–12% Bis/Tris gels (Invitrogen). Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) and incubated overnight with primary antibody, followed by secondary antibody incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare), for 1 h at room temperature in TBST buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween 20) supplemented with 3% non-fat dry milk. Peroxidase activity was developed in ECL Plus reagent (GE Healthcare) and chemiluminescence signal captured with an LAS-4000 imaging system (Fujifilm). For SUMO conjugate quantifications, using Multigauge v.3 (Fujifilm), the region of interest (ROI) was defined by a rectangle enclosing all detected bands above free SUMO in each lane. The same ROI size was used for quantifying SUMO conjugates from each sample lane and the membrane background. Average values were calculated as described in [Castaño-Miquel and Lois \(2016\)](#).

Phylogenetic Analyses

We searched Phytozome v.11 for *Arabidopsis* SAE2 homologs and retrieved 100 sequences. Before performing comprehensive homology analysis, incomplete sequences were removed. When different versions of the same gene were found, we retained the version containing all the canonical SAE2 functional regions for the comparative analysis. The remaining 60 SAE2 homolog proteins from 54 plant species were aligned using the OMEGA Clustal software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and the human SAE2 as outlier. Phylogenetic analysis was performed using Seaview software. Consensus sequences were calculated using WebLogo software (<http://weblogo.berkeley.edu/>) ([Crooks et al., 2004](#)). Multiple sequence alignments were edited, analyzed, and shaded using GeneDoc ([Nicholas and Nicholas, 1997](#)).

Immunoprecipitation Assays

One gram of 11-day old *Arabidopsis* seedlings was ground and homogenized in 2 ml of immunoprecipitation (IP) buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM *N*-ethylmaleimide, 10 mM iodoacetamide, and 5 mM EDTA), incubated for 30 min rotating at 4°C, and centrifuged at 14 000 *g* for 20 min at 4°C. Supernatants were recovered and concentrated with centrifugal filters (Amicon Ultra-15 10 kDa) and subsequently quantified using the Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay). Total protein (12 mg) was incubated for 3 h at 4°C on a rotator in the presence of 30 μ L of SAE2 polyclonal antiserum, or 90 μ L of the corresponding pre-immunization serum, and 50 μ L of Protein A magnetic beads (Surebeads, Bio-Rad). After three washes with IP buffer, immunoprecipitated proteins were eluted by boiling at 100°C in Laemmli buffer and analyzed by immunoblotting using anti-SAE2 and anti-SCE1 antibodies. As control, 5 μ g of input fractions was also analyzed.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA from plant tissues was extracted using the Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The Superscript VILO kit (Invitrogen, MA, USA) was used to generate cDNA according to the manufacturer's instructions, using 1.4 μ g of total RNA. The relative mRNA abundance was evaluated via quantitative RT-PCR in a total reaction volume of 20 μ L using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland) on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland) with 0.3 μ M of each specific sense and anti-sense primers. Two or three independent biological replicates of each sample, as stated in the text, and three technical replicates of each biological replicate were performed and the mean values were considered for further calculations. The relative transcript level was determined for each sample and normalized using *UBC21* or *PR65* as stated. Primer sequences used in the qPCR experiments are described in [Supplemental Table 2](#).

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

Infection Assays

The *B. cinerea* and *P. cucumerina* fungal strains, as well as the *Arabidopsis* mutant *agb1-1* showing high susceptibility to *P. cucumerina* infection ([Delgado-Cerezo et al., 2012](#)), were provided by Dr. A. Molina (CBGP, Spain). Plants were grown in a phytochamber on a sterilized mixture of soil and vermiculite (3:1) during 4 weeks under a 12 h light/12 h dark photoperiod at 22°C prior to inoculation. Inoculated plants were kept under high humidity in covered trays. *B. cinerea* inoculations were performed by placing spore suspension drops (10⁶ spores/ml) on *Arabidopsis* leaves (four leaves per plant). *P. cucumerina* inoculations were performed by spraying plants with spore suspensions (10⁵ spores/ml). At least eight plants per genotype were inoculated in a minimum of two or three independent assays. Disease progression was followed by visual inspection. Fungal growth was visualized by trypan blue staining of leaves at 2 and 3 dpi as reported ([Epple et al., 1997](#)), and bright field images were obtained on a Zeiss Axiophot microscope.

