

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela técnica superior de ingeniería agronómica y
del medio natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Caracterización de la interacción entre el canal de potasio de *Arabidopsis thaliana* KAT1 y su regulador BAG4

Grado en Biotecnología

Año académico 2019/2020

Autor: Carmen Maria Grueso Cortina

Tutor: Dr. Lynne Yenush

Valencia, Junio de 2020

Characterization of the interaction between the *Arabidopsis thaliana* potassium channel KAT1 and its regulator BAG4

Author: Carmen Maria Grueso Cortina

Tutor: Dr. Lynne Yenush

Valencia, June 2020

Abstract

The correct functioning of any organism requires the maintenance of ionic homeostasis, an essential, dynamic process that must guarantee the presence of ions at adequate levels, preventing them from accumulating. To this end, cells have developed highly efficient systems that capture and store these elements, as well as allowing rapid responses to possible environmental changes.

Potassium is the most abundant cation in plants, and is also an essential nutrient for them. This cation plays a key role in functions such as protein synthesis, enzyme activation or cell turgor. In relation to the latter, the flow of potassium through the membranes of the guard cells regulates their turgidity and, therefore, the opening or closing of the stomata. It is through these pore structures, the stomata, that the cell is able to perform both gas exchange and transpiration.

The entry of potassium into the guard cells is regulated by different potassium entry channels, including the Shaker family of voltage-dependent channels. KAT1 and its close homologue KAT2 are Shaker family channels highly expressed in the guard cell membrane, that play a major role in potassium uptake in this cell type. Given their direct involvement in the stomatal opening, the regulation of the activity of these channels is crucial for the response to abiotic stresses such as drought.

In previous studies, our group identified different proteins capable of interacting with KAT1 using a Split-ubiquitin screening in yeast. One of the identified proteins was BAG4, a member of the BAG family, which is characterized by a common BAG domain near the C-terminal region of these proteins. This characteristic domain interacts directly with the Heat Shock 70 (Hsp70) proteins, thus regulating their activity. Based on the role of their mammalian counterparts and various experimental tests, this family is believed to be involved in the regulation of processes such as resistance to pathogens or abiotic stress.

In the same study, our group also proved that BAG4 regulates the KAT1 channel, so that its co-expression improves the KAT1 channel activity, whereas the lack of BAG4 expression caused altered stomatal movement. Thus, the characterization of the interaction between KAT1 and BAG4, as well as the study of its effects on the regulatory capacity of BAG4, could have great repercussions in the study of drought responses.

Using the modular cloning system MoClo, the constructs needed to perform this characterization were designed. The completed plasmids were tested. Our preliminary results show that the MoClo constructs present a reduced activity in the Split-Ubiquitin protein-protein interaction assay, as compared to the control plasmids upon which our design was based. However, we could observe the protein-protein interaction between KAT1 and BAG4, demonstrating the utility of these constructs for the detailed analysis of this interaction.

Key words: Potassium; Shaker channels; KAT1; BAG4; *Arabidopsis thaliana*; *Saccharomyces cerevisiae*; Split-Ubiquitin; Modular Cloning

Caracterización de la interacción entre el canal de potasio de *Arabidopsis thaliana* KAT1 y su regulador BAG4

Autor: Carmen Maria Grueso Cortina

Tutor: Dr. Lynne Yenush

Valencia, Junio de 2020

Resumen

El correcto funcionamiento de cualquier organismo requiere el mantenimiento de la homeostasis iónica, un proceso dinámico esencial que debe garantizar la presencia de iones a niveles adecuados, evitando su acumulación. Para ello, las células han desarrollado sistemas altamente eficientes que se encargan de captar y almacenar estos elementos, así como de permitir respuestas rápidas frente a posibles cambios ambientales.

El potasio es el catión más abundante en las plantas, siendo también un nutriente esencial para estas. Tal es su importancia que juega un papel clave en funciones como la síntesis proteica, la activación enzimática o la turgencia celular. En relación con esta última, el flujo de potasio a través de las membranas de las células oclusivas regula su turgencia y, con ello, también la apertura o cierre estomáticos. Es a través de estas estructuras celulares, los estomas, que la célula es capaz de realizar tanto el intercambio gaseoso como la transpiración.

La entrada de potasio en las células oclusivas viene regulada por distintos canales de entrada de potasio, entre estos se encuentra la familia *Shaker* de canales dependientes de voltaje. Pertenecientes a esta familia, en la membrana de las células oclusivas, se encuentran los principales responsables de dicha entrada de potasio: KAT1 y su homólogo KAT2. Dada su implicación directa en la apertura estomática, estos canales ganan importancia frente a un posible estrés abiótico como la sequía.

En estudios previos, nuestro grupo identificó diferentes proteínas de *Arabidopsis thaliana* capaces de interactuar con KAT1 mediante un rastreo basado en el sistema Split-Ubiquitina. Una de las proteínas identificadas fue BAG4, miembro de la familia BAG, que se caracteriza por un dominio BAG conservado cerca de la región C-terminal de sus proteínas. Este dominio interactúa directamente con una clase de las proteínas de choque térmico Hsp70, regulando así su actividad. En base a la función de sus homólogos en mamíferos y a distintas pruebas experimentales, se cree que esta familia está implicada en la regulación de procesos como la resistencia a patógenos o a estrés abiótico.

También se demostró que BAG4 regula KAT1, de forma que su co-expresión mejora la actividad de KAT1, pero la falta de expresión de BAG4 lleva a un retraso en la apertura estomática. Por tanto, la caracterización detallada de la interacción entre KAT1 y BAG4, así como el estudio de los efectos que tiene en la capacidad reguladora de BAG4, pueden tener gran repercusión en los estudios de las respuestas de las plantas frente a la sequía.

Mediante el sistema de clonación MoClo se diseñaron las construcciones necesarias para llevar a cabo esta caracterización. Las construcciones obtenidas se probaron, y los resultados preliminares muestran que las construcciones MoClo presentan una actividad reducida en el ensayo de interacción proteína-proteína Split-Ubiquitina, en comparación con los plásmidos control en base a los que se diseñaron. Sin embargo, observamos interacción entre KAT1 y BAG4, demostrando así la capacidad de estos plásmidos de ser usados para un análisis detallado de esta interacción.

Palabras clave: Potasio; canales *Shaker*; KAT1; BAG4; *Arabidopsis thaliana*; *Saccharomyces cerevisiae*; Split-Ubiquitina; *Modular Cloning*

Agradecimientos

Me gustaría empezar dando las gracias a Lynne, por darme la gran oportunidad de trabajar en su laboratorio. Sin tu paciencia, comprensión, constante apoyo y motivación, nada hubiera sido igual. También quiero agradecer a Antonella y Nuria, por estar siempre dispuestas a aconsejarme y ayudarme cuando más lo necesitaba. Esta experiencia no solo me ha enseñado más sobre el mundo de la ciencia y la biología molecular, sino que he podido aprender de primera mano cómo ser una mejor profesional.

Otro punto fundamental en este trabajo han sido mis compañeros de laboratorio, que han hecho que todos esos días de verano se hicieran mucho más amenos. A Adrián y Sergio, gracias por acompañarme esos primeros meses en el laboratorio cuando iba un poco perdida. A Lucía y Enrique, gracias por todas esas comidas y todas las risas. A María, porque en solo unos meses fuiste un gran descubrimiento.

Cómo no agradecer también a mis compañeros durante estos últimos cuatro años, que han estado a mi lado día a día. Gracias Mar i Pau por hacer más llevaderos los trabajos interminables. Gracias Clara i Miguel ayudarme a formarme como persona. Gracias Cris por tu inocencia, que siempre nos saca una sonrisa. Gracias Alba i Marina, por nuestras maravillosas creaciones gráficas i audiovisuales i nuestros momentos frikis. Gracias Sergi por todos los dramas y comedias. Gracias Paula por compartir conmigo todos los momentos de pánico y alegrías durante este trabajo.