ACCESSION NUMBERS

Assigned accession numbers for the genes used in this work are as follows: At5g55160 (SUMO2), At2g21470 (SAE2), At4g24940 (SAE1a), At3g57870 (SCE1), and At1g13320 (PR65).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information is available at *Molecular Plant Online*.

FUNDING

This work was supported by the European Research Council (ERC-2007-StG-205927) and the Spanish Ministry of Science (BIO2008-01495). L.C.-M., I.T., A.P., S.M., and N.R. were supported by research contracts through the CRAG. A.M. and J.S. were supported by predoctoral fellowships, Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (FPU12/05292) and Ministry of Education and Science (BES-2005-6843), respectively, and A.L.S. was supported by Beatriu de Pinós post-doctoral grant of the Generalitat de Catalunya (2013 BP_B 00182). We also thank the Generalitat de Catalunya (Xarxa de Referència en Biotecnologia and 2009SGR 09626) for substantial support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.C.-M., A.M., I.T., A.P., B.N.T., J.S., A.L.S., N.R., G.L.V., S.M., M.C., and L.M.L. performed experiments. L.C.-M., A.M., I.T., A.P., A.L.S., S.M., M.C., and L.M.L. designed experiments. M.C. supervised experiments involving fungal infections. L.M.L. supervised and led the project. M.C. and L.M.L. wrote the manuscript. L.C.-M., A.M., I.T., A.P., A.L.S., S.M., M.C., and L.M.L. discussed and checked the manuscript. All authors contributed to the analysis of the data and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical support from members of the Greenhouse and Microscopy facilities at CRAG. We greatly thank Cristina Cañadas for technical support at the L.M.L. laboratory. We thank Christopher D. Lima for critical reading of the manuscript. No conflict of interest declared.

Received: October 1, 2016

Revised: January 16, 2017

Accepted: January 19, 2017

Published: February 10, 2017

REFERENCES

- [Beyer, A.R., Truchan, H.K., May, L.J., Walker, N.J., Borjesson, D.L., and Carlyon, J.A. \(2015\). The *Anaplasma phagocytophilum* effector AmpA hijacks host cell SUMOylation. *Cell. Microbiol.* **17**:504–519.](#)
- [Boggio, R., Passafaro, A., and Chiocca, S. \(2007\). Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J. Biol. Chem.* **282**:15376–15382.](#)