Por último, no me gustaría olvidarme de mis padres y mis hermanas, que siempre me apoyan y me motivan a dar el máximo de mí misma. Siguiendo vuestro ejemplo sé que puedo llegar donde me proponga.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Homeostasis iónica	1
1.1.1.	Los estomas	1
1.1.2.	El rol del potasio	3
1.2.	Canales transportadores de potasio en Arabidopsis	4
1.2.1.	Familia <i>Shaker</i>	4
1.2.1.1.	AtKAT1	5
1.3.	Familia Bcl2-associated athanogene (BAG)	6
1.3.1.	BAG4	7
1.4.	Doble híbrido de levadura: Split-Ubiquitina.....	9
1.5.	El sistema MoClo	10
2.	Objetivos.....	14
3.	Materiales y métodos.....	15
3.1.	Material biológico	15
3.1.1.	Cepa <i>E. coli</i> y medio de cultivo.....	15
3.1.2.	Cepa levadura y medios de cultivo	15
3.2.	Obtención de las construcciones genéticas.....	16
3.2.1.	Domesticación de secuencias al sistema MoClo	16
3.2.2.	Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.....	17
3.2.3.	Obtención de los plásmidos parte diseñados	18
3.2.4.	Transformación de <i>E. coli</i>	19
3.2.5.	Extracción de plásmidos en <i>E. coli</i>	19
3.2.6.	Digestión comprobación.....	19
3.2.7.	Obtención de los plásmidos binarios.....	20
3.2.8.	Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.3.	Ensayos de crecimiento en medio sólido.....	21
3.4.	Inmunodetección de proteínas	22
3.4.1.	Extracción total de proteínas	22
3.4.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
3.4.3.	Electrotransferencia (Western Blot)	22
3.4.4.	Tinción de membrana	23
3.4.5.	Inmunodetección	23
4.	Resultados.....	24
4.1.	Diseño y obtención de los plásmidos específicos de Split Ubiquitina	24
4.2.	Plásmidos binarios receptores	25
4.3.	Diseño y obtención plásmidos quimera KAT1-KAT2	27
4.4.	Diseño y obtención plásmidos BAG4	29
4.5.	Ensayos de crecimiento en levadura.....	31
4.6.	Comprobación de la expresión de las proteínas de fusión construídas	32
5.	Discusión	34

6.	Conclusiones.....	36
7.	Referencias.....	37

Índice de figuras

Figura 1. Organización celular en la epidermis de la hoja.	2
Figura 2. Proceso simplificado de apertura y cierre estomático.....	3
Figura 3. Estructura y organización tridimensional de los canales Shaker.	5
Figura 4. Familia de proteínas Bcl2-associated athanogene (BAG) en Arabidopsis thaliana.	7
Figura 5. Representación del sistema Split Ubiquitina en levadura	10
Figura 6. Representación del sistema jerárquico para la construcción de los plásmidos parte, binarios y multigénicos.	11
Figura 7. Esquema del proceso de adaptación de secuencias de ADN al sistema MoClo y obtención de plásmidos parte y binarios.....	12
Figura 8. Electroforesis de la digestión de los plásmidos parte específicos de Split-Ubiquitina.....	25
Figura 9. Electroforesis de la digestión de los plásmidos parte que forman los plásmidos binarios receptores.	26
Figura 10. Obtención de los plásmidos binarios receptores.	26
Figura 11. Representación esquemática de las quimeras de KAT1 y KAT2, haciendo la numeración referencia al número de aminoácidos.	27
Figura 12. Obtención de las construcciones quiméricas KAT1-KAT2.	28
Figura 13. Obtención de las construcciones BAG4.....	30
Figura 14. Ensayo de doble híbrido Split-Ubiquitina.....	31
Figura 15. Inmunodetección del ensayo de crecimiento Split-Ubiquitina.....	32
Figura 16. Inmunodetección de la construcción YCp_KAT1-Cub de MoClo.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño específico de cebadores con sitios de restricción para insertarse en el plásmido de entrada y posteriormente en el plásmido binario.	16
Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación y posterior inserción de los fragmentos deseados... 17	17
Tabla 3. Protocolo para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	18
Tabla 4. Protocolo para la restricción y posterior ligación de los plásmidos parte.	19
Tabla 5. Protocolo para la restricción y posterior ligación de los plásmidos binarios.	20
Tabla 6. Anticuerpos usados para la detección de las proteínas KAT1, KAT2, BAG4 y sus variaciones. ...	23
Tabla 7. Estructura de los plásmidos parte diseñados pP2_pMET25, pP3a_3XHA-Nub y pP4a_Cub.	24
Tabla 8. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las diferentes piezas específicas de Split-Ubiquitina.....	24
Tabla 9. Estructura de los plásmidos binarios receptores YCp_GFPdrop_URA3_KanR y YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR.	25
Tabla 10. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios receptores y de estos mismos.....	25
Tabla 11. Estructura de los plásmidos correspondientes a KAT1, KAT2 y los fragmentos para formar quimeras.	27
Tabla 12. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios quimera KAT1/KAT2 y de estos mismos.....	29
Tabla 13. Estructura de los plásmidos correspondientes a BAG4 y sus distintas modificaciones.....	29
Tabla 14. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios BAG4 y de estos mismos.....	31

Abreviaturas

ABA – Ácido abscísico

Ade – Base nucleotídica Adenina

ATPasa – Adenosín trifosfatasa

BAG – *Bcl-2 associated athanogene*

BD – Dominio BAG

CDS – Secuencia codificante

CNBD – Dominio de unión a nucleótidos cíclicos

Cub – Región C-terminal de la ubiquitina

HA – Hemaglutinina

His – Aminoácido Histidina

kDa – Kilo Daltons

LB – Medio de cultivo Luria-Bertani

MoClo – Modular Cloning

NTP – Nucleótido trifosfato

Nub – Región N-terminal de la ubiquitina

OD – Densidad óptica

pb – Pares de bases

PCD – Muerte celular programada

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

SD – Medio mínimo

ssDNA – *Salmon sperm DNA*

TCA – Ácido tricloroacético

Trp – Aminoácido Triptófano

UBP – Proteasas específicas de la ubiquitina

VSD – Dominio sensible al voltaje

YPD – Medio *Yeast Extract-Peptone-Dextro*

1. Introducción

1.1. Homeostasis iónica

Cualquier organismo vivo, para poder ejercer correctamente sus funciones vitales, necesita mantener una composición iónica intracelular adecuada. La célula debe ser capaz de acumular los iones que necesite sin llegar a alcanzar nunca concentraciones que puedan ser tóxicas. Además, la célula no solo debe encargarse de la correcta entrada y salida de los iones, sino que debe ser capaz de actuar de forma selectiva, diferenciando los iones relevantes de sus homólogos químicos tóxicos (Yenush, 2016). El proceso mediante el cual los distintos organismos regulan este hecho se conoce como homeostasis iónica. Para lograr alcanzar una correcta homeostasis, es necesaria tanto la acción de canales transportadores de membrana de iones como rutas de transducción de señales que se encarguen de mantener las concentraciones iónicas necesarias. Esta relación homeostática de los diferentes iones se puede observar a nivel molecular, dado que la deficiencia o exceso de uno de los compuestos inorgánicos normalmente implica la modificación de la expresión de genes relacionados con la homeostasis de otros (Rouached *et al.*, 2010).

Sin embargo, aunque se conocen muchos de los canales transportadores, su función fisiológica aún se está estudiando. En definitiva, las bases moleculares y la importancia biológica detrás de los mecanismos implicados en la homeostasis iónica no se conocen por completo (Rouached *et al.*, 2010). Por tanto, son importantes los estudios que permitan conocer mejor el funcionamiento de este proceso tan esencial que afecta directa e indirectamente a cientos de procesos celulares y fisiológicos. En concreto, nos centramos en la importancia que tiene en las plantas. En estos organismos la homeostasis de iones tales como el sodio o el potasio tiene especial relevancia a la hora de permitir el crecimiento o hacer frente a diferentes estreses ambientales.

1.1.1. Los estomas

Los estomas son estructuras porosas microscópicas que se encuentran distribuidas en la epidermis de las partes aéreas de las plantas, especialmente en las hojas, a excepción de las especies acuáticas. Cada estoma está formado por dos células, llamadas células oclusivas, que rodean una apertura epidérmica porosa llamada ostiolo (Figura 1) (Kirkham, 2014). Estas estructuras aparecieron por primera vez en plantas terrestres hace más de 400 millones de años y desde entonces han evolucionado. En función de la especie y las condiciones ambientales, el tamaño y la densidad de aparición de los estomas puede variar, aunque existe una relación generalizada entre ambos parámetros (Hetherington y Woodward, 2009).

Los estomas se pueden encontrar en las plantas con vascularización como son los helechos, las gimnospermas o las angiospermas, como es el caso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En las angiospermas las células oclusivas presentan una estructura en forma de media luna, cuyo cambio en turgencia mediado por flujos osmóticos permite controlar el tamaño de la apertura o poro. De tal forma, un incremento de la turgencia abriría el poro mientras que el cierre vendría con la pérdida de la turgencia celular (Susmilch *et al.*, 2019). Es este movimiento controlado de

apertura-cierre el que permite que los estomas actúen como válvulas reguladoras del intercambio gaseoso y la transpiración. De tal forma, permitiendo la entrada de dióxido de carbono y la salida de vapor de agua, estos organismos sésiles son capaces de optimizar tanto la fotosíntesis como el uso del agua (Casson y Gray, 2008; Scharwies y Dinneny, 2019).