SUMOylation Impairment in Necrotrophic Attack

Molecular Plant

- Capili, A.D., and Lima, C.D.** (2007). Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction. *J. Mol. Biol.* **369**:608–618.
- Castaño-Miquel, L., and Lois, L.M.** (2016). Kinetic analysis of plant SUMO conjugation machinery. In *Plant Proteostasis: Methods and Protocols*, L.M. Lois and R. Matthiesen, eds. (New York: Humana Press), pp. 107–123.
- Castaño-Miquel, L., Seguí, J., and Lois, L.M.** (2011). Distinctive properties of *Arabidopsis* SUMO paralogues support the in vivo predominant role of AtSUMO1/2 isoforms. *Biochem. J.* **436**:581–590.
- Castaño-Miquel, L., Seguí, J., Manrique, S., Teixeira, I., Carretero-Paulet, L., Atencio, F., and Lois, L.M.** (2013). Diversification of SUMO-activating enzyme in *Arabidopsis*: implications in SUMO conjugation. *Mol. Plant* **6**:1646–1660.
- Castillo, A.G., Kong, L.J., Hanley-Bowdoin, L., and Bejarano, E.R.** (2004). Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J. Virol.* **78**:2758–2769.
- Catala, R., Ouyang, J., Abreu, I.A., Hu, Y., Seo, H., Zhang, X., and Chua, N.H.** (2007). The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell* **19**:2952–2966.
- Chosed, R., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Mukherjee, S., Negi, V.S., Machius, M., and Orth, K.** (2007). Structural analysis of *Xanthomonas* XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitin-like protein proteases. *J. Biol. Chem.* **282**:6773–6782.
- Conti, L., Nelis, S., Zhang, C.J., Woodcock, A., Swarup, R., Galbiati, M., Tonelli, C., Napier, R., Hedden, P., Bennett, M., et al.** (2014). Small ubiquitin-like modifier protein SUMO enables plants to control growth independently of the phytohormone gibberellin. *Dev. Cell* **28**:102–110.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**:1188–1190.
- Delgado-Cerezo, M., Sanchez-Rodriguez, C., Escudero, V., Miedes, E., Fernandez, P.V., Jorda, L., Hernandez-Blanco, C., Sanchez-Vallet, A., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P., et al.** (2012). *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein regulates cell wall defense and resistance to necrotrophic fungi. *Mol. Plant* **5**:98–114.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**:509–520.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D.** (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:861–871.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:205–227.
- Hotson, A., and Mudgett, M.B.** (2004). Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:384–390.
- Huang, L., Yang, S., Zhang, S., Liu, M., Lai, J., Qi, Y., Shi, S., Wang, J., Wang, Y., Xie, Q., et al.** (2009). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *Plant J.* **60**:666–678.
- Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., Adachi, S., Minamisawa, K., Umeda, M., and Sugimoto, K.** (2009). SUMO E3 ligase high PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**:1–14.
- Jackson, A.L., and Linsley, P.S.** (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**:57–67.
- Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J.V., Mann, M., and Sixma, T.K.** (2007). Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J.* **26**:2797–2807.
- Lee, I., and Schindelin, H.** (2008). Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* **134**:268–278.
- Lee, J., Nam, J., Park, H.C., Na, G., Miura, K., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Baek, D., Kim, D.H., Jeong, J.C., et al.** (2007). Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant J.* **49**:79–90.
- Lois, L.M.** (2010). Diversity of the SUMOylation machinery in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **38**:60–64.
- Lois, L.M., and Lima, C.D.** (2005). Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *EMBO J.* **24**:439–451.
- Lois, L.M., Lima, C.D., and Chua, N.H.** (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**:1347–1359.
- Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L., and Molina, A.** (2005). ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* **43**:165–180.
- Mengiste, T.** (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**:267–294.
- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghobama, K.G., Baek, D., Koo, Y.D., Jin, J.B., Bressan, R.A., et al.** (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:7760–7765.
- Miura, K., Lee, J., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T., and Hasegawa, P.M.** (2009). Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**:5418–5423.
- Miura, K., Lee, J., Miura, T., and Hasegawa, P.M.** (2010). SIZ1 controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* **51**:103–113.
- Miura, K., Sato, A., Ohta, M., and Furukawa, J.** (2011). Increased tolerance to salt stress in the phosphate-accumulating *Arabidopsis* mutants *siz1* and *pho2*. *Planta* **234**:1191–1199.
- Miura, K., Okamoto, H., Okuma, E., Shiba, H., Kamada, H., Hasegawa, P.M., and Murata, Y.** (2013). SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant J.* **73**:91–104.
- Murtas, G., Reeves, P.H., Fu, Y.F., Bancroft, I., Dean, C., and Coupland, G.** (2003). A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell* **15**:2308–2319.
- Naseem, M., Kaldorf, M., and Dandekar, T.** (2015). The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J. Exp. Bot.* **66**:4885–4896.
- Nicholas, K.B., and Nicholas, H.B.J. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Rasband, W.S.** (1997–2009). ImageJ (Bethesda (MD): U. S. National Institutes of Health), Available online at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Reiter, K., Mukhopadhyay, D., Zhang, H., Boucher, L.E., Kumar, N., Bosch, J., and Matunis, M.J.** (2013). Identification of biochemically distinct properties of the small ubiquitin-related modifier (SUMO)