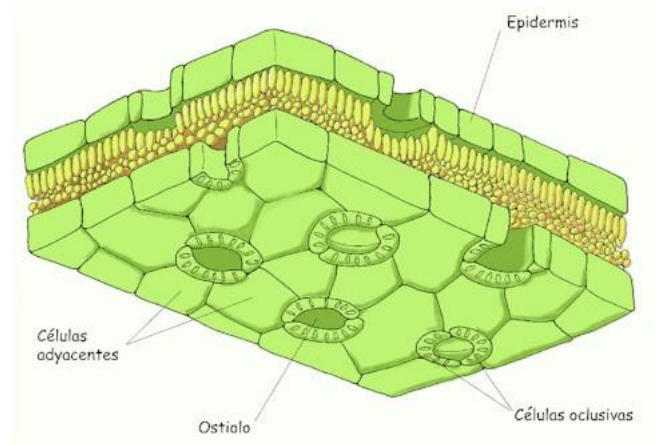


Figura 1. Organización celular en la epidermis de la hoja. Representación de la epidermis de la hoja donde se diferencian las estructuras porosas conocidas como estomas, formados por dos células oclusivas rodeando una apertura, el ostiolo. Imagen de http://servicios.educarm.es/cnice/biosfera/datos/alumno/1bachillerato/reino_vegetal/contenidos6.htm (consultado el 28 de abril de 2020).

La apertura de los estomas puede venir dada por distintos estímulos como son la concentración de CO₂, la humedad ambiental, la luz, la temperatura, distintos estreses tanto bióticos como abióticos o incluso hormonas propias de la planta (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013; Kirkham, 2014; Assmann, 1993).

El proceso de apertura viene dado por la salida de protones de las células oclusivas por acción de la H⁺-ATPasa, que se activa ante la presencia de auxinas y luz azul (Hayashi *et al.*, 2011). Sin embargo, el Ca²⁺ y el ácido abscísico (ABA) regulan negativamente la acción de esta bomba. La activación de esta bomba de protones empieza con la fosforilación, por parte de una proteína con actividad kinasa, de su penúltima treonina en la región C-terminal. Una vez fosforilada la treonina, a esta se une una proteína 14-3-3, activándose así la H⁺-ATPasa (Yin Wang *et al.*, 2014). El eflujo de protones lleva a una hiperpolarización de la membrana, lo que conlleva la activación de canales de entrada de K⁺ dependientes de voltaje, como KAT1 y KAT2, y la consecuente entrada de K⁺ a las células oclusivas. La entrada de potasio se contrarresta con la entrada de iones cargados negativamente, principalmente el Cl⁻ y en menor medida NO₃⁻ y con la síntesis de malato²⁻ (Figura 2A). Asimismo, se produce acumulación de sacarosa y entrada de H₂O vía acuoporinas, lo que combinado con el flujo de osmolitos, produce un aumento en la turgencia y volumen de las células oclusivas, llevando a la apertura de los estomas (Andrés *et al.*, 2014; Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013).

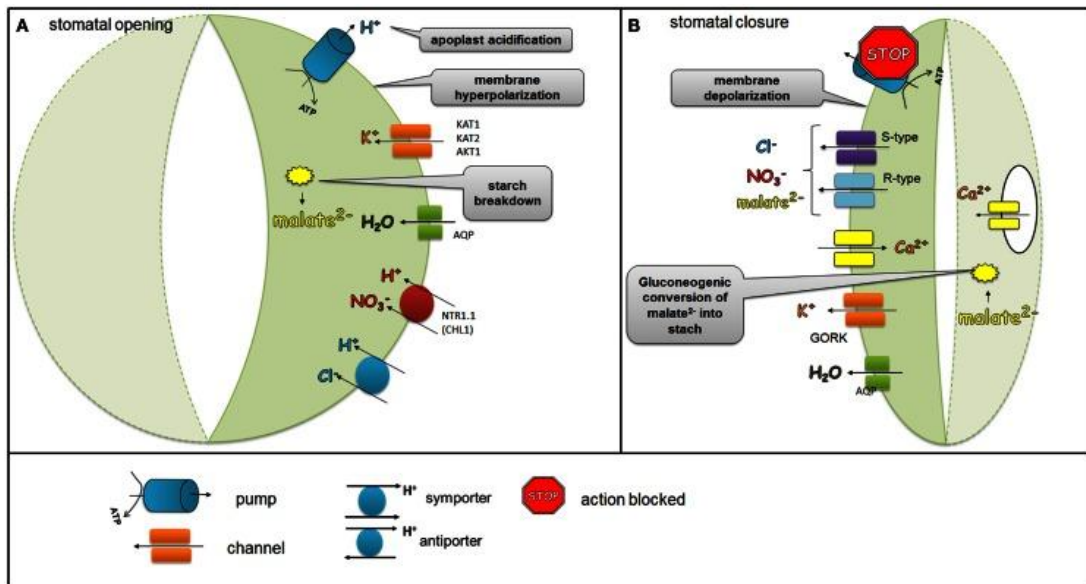


Figura 2. Proceso simplificado de apertura y cierre estomático. (A) Se produce un eflujo de H⁺, por acción de la bomba H⁺-ATPasa, lo que produce la hiperpolarización de la membrana y consiguiente entrada de potasio y agua, así como aumento de la turgencia y apertura estomática. (B) La salida masiva de los iones previamente acumulados lleva también a una salida del H₂O, lo que conlleva la pérdida de volumen celular y turgencia, provocando el cierre estomático. Imagen de Daszkowska-Golec y Szarejko (2013).

El cierre estomático normalmente viene dado por la oscuridad o altas concentraciones de CO₂ y ABA (hormona sintetizada como respuesta a la sequía). La característica común de todas estas señales es que llevan a la alcalinización del espacio apoplástico, disminuyendo así la actividad de la bomba de protones H⁺-ATPasa (Cotelle y Leonhardt, 2016; Hedrich *et al.*, 2001). Así pues, en un primer momento se produce la inactivación de la bomba de protones H⁺-ATPasa y se activan canales de aniones que expulsan los aniones previamente acumulados, lo que produce la despolarización de la membrana plasmática (Figura 2B). La despolarización fuerza la salida de K⁺ de las células oclusivas vía canales de potasio como GORK así como la inhibición de los canales de entrada de K⁺. Mientras se produce la salida de los iones al exterior celular, ocurre un aumento del Ca²⁺ citoplasmático gracias a la acción de canales presentes tanto en la membrana plasmática como en endomembranas (Andrés *et al.*, 2014; Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). Todo esto lleva a la salida de agua de las células oclusivas, lo que se traduce en pérdida de turgencia y cierre estomático.

1.1.2. El rol del potasio

El potasio es un catión monovalente y uno de los macro nutrientes esenciales para el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas. De hecho, está implicado en muchos de los procesos fisiológicos normales de la planta como pueden ser la osmorregulación, la activación enzimática, la síntesis proteica, el mantenimiento del potencial de membrana o la fotosíntesis, entre otros procesos. Como ya se ha comentado, también tiene un papel clave en la presión de turgencia celular, controlando así también el movimiento estomático. Un suficiente suministro de potasio también puede mejorar la tolerancia frente a diferentes estreses tanto bióticos como

abióticos, como son el estrés salino o la sequía (Gierth y Mäser, 2007; Yi Wang y Wu, 2017).

Tal es su importancia que es el catión presente en mayor concentración en las células de la planta, siendo un 10% del peso seco de la planta. De hecho, se acumula a concentraciones bastante altas en el citoplasma (aproximadamente 100 mM) y a concentraciones variables en la vacuola (10-200 mM) (Rodríguez-Navarro, 2000). Estas condiciones no se alcanzan con otros iones como puede ser el sodio, beneficioso y esencial pero solo a bajos niveles, ya que una alta concentración de este elemento resultaría tóxica para la planta (Adams y Shin, 2014).

La demanda de potasio se cumple mediante su captación del suelo por acción las raíces para posteriormente transportarse por los vasos hasta las partes aéreas de la planta. Sin embargo, frente a un estrés como la sequía, disminuye la movilidad del potasio presente en el suelo, dificultando la toma de este. Este es un gran problema ya que el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de K^+ es crucial para la resistencia de la planta a la sequía (Shabala y Pottosin, 2014). Especialmente, y como ya se ha comentado, es importante en el control del movimiento de los estomas y, con ello, de la transpiración. Frente a la sequía y con deficiencia de potasio, los estomas no pueden funcionar correctamente, lo que supone una mayor pérdida de agua por parte de la planta. Por tanto, a la hora de desarrollar variedades con mayor resistencia a la sequía, capaces hacer un uso eficiente del potasio, es necesario estudiar más a fondo los mecanismos moleculares detrás de la toma y transporte del potasio (Wang *et al.*, 2013).

1.2. Canales transportadores de potasio en Arabidopsis

Como ya se ha visto, mantener una concentración adecuada de potasio es esencial para la planta. La planta debe tomar el potasio del suelo y transportarlo allá donde sea necesario, cosa que consigue gracias a la acción de canales transportadores de potasio de alta y baja afinidad. Este proceso fue estudiado por primera vez por Epstein *et al.* (1963) y desde entonces se ha progresado mucho, llegando a caracterizar los distintos tipos de transportadores que existen.

Concretamente, en el organismo modelo *A. thaliana* se han encontrado hasta 75 genes codificantes para distintos canales transportadores de potasio (Anschütz *et al.*, 2014). Encontramos entonces hasta 4 familias de transportadores de membrana clasificados en base a su estructura y función (Szczerba *et al.*, 2009). Por una parte tenemos la familia HAK/KUP/KT, formada por canales de entre 10-14 dominios transmembrana (Gierth y Mäser, 2007), la familia HKT/TRK/KTR, que no solo actúan como co-transportadores de H^+ - K^+ , sino también como co-transportadores de Na^+ - K^+ o incluso solo de Na^+ (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010) y la familia CPA. La última familia que encontramos es la de los canales *Shaker*, los únicos conservados en todos los reinos.

1.2.1. Familia *Shaker*

Existen al menos 9 genes codificantes relacionados con los canales tipo *Shaker*: GORK, SKOR, SPIK, KAT1, KAT2, AKT1, AKT2, AKT6 y *AtKC1* en *A. thaliana*. Entre estos, encontramos a GORK y SKOR, que actúan como canales de salida del potasio.

Sin embargo, el resto, a excepción de AKT6 cuya función se desconoce, actúan como canales de entrada de K^+ . El canal SPIK está implicado en la toma de K^+ en el polen mientras que AKT1 y *AtKC1* son clave en la absorción de K^+ del suelo, AKT2 en el transporte a larga distancia y KAT1 y KAT2 participan en la entrada de K^+ en las células oclusivas (Very y Sentenac, 2003; Lebaudy *et al.*, 2010).

Los canales *Shaker* funcionan como proteínas homo o hetero-tetraméricas que se construyen a partir de cuatro subunidades α (Figura 3B). Todas estas subunidades comparten una misma estructura (Figura 3A). Por una parte, se componen de 6 dominios transmembrana, donde los 4 primeros forman un dominio sensible al voltaje (VSD), que se cree que ha evolucionado de la fusión de dos genes y es esencial en la detección del potencial de membrana (Anschütz *et al.*, 2014). Dentro del VSD, el cuarto dominio transmembrana es el más importante ya que contiene aminoácidos cargados positivamente y está directamente relacionada en la detección de cambios de potencial (Lebaudy *et al.*, 2010). Además, entre el quinto y sexto dominio transmembrana se encuentra el dominio poro, que contiene el motivo TxGYGD, responsable de la selectividad al potasio (Dreyer y Blatt, 2009).

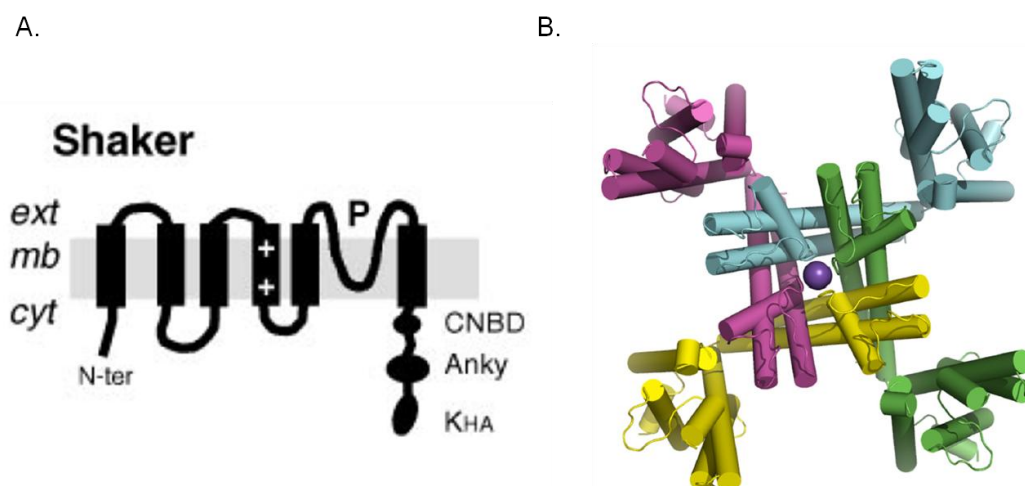


Figura 3. Estructura y organización tridimensional de los canales *Shaker*. (A) Estructura bidimensional característica de los canales *Shaker*, con seis dominios transmembrana y tres dominios (CNB, Ank y K_{HA}) en la región C-terminal citoplasmática. (B) Organización tridimensional como tetrámero de un canal *Shaker*, formado por cuatro subunidades α que dejan un poro permeable al K^+ . Imágenes modificadas de Very y Sentenac (2003) y Anschütz *et al.* (2014).

Por último, presentan regiones N y C-terminal citosólicas y en esta última, de mayor tamaño, se encuentran tres dominios reguladores diferentes. El dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD), una región K_{HA} que puede estar implicada en la tetramerización de los canales y, solo en alguno de los canales *Shaker*, un dominio anquirina que se cree que puede interactuar con proteínas reguladoras (Very y Sentenac, 2003).

1.2.1.1. *AtKAT1*

KAT1 es un canal dependiente de voltaje perteneciente a la familia *Shaker* constituido por 677 aminoácidos. Se expresa en las células oclusivas y juega un papel clave en la apertura y cierre de los estomas, aunque se piensa que su papel no es estrictamente

esencial (Nakamura *et al.*, 1995; Szyroki *et al.*, 2001). Fue, junto con AKT1, el primer canal rectificador de entrada clonado de la planta modelo *A. thaliana* en 1992 por parte de Anderson *et al.* (1992).

Como subunidad α , para la formación de los canales *Shaker* KAT1 puede formar los tetrámeros tanto consigo mismo (homotetrámero) como con otras de las subunidades α (heterotetrámeros). Entre estas, cabe destacar la subunidad α KAT2, homólogo de KAT1, que también se expresa en las células oclusivas y con el que se obtiene la forma mayoritaria de tetramerización, los canales KAT1-KAT2 (Lebaudy *et al.*, 2010).

Al ser un canal de gran importancia en el movimiento estomático, KAT1 debe estar finamente regulado y conocer los mecanismos detrás de esta regulación puede ser de gran importancia. Se conocen distintas proteínas capaces de interactuar con KAT1, regulando su actividad. Un ejemplo de este fenómeno son las proteínas 14-3-3 de maíz, que mediante la unión a KAT1 estimulan las corrientes de paso de K^+ a la vez que son capaces de modular el número de canales presentes en la membrana (Sottocornola *et al.*, 2006, 2008). Por el contrario, la corriente de paso de K^+ parece verse afectada negativamente cuando KAT1 es fosforilado, en presencia de Ca^{2+} , por la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} CDPK (Berkowitz *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1998). También se ha visto que la interacción de KAT1 con proteínas SNARE y ABA es capaz de inducir la endocitosis del canal, disminuyendo así los canales presentes en la membrana (Sharma *et al.*, 2013).

1.3. Familia Bcl2-associated athanogene (BAG)

La muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés) tiene un papel esencial en el desarrollo y la fisiología de todo tipo de organismos, entre los que se incluye a las plantas. De hecho, los genes que regulan la PCD se conservan incluso a grandes distancias evolutivas. Una de las familias de proteínas implicadas en la regulación de este proceso es la de las proteínas BAG (Doukhanina *et al.*, 2006). Su nombre viene dado por la primera proteína perteneciente a esta familia, BAG1, que se descubrió en un rastreo para encontrar proteínas que interactuaran con la proteína humana Bcl-2 y que juega un papel clave en algunas rutas apoptóticas (Takayama *et al.*, 1995).

Al igual que muchos otros organismos como levaduras, anfibios o mamíferos, en el genoma de *A. thaliana* se encuentran genes codificantes para miembros de la familia BAG. En concreto, hay 7 proteínas pertenecientes a esta familia que fueron identificadas gracias al uso de varios algoritmos bioinformáticos muy avanzados (Figura 4A). Todas estas proteínas se caracterizan por contener un dominio conservado cerca de la región C-terminal llamado dominio BAG (BD), capaz de interactuar con alta afinidad con el dominio ATPasa de las proteínas de choque térmico Hsp70 (Takayama y Reed, 2001). Pese a esta característica común, las proteínas BAG suelen diferir respecto a su región N-terminal, lo que les confiere especificidad para la acción sobre ciertas rutas de señalización. De tal forma, se encuentran al menos dos grupos diferenciales dentro de la familia. Por un lado, AtBAG1-4 presentan un dominio de ubiquitinación en la zona N-terminal mientras que AtBAG5-7 contienen un dominio de unión a calmodulina cerca del BD. Además, la localización de las distintas proteínas también varía, ya que las predicciones apuntan a

que pueden estar presentes en el citosol (*AtBAG1-4*), mitocondria (*AtBAG5*) o núcleo (*AtBAG6-7*) (Doukhanina *et al.*, 2006).



Figura 4. Familia de proteínas Bcl2-associated athanogene (BAG) en *Arabidopsis thaliana*. (A) Representación de las distintas proteínas pertenecientes a la familia BAG en *A. thaliana*, con los dominios presentes en cada una de ellas. (B) Representación tridimensional del dominio BAG (BD) característico de las proteínas BAG en la proteína de *A. thaliana* BAG4. Imagen adaptada de Doukhanina *et al.* (2006) y Kabbage *et al.* (2016).