Molecular Plant

- conjugation pathway in *plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **288**:27724–27736.
- Reiter, K.H., Ramachandran, A., Xia, X., Boucher, L.E., Bosch, J., and Matunis, M.J. (2015). Characterization and structural insights into selective E1-E2 interactions in the human and *Plasmodium falciparum* SUMO conjugation systems. *J. Biol. Chem.* **291**:3860–3870.
- Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M.A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Dejean, A., and Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* **464**:1192–1195.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., and Mudgett, M.B. (2004). Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**:633–643.
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marques, J., Gu, Y., Yan, S., Zavaliev, R., Nomoto, M., Tada, Y., and Dong, X. (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host Microbe* **18**:169–182.
- Sanchez-Duran, M.A., Dallas, M.B., Ascencio-Ibanez, J.T., Reyes, M.I., Arroyo-Mateos, M., Ruiz-Albert, J., Hanley-Bowdoin, L., and Bejarano, E.R. (2011). Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. *J. Virol.* **85**:9789–9800.
- Saracco, S.A., Miller, M.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D. (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* **145**:119–134.
- Stulemeijer, I.J., and Joosten, M.H. (2008). Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Mol. Plant Pathol.* **9**:545–560.
- Tomanov, K., Hardtke, C., Budhiraja, R., Hermkes, R., Coupland, G., and Bachmair, A. (2013). SUMO conjugating enzyme with active site mutation acts as dominant negative inhibitor of SUMO conjugation in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **55**:75–82.
- van den Burg, H.A., Kini, R.K., Schuurink, R.C., and Takken, F.L. (2010). *Arabidopsis* small ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *Plant Cell* **22**:1998–2016.
- Villajuana-Bonequi, M., Elrouby, N., Nordstrom, K., Griebel, T., Bachmair, A., and Coupland, G. (2014). Elevated salicylic acid levels conferred by increased expression of ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 contribute to hyperaccumulation of SUMO1 conjugates in the *Arabidopsis* mutant early in short days 4. *Plant J.* **79**:206–219.
- Walden, H., Podgorski, M.S., Huang, D.T., Miller, D.W., Howard, R.J., Minor, D.L., Jr., Holton, J.M., and Schulman, B.A. (2003). The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol. Cell* **12**:1427–1437.
- Wang, J., Hu, W., Cai, S., Lee, B., Song, J., and Chen, Y. (2007). The intrinsic affinity between E2 and the Cys domain of E1 in ubiquitin-like modifications. *Mol. Cell* **27**:228–237.
- Wang, J., Lee, B., Cai, S., Fukui, L., Hu, W., and Chen, Y. (2009). Conformational transition associated with E1-E2 interaction in small ubiquitin-like modifications. *J. Biol. Chem.* **284**:20340–20348.
- Wang, J., Taherbhoy, A.M., Hunt, H.W., Seyedin, S.N., Miller, D.W., Miller, D.J., Huang, D.T., and Schulman, B.A. (2010). Crystal structure of UBA2^{ufd}-Ubc9: insights into E1-E2 Interactions in SUMO Pathways. *PLoS One* **5**:e15805.
- Wang, H.D., Makeen, K., Yan, Y., Cao, Y., Sun, S.B., and Xu, G.H. (2011). OsSIZ1 regulates the vegetative growth and reproductive development in rice. *Plant Mol. Biol. Report* **29**:411–417.
- Xu, P., Yuan, D., Liu, M., Li, C., Liu, Y., Zhang, S., Yao, N., and Yang, C. (2013). AtMMS21, an SMC5/6 complex subunit, is involved in stem cell niche maintenance and DNA damage responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **161**:1755–1768.
- Yoo, C.Y., Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Park, H.C., Salt, D.E., Yun, D.J., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2006). SIZ1 SUMO E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiol.* **142**:1548–1558.
- Zinzalla, G. (2013). *Understanding and Exploiting Protein-Protein Interactions as Drug Targets* (London: Future Science Ltd), pp. 2–4.