Esta familia de proteínas se ha estudiado principalmente en mamíferos, donde se ha visto que son capaces de regular gran variedad de procesos tales como la actividad de factores de transcripción y proteínas quinasa o la señalización mediada por receptores. Mediante esta regulación se ven afectados distintos mecanismos celulares como la apoptosis o la división y diferenciación celular. Todo esto es probablemente resultado de la gran cantidad de proteínas que se ha visto que interactúan con miembros de la familia BAG. Estas interacciones pueden ocurrir directamente con las proteínas BAG o pueden estar mediadas por el reclutamiento inicial de sistemas de chaperonas como Hsp70. De esta forma, las proteínas BAG se unirían mediante su BD al dominio ATPasa en la región N-terminal de Hsp70, mientras que la región C-terminal de la misma sería capaz de interactuar con distintas proteínas diana (Takayama y Reed, 2001). Además, también se ha visto en mamíferos que ciertas proteínas BAG como BAG1 están implicadas en la regulación de canales iónicos como el canal de potasio humano *Ether a-go-go* o el canal de cloro implicado en la fibrosis cística, CFTR (Hantouche *et al.*, 2017; Young, 2014). En estos casos parece que las proteínas BAG median la degradación de los canales.

Sin embargo, posteriores estudios en plantas han demostrado que estas proteínas también ejercen funciones de gran importancia como la resistencia a patógenos (*AtBAG6*) o a estreses abióticos (*AtBAG4*) (Doukhanina *et al.*, 2006; Kabbage *et al.*, 2016).

1.3.1. BAG4

Una de las proteínas pertenecientes a la familia BAG en *A. thaliana* es BAG4 que, como ya se ha comentado, se ha relacionado con una mayor resistencia o tolerancia a estreses abióticos. Los estreses abióticos como la sequía, la salinidad, la toxicidad química o el frío provocan enormes pérdidas en los cultivos a nivel mundial. Normalmente están interconectados ya que los daños que causan suelen ser

comunes, como el estrés oxidativo, y suelen conducir a la activación de rutas de señalización similares. Por lo tanto, una proteína capaz de mejorar la capacidad de la planta a resistir toda esta variedad de estreses gana interés (Kabbage y Dickman, 2008).

Diferentes estudios prueban esta relación entre BAG4 y la tolerancia a estreses abióticos. Doukhanina *et al.* (2006) realizaron distintos ensayos en tabaco donde *AtBAG4* se expresaba a diferentes niveles a la vez que la planta se sometía a algún tipo de estrés como exposición a radiación UV, a sustancias oxidantes, al frío o tratamientos de salinidad y sequía. Los resultados para todos los experimentos fueron similares, observando que una baja expresión de BAG4 resultaba en una mayor tolerancia y supervivencia a todos los tipos de estrés a los que se sometieron las plantas. De la misma forma, Hoang *et al.* (2015) realizaron estudios en arroz, donde también se demostró que la expresión de *AtBAG4* resultaba en una mayor tolerancia a la salinidad.

Al igual que el resto de proteínas de la familia BAG, BAG4 presenta un dominio BAG (Figura 4B) que conserva la mayoría de residuos necesarios para la unión con la proteína Hsp70, al igual que su homólogo en mamífero. Dada la alta homología de los BD, incluso con respecto a la distribución de cargas, en la proteína humana y la de *A. thaliana*, se asumió y posteriormente comprobó que *AtBAG4* también es capaz de interactuar con Hsp70. Este dominio altamente conservado está formado por entre 110 y 130 aminoácidos. Su estructura secundaria se caracteriza por tener tres hélices α antiparalelas de unos 30-40 aminoácidos cada una, siendo la segunda y la tercera las que forman la zona de unión a Hsp70 (Nawkar *et al.*, 2017). Se ha observado que la concentración celular de una proteína BAG en relación con la concentración de Hsp70 puede ser muy determinante a la hora de obtener una actividad óptima de esta chaperona. Es posible que altas concentraciones de las proteínas BAG puedan inhibir la actividad de Hsp70 al alterar su ciclo de hidrólisis del ATP. Bajo condiciones de estrés, es especialmente importante para la supervivencia celular tener una actividad adecuada por parte de Hsp70. Por tanto, parece que mantener una baja concentración de BAG4 es esencial a la hora de obtener un fenotipo resistente a los estreses abióticos (Doukhanina *et al.*, 2006; Nawkar *et al.*, 2017).

Además, en un estudio reciente realizado por nuestro laboratorio se ha visto que BAG4 actúa como regulador del canal transportador de potasio KAT1 (Locascio, Marques, *et al.*, 2019). Mediante diversos ensayos se vio que BAG4 es capaz de interactuar con los canales de potasio KAT1 y KAT2 y, de esta forma, regular indirectamente el movimiento estomático. Por un lado, la co-expresión de BAG4 y KAT1 aumenta la actividad de este último ya que aumenta el número de canales activos en la membrana. Sin embargo, la falta de expresión de BAG4 produce un retraso en la apertura de los estomas. Por tanto, tanto la pérdida como ganancia de función de BAG4 afecta a la dinámica del movimiento estomático. En consecuencia, el estudio de BAG4 y su efecto regulador sobre KAT1 gana importancia a la hora de mejorar la tolerancia a la sequía de los cultivos.

1.4. Doble híbrido de levadura: Split-Ubiquitina

Las interacciones que se producen entre proteínas tienen gran interés, puesto que son parte fundamental del funcionamiento normal de las células y se ven implicadas en la mayoría de los procesos biológicos (Thaminy *et al.*, 2004). Es por esto por lo que el estudio de dichas interacciones, entre qué proteínas ocurre y cómo, es de gran utilidad para comprender cómo funcionan y se regulan las células. Con la intención de estudiar estas interacciones aparecen técnicas como el sistema Split Ubiquitina. El sistema Split-Ubiquitina fue diseñado por primera vez en 1994 (Johnsson y Varshavsky, 1994) y se basa en la capacidad de la proteína Ubiquitina de separarse en sus dos fragmentos (Nub, para la región N-terminal, y Cub, para la región C-terminal) para luego reensamblarse de forma espontánea. Este sistema fue modificado posteriormente para su uso en el estudio de interacciones en las que intervienen proteínas de membrana (Stagljar *et al.*, 1998), como alternativa al doble híbrido de levadura tradicional (Fields y Song, 1989).

El ensayo tradicional consiste en la creación de dos proteínas de fusión, de forma que una se fusiona al dominio de unión al ADN de un factor de transcripción (proteína “bait”), mientras que la otra se une al dominio de activación del mismo factor (proteína “prey”). Así, la interacción entre las proteínas “bait” y “prey” lleva a la reconstitución del factor de transcripción, que vuelve a ser funcional y conduce a la activación de un gen reportero. Mediante el crecimiento de las levaduras en medios donde su supervivencia dependa de la activación de dicho gen reportero, se puede identificar si ocurre o no dicha interacción. Sin embargo, este ensayo necesita que las proteínas a estudiar sean capaces de entrar al núcleo para la reconstitución del factor de transcripción, lo cual imposibilita su uso en proteínas de membrana (Locascio, Andrés-Colás, *et al.*, 2019). Por ello surgen ensayos como el ya comentado Split-Ubiquitina que, aunque siguen la misma dinámica de reconstrucción funcional, al hacerlo con una proteína citosólica, permiten estudios de proteínas de membrana.

Para ello, en este tipo de ensayo se une a cada una de las proteínas estudiadas (“bait” y “prey”) un fragmento de la proteína ubiquitina, el fragmento Cub o Nub respectivamente. De esta forma, se consiguen dos proteínas recombinantes que, si interaccionan, llevarán a la reconstitución de la ubiquitina, que volverá a ser funcional. En nuestro caso en concreto, la proteína de interés usada como “bait” se trató de KAT1, que fue fusionada al fragmento C-terminal de la ubiquitina. A su vez, el fragmento Cub está fusionado al factor de transcripción de *E. coli* LexA, que contiene un dominio de unión al ADN, y al dominio de activación VP16 derivado del virus del herpes simple. Por otro lado, la proteína usada como “prey” fue BAG4, que se fusionó al fragmento N-terminal de la ubiquitina. Cuando se co-expresan ambos dominios de la ubiquitina como cadenas polipeptídicas independientes *in vivo*, dada su alta afinidad, se reensamblan espontáneamente (Snider *et al.*, 2010). El hecho de que se diese este suceso en un ensayo de interacción de proteínas podría resultar en la obtención de falsos positivos de interacción. Por tanto, para solucionar este posible problema, se introdujo una mutación puntual en la posición 13 del dominio Nub. Así pues, se sustituyó la isoleucina presente por una glicina. Esta mutación evita la reconstitución espontánea de la ubiquitina y garantiza que este suceso solo ocurrirá en caso de una alta proximidad espacial entre ambos dominios. En consecuencia, solo si las proteínas

fusionadas a Nub y Cub interaccionan, tendrán estos fragmentos la suficiente cercanía como para reconstituirse.

Una vez formada la ubiquitina, esta es reconocida por las enzimas proteasas específicas de ubiquitina (UBPs) presentes en la levadura. Con la unión de las UBPs se produce un corte en la región C-terminal del fragmento Cub, liberándose LexA-VP16. El fragmento liberado viaja entonces al núcleo donde actúa como factor de transcripción, activando los genes reporteros (Figura 5). En nuestro caso, con el fondo genético de la cepa de levadura empleada, los genes reporteros son *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*.

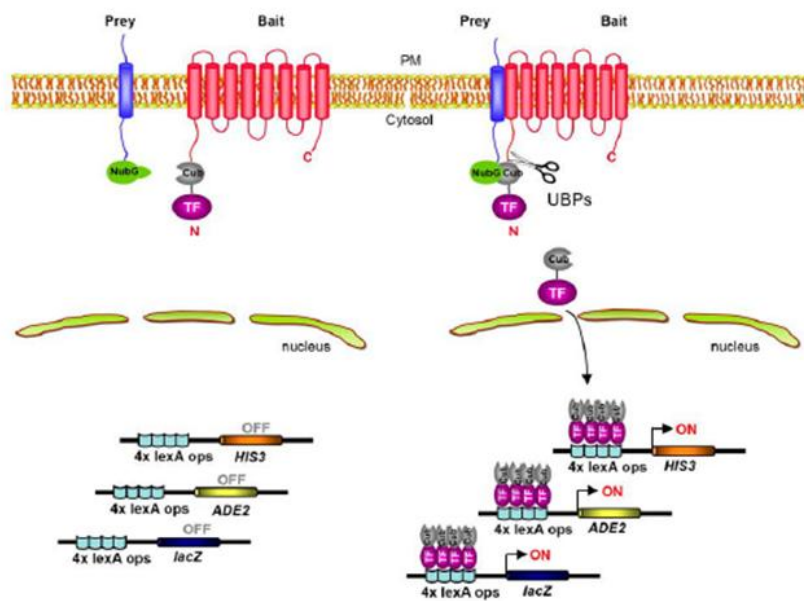


Figura 5. Representación del sistema Split Ubiquitina en levadura. A la izquierda, cuando las proteínas “bait” y “prey” no interaccionan, los fragmentos Cub y Nub no tienen la suficiente afinidad como para reconstituirse. Sin embargo, cuando existe interacción, ambos dominios se unen y son reconocidos por las UBPs (proteasas específicas de ubiquitina). Esto lleva al corte del fragmento LexA-VP16, que viaja al núcleo, donde inicia la transcripción de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*. Imagen de Gisler *et al.* (2008).

1.5. El sistema MoClo

Uno de los puntos clave en el ensayo Split-Ubiquitina es la obtención de esas proteínas recombinantes. En este tipo de estudios puede llegar a ser muy interesante el hecho de obtener distintos mutantes de los genes de interés o incluso proteínas quiméricas. Sin embargo, este proceso puede resultar largo, por lo que surge la necesidad de un método rápido y versátil de obtención de plásmidos.

Concretamente en este estudio, para poder realizar un estudio de interacción de proteínas, se ha hecho uso de un método de clonación modular que se ha empezado a usar en los últimos años, conocido como sistema MoClo (*Modular Cloning*) en levadura (Lee *et al.*, 2015). Esta es una adaptación del sistema MoClo diseñado por (Weber *et al.*, 2011) para conseguir dispositivos de expresión en levadura. MoClo se

basa en la tecnología de clonación Golden Gate, que permite un ensamblaje de distintos fragmentos de ADN en una única reacción y con gran eficacia (Engler *et al.*, 2009). Este sistema también se ha adaptado a otros organismos como las plantas (Hahn *et al.*, 2020; Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011), las bacterias (Andreou y Nakayama, 2018; Iverson *et al.*, 2016), los mamíferos (Duportet *et al.*, 2014; Martella *et al.*, 2017) o más recientemente, a hongos filamentosos (Hernanz-Koers *et al.*, 2018).

En esta técnica se considera que los vectores de expresión están compuestos por ocho tipos de partes, cada una con su propia función (Lee *et al.*, 2015). Entre estas partes se encuentran los genes a expresar, los promotores o las resistencias a antibióticos para una posterior selección en *E. coli*, entre otros. Lo interesante de este método viene del hecho de que estas piezas son intercambiables por otras del mismo tipo.

Cada parte se caracteriza por tener unos extremos cohesivos característicos que encajan con las partes anterior y posterior (Figura 6B). Es por ello por lo que una pieza se puede sustituir por otra del mismo tipo, pues tiene los mismos extremos y son equivalentes. De esta forma, se puede intercambiar fácilmente el gen a expresar, por ejemplo. Además, algunas de estas partes, a su vez, tienen subpartes también intercambiables (Figura 6B). Esto gana importancia en las partes que corresponden a los genes a expresar. Estas subpartes permiten la fácil obtención de proteínas de fusión, ya que se pueden usar distintas regiones de distintos genes como subpartes y unirlos para formar un gen recombinante nuevo. Como ya se ha dicho, para realizar el estudio mediante el sistema Split Ubiquitina se deben obtener proteínas de fusión y, mediante este sistema de clonación, se pueden conseguir de forma relativamente sencilla. Tan solo sería necesario intercambiar alguna de las partes o subpartes para obtener una proteína recombinante diferente.

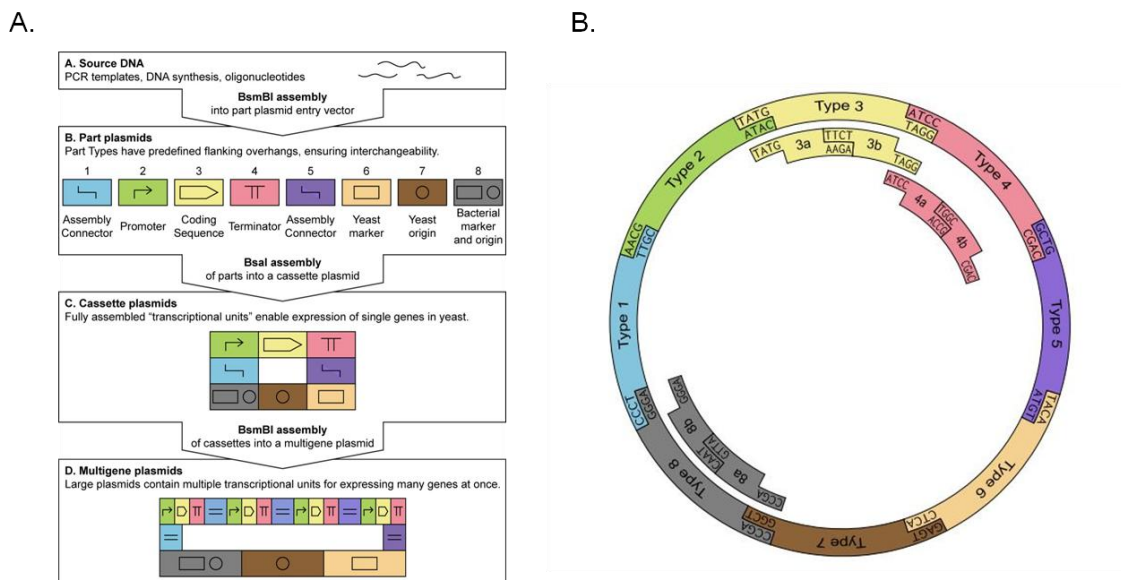


Figura 6. Representación del sistema jerárquico para la construcción de los plásmidos parte, binarios y multigénicos. (A) Esquema donde se representa el orden a seguir para la obtención de los distintos tipos de construcciones. (B) Representación de un plásmido binario, donde cada tipo de parte tiene unos extremos cohesivos característicos que permiten el correcto ensamblaje de las piezas. Las piezas tipo tres, cuatro y ocho, además, se pueden subdividir en dos partes, también con sus extremos cohesivos propios. Imagen adaptada de Lee *et al.* (2015).

Tal y como se ha comentado anteriormente, cada una de las piezas se caracteriza por cumplir una función dentro del vector de expresión. Las partes 1 y 5 corresponden a conectores, las partes 2 son promotores, las partes 3 son secuencias codificantes (CDS), las 4 terminadores, las 6 son genes que codifican para enzimas que participan en rutas biosintéticas de aminoácidos o bases nitrogenadas para selección en levaduras, las 7 son sitios de origen de replicación para levadura y las 8, marcadores de resistencia a antibióticos para su selección en bacterias y un sitio de origen de replicación de bacterias.

Este sistema sigue un esquema jerárquico, de forma que se debe seguir una secuencia concreta de pasos para alcanzar las construcciones completas (Figura 6A). En primer lugar, se deben “domesticar” las secuencias de ADN, es decir, se deben adaptar al sistema MoClo. Para ello, es necesario realizar un primer paso en el que se eliminen los sitios de reconocimiento endógenos para las endonucleasas tipo IIS BsmBI y BsaI. Entonces se realiza una amplificación de dicha secuencia con unos cebadores diseñados específicamente y que contienen los sitios de reconocimiento de las endonucleasas tipo IIS nombradas previamente, así como los cuatro nucleótidos que caracterizan a cada tipo de pieza. El interés a la hora de usar este tipo de endonucleasas deriva del hecho que, a diferencia de otras, son capaces de realizar el corte a distancias definidas fuera de su sitio de reconocimiento (Szybalski *et al.*, 1991). Cabe añadir que dichas secuencias de reconocimiento son asimétricas. Como resultado, tras el corte con una endonucleasa tipo IIS se logran extremos cohesivos cuya secuencia viene determinada no por la endonucleasa usada, sino por la secuencia de nucleótidos donde se produzca el corte (Figura 7). Por tanto, mediante el uso de estas endonucleasas se consiguen los extremos cohesivos concretos que caracterizan a cada una de las partes.

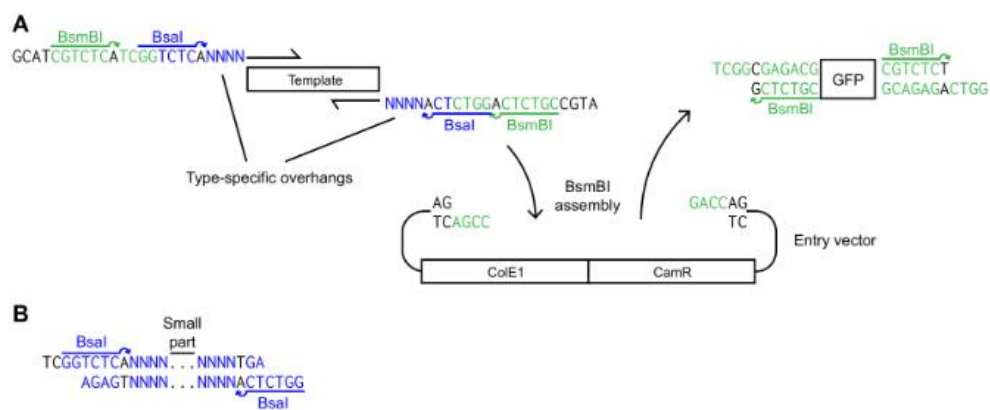


Figura 7. Esquema del proceso de adaptación de secuencias de ADN al sistema MoClo y obtención de plásmidos parte y binarios. (A) En un primer lugar se realiza una amplificación con cebadores específicos que contienen los sitios de reconocimiento de las endonucleasas tipo IIS así como los cuatro nucleótidos que caracterizan a cada tipo de pieza. Para la obtención de los plásmidos parte se introduce el producto de amplificación generado por PCR en un plásmido de entrada mediante una reacción combinada de restricción-ligación con la endonucleasa BsmBI y la ligasa T4. (B) Una vez se consiguen los plásmidos parte, con una reacción combinada de restricción-ligación, esta vez con la endonucleasa BsaI y la ligasa T4, se logra un plásmido binario. Imagen obtenida de Lee *et al.* (2015).

Una vez se han conseguido los productos de amplificación mediante PCR, estos deben introducirse en un vector de entrada para así formar los llamados plásmidos parte. Para ello se lleva a cabo una reacción combinada de restricción-ligación con la

endonucleasa *BsmBI* y la ligasa T4. Los plásmidos parte obtenidos se caracterizan por contener el gen de selección en *E. coli* de resistencia al antibiótico Cloranfenicol así como un origen de replicación en *E. coli* y el fragmento de DNA insertado (Figura 7).

A partir de los plásmidos parte, se pueden obtener unidades transcripcionales completas, también conocidas como plásmidos binarios. De forma similar al proceso de domesticación, en este paso tiene lugar una reacción combinada de restricción-ligación, pero esta vez con la endonucleasa *BsaI*. En este caso, a diferencia del anterior, no se obtiene directamente el plásmido de interés, sino que primero se construye un plásmido binario receptor. Este se compone de seis piezas, entre las que se encuentra un *GFP dropout* (partes 3-4-5) que facilita la selección de plásmidos resultantes de un clonaje corrector, y funciona como vector base para la obtención rápida de diferentes plásmidos binarios. Una vez se ha obtenido un plásmido receptor, tan solo con una nueva restricción-ligación con *BsaI* en la que se añaden a estos el promotor, CDS y terminador deseados, se logran diferentes unidades transcripcionales. Los plásmidos binarios que se obtengan a partir del mismo plásmido binario receptor tendrán ciertas características iguales como los marcadores de selección en *E. coli* y levadura. El uso de los plásmidos binarios receptores permite tanto optimizar el proceso como simplificar el proceso de obtención de distintas unidades transcripcionales, pasando de una reacción con ocho plásmidos parte a una con solo tres plásmidos parte y un plásmido receptor binario. Así pues, al unirse las diferentes piezas gracias a la superposición de sus extremos cohesivos, se consigue un plásmido binario como el de la Figura 6. Se podrían incluso construir vectores multigénicos con una nueva reacción combinada de restricción-ligación con la enzima *BsmBI* a partir de varios plásmidos binarios finales (Figura 6A).

La principal ventaja de este sistema estandarizado de clonación es que, una vez las partes se construyen, se pueden incorporar directamente en construcciones para obtener unidades transcripcionales completas sin tener que volver a realizar amplificaciones por PCR o verificaciones por secuenciación. De esta forma en tan solo un par de días se pueden obtener nuevas construcciones genéticas (Lee *et al.*, 2015).

Con la intención de poder usar este método aplicado al sistema Split Ubiquitina, se diseñaron 3 plásmidos parte o *part plasmids*. Estos contenían tan solo una de las partes que luego formarían parte del plásmido completo. Se diseñaron plásmidos parte con las secuencias de Nub, Cub (fusionado al factor de transcripción) y el promotor *MET25* (*pMET25*) para así poder usarlos posteriormente en el diseño de proteínas recombinantes para el sistema Split Ubiquitina. El uso del *pMET25* viene dado por el hecho de que es un promotor regulable, cuya actividad transcripcional es máxima en ausencia de metionina y se reduce de manera marcada en presencia de este aminoácido (Mumberg *et al.*, 1994; Sinah *et al.*, 2012; Sangsoda *et al.*, 1985; Solow *et al.*, 2005). Esto es consecuencia de la función del gen *MET25*, regulado por este promotor de forma nativa en *S. cerevisiae*. El gen en cuestión codifica la O-acetil-homoserina sulfhidrilasa, que cataliza la transformación de O-acetil-homoserina en homocisteína, que posteriormente se metila para dar lugar a la metionina (Sangsoda *et al.*, 1985). En definitiva, *pMET25* regula la expresión de una enzima implicada en la síntesis de metionina, lo cual explica que los niveles de metionina en el medio afecten al nivel de expresión. Es esta capacidad de modular la expresión del gen controlado por *pMET25* lo que lo hace interesante para su uso.

Así pues, el hecho de conocer cómo funciona y se regula un canal de entrada de potasio como KAT1 es relevante para desarrollar variedades mejor adaptadas a la sequía. Por ello, se pretende estudiar, mediante un ensayo Split-Ubiquitina y en base al sistema MoClo, cómo KAT1 interacciona con su proteína reguladora BAG4 y qué efectos puede tener esto sobre las capacidades funcionales de BAG4.

2. Objetivos

El planteamiento de este proyecto pretende lograr los siguientes objetivos principales:

1. Crear las piezas necesarias para realizar ensayos de Split-Ubiquitina empleando el sistema de *Modular Cloning* (MoClo) en levadura (el fragmento Cub-LexA-VP16, el fragmento Nub-3XHA y el promotor regulable *MET25*).
2. Emplear estas herramientas para construir plásmidos que contengan varias versiones de KAT1 y BAG4 con el fin de determinar las regiones implicadas en la interacción entre estas proteínas mediante el ensayo Split-Ubiquitina en levadura.

3. Materiales y métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepa *E. coli* y medio de cultivo

La cepa de *E. coli* utilizada a lo largo del proyecto es DH5 α . Esta cepa está modificada para maximizar la estabilidad y la calidad del plásmido preparado. Esto se debe a que contiene las mutaciones *recA1*, *endA1* y *lacZM15*. Por una parte, la mutación *recA1* reduce la recombinación homóloga, lo cual supone la obtención de plásmidos más estables. Por otra parte, *endA1* supone la eliminación de una endonucleasa, lo que conlleva un mayor rendimiento de obtención del plásmido. Por último, *lacZM15* permite realizar selecciones de colonias blanco/azul mediante el sistema basado en la β -galactosidasa.

Se usó el medio de cultivo Luria Bertani (LB), compuesto por cloruro sódico (NaCl, 1% m/v), extracto de levadura (0,5% m/v) y triptona (1% m/v) para los medios líquidos. En el caso de los medios sólidos, además de los componentes ya citados se añadió agar bacteriológico (2% m/v). Si se necesitaran medios selectivos, estos también se complementaron con un antibiótico determinado: cloranfenicol (2,5 μ g/mL en etanol), kanamicina (50 μ g/mL) o ampicilina (100 μ g/mL).

3.1.2. Cepa levadura y medios de cultivo

La cepa de levadura usada en este proyecto fue THY.AP4, para así poder realizar un ensayo de Split-Ubiquitina. Esta cepa en concreto contiene los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*, todos bajo el control del promotor LexA. Esto permite realizar ensayos de doble híbrido en levadura, como en nuestro caso el ensayo Split-Ubiquitina, debido a que dichos genes esenciales para el crecimiento de la levadura están bajo control de LexA, que se activa frente a una interacción en el ensayo. La información completa del genotipo relevante de la cepa se resume en lo siguiente: MATa, *ura3*, *leu2*, *lexA::lacZ::trp1*, *lexA::HIS3*, *lexA::ADE2* (Obrdlik *et al.*, 2004).

Se usaron dos medios distintos en función del procedimiento a realizar sobre las levaduras. Para el crecimiento de la cepa se usó el medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD), compuesto por extracto de levadura (1% m/v), peptona (2% m/v) y glucosa (2% m/v). En el caso de ser necesario medio sólido, se añadió agar bacteriológico (2% m/v). Para las transformaciones y los ensayos de interacción se usó el medio mínimo (SD), que contiene agar (2% m/v), base nitrogenada de levadura (0,7% v/v), glucosa (2% v/v) y ácido succínico pH 5,5 (50 mM). Este medio se complementó con los aminoácidos y bases nucleotídicas necesarios, en base a las necesidades de la cepa y de los plásmidos que esta pueda contener. Los aminoácidos a añadir son histidina (30 μ g/mL), leucina (100 μ g/mL), triptófano (100 μ g/mL), uracilo (30 μ g/mL) y adenina (30 μ g/mL). También se complementó, en algunos casos, con X-gal (320 mg/L) y 1X sales BU (70 g/L Na₂HPO₄· 7H₂O, 30 g/L Na₂HPO₄, ajustado a pH 7).

3.2. Obtención de las construcciones genéticas

3.2.1. Domesticación de secuencias al sistema MoClo

Se debe modificar la secuencia a clonar y dejarla lista para poder introducirla en el plásmido de entrada, que acepta cualquier secuencia, sin importar como cuál de las ocho partes funcionará posteriormente. Para que ello hay que adaptar los extremos de la secuencia, de forma que se les añaden sitios de restricción de *BsmBI* (para el plásmido de entrada) y de *BsaI* (para los plásmidos binarios). El sitio *BsmBI* será siempre igual, dado que tiene que dar los mismos extremos cohesivos, sea el tipo de pieza que sea, para unirse al plásmido de entrada. Sin embargo, en el diseño de la zona aguas arriba del sitio para *BsaI* se tiene en cuenta el tipo de parte que queremos obtener. Esta zona debe contener la secuencia adecuada para que, una vez la enzima produzca su corte, los extremos cohesivos resultantes sean los característicos para la parte que queremos conseguir (Tabla 1). Además, es especialmente importante en las piezas y subpiezas 3, correspondientes a la CDS, mantener la pauta de lectura para que la proteína expresada sea la correcta.

De manera simultánea, se deben comprobar las secuencias a insertar para asegurar que no contengan sitios de corte internos de las endonucleasas *BsaI* y *BsmBI*. En el caso de que se encontrara alguno, el primer paso debería consistir en la eliminación de estos sitios que podrían afectar negativamente a la eficacia y funcionamiento del sistema de clonación.

Tabla 1. Diseño específico de cebadores con sitios de restricción para insertarse en el plásmido de entrada y posteriormente en el plásmido binario. (A) Tabla para el diseño de cebadores *forward*. (B).Tabla para el diseño de cebadores *reverse*. *Si se crean proteínas de fusión, para mantener la pauta de lectura, añadir entre la parte específica y la secuencia diana dos pb (CC por ej.). **Añadir codón de parada entre la parte específica y la secuencia diana. Letras rojas: Sitio de corte para la enzima *BsmBI*. Letras verdes: Sitio de corte para la enzima *BsaI*.

A.

Forward (5'-3')		
Parte común	GCATCGTCTCATCGGTCTCA	
Parte específica	Tipo 1	CCCT
	Tipo 2	AACG
	Tipo 3	
	3a	TATG
	3b	TTCT
	Tipo 4	
	4a	ATCC
	4b	TGGC
	Tipo 5	GCTG
	Tipo 6	TACA
	Tipo 7	GAGT
	Tipo 8	
	8a	CCGA
	8b	CAAT
Cebador =	Parte común + parte específica + secuencia diana	

B.

Reverse (5'-3')		
Parte común	ATGCCGTCTCAGGTCTCA	
Parte específica	Tipo 1	CGTT
	Tipo 2	CATA
	Tipo 3	
	3a	AGAA*
	3b	GGAT*
	Tipo 4	
	4a	GCCA**
	4b	CAGC
	Tipo 5	TGTA
	Tipo 6	ACTC
	Tipo 7	TCGG
	Tipo 8	
	8a	ATTG
	8b	AGGG
Cebador =	Parte común + parte específica + secuencia diana	

En concreto, para realizar nuestro estudio y siguiendo las directrices de la Tabla 1, se diseñaron distintos cebadores. Mediante el uso de estos cebadores se obtienen los distintos fragmentos tanto de KAT1 y KAT2, para la posterior formación de las quimeras, como de BAG4. También se diseñaron varios cebadores para lograr un mutante de BAG4 con dos mutaciones puntuales distintas en los aminoácidos 179 y 189. Todos estos se encuentran en la Tabla 2.

Para obtener las piezas específicas para el sistema Split-Ubiquitina (el *pMET25* y los fragmentos Cub y Nub) se siguieron diferentes estrategias. Tanto el plásmido parte con el *pMET25* como el plásmido parte Nub fueron sintetizados por la empresa “Integrated DNA Technologies, BVBA (Bélgica)”. A la hora de diseñar el plásmido *pMET25* se añadió un sitio de corte para la enzima EcoRV. Al plásmido Nub se le añadió una triple etiqueta del epítipo de la hemaglutinina (HA). Sin embargo, dado el gran tamaño del plásmido parte Cub, se encargaron cebadores para su amplificación (Tabla 2C).

Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación y posterior inserción de los fragmentos deseados. (A) Cebadores para la amplificación de los genes KAT1, KAT2 y los distintos fragmentos que forman posteriormente las quimeras. (B) Cebadores para la amplificación del gen BAG4 y los distintos fragmentos de interés de dicho gen, como son BAG4 sin el BD y el BD. Además de dos pares de cebadores para producir mutaciones puntales en BAG4 que inactiven su BD. (C) Cebadores para la amplificación del fragmento Cub.

A.

Cebadores KAT1/KAT2			
KAT1	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG	P3_KAT1_fw
	Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCATTTGATGAAAAATACAAATGATCACCATCCC	P3_KAT1_rv
KAT2	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG	P3_KAT2_fw
	Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC	P3_KAT2_rv
KAT1 lider-KAT2	KAT1 lider (1-63)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC
	KAT2 (64-697)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC
KAT1-KAT2	KAT1 (1-299)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC
	KAT2 (300-697)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC
KAT2-KAT1	KAT2 (1-299)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC
	KAT1 (300-677)	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATATGTCGATCTCTGGACTCGAAATTTCTTCG
		Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGAGTTTTTCATTGATGAGAATATACAAATGATC

B.

Cebadores BAG4			
BAG4	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATTCTAGGCCTGGTGGTATGCTCG	P3b_BAG4_fw
	Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCCAGAACCGTCAAATTTCTCCAATCTTG	P3b_BAG4_rv
BAG4ΔBAGdomain	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATTCTAGGCCTGGTGGTATGCTCG	P3b_BAG4_fw
	Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCAGCAGCAATAGCTTTTTCCATCTCTTTA	P3b_BAG4-143_rv
BAGdomain	Forward (5'-3')	GCATCGTCTCATCGGTCTCATTCTGTTAACGCGGTTACAGGAGAGGTC	P3b_BAG4-144_fw
	Reverse (5'-3')	ATGCCGTCTCAGGTCTCAGGATCCCAGAACCGTCAAATTTCTCCAATCTTG	P3b_BAG4_rv
BAG4pm179	Forward (5'-3')	GTTTGACATGGCTGCAGGGCTTCTTATGAGGCAGC	P3b_BAG4pm179_fw
	Reverse (5'-3')	GCTGCCTCATAAGAAGCCCTGCAGCCATGTCAAAC	P3b_BAG4pm179_rv
BAG4pm189	Forward (5'-3')	GAGGCAGCTGCTCAAATTTGAGTGGCATTGAGGCTGAAGGGG	P3b_BAG4pm189_fw
	Reverse (5'-3')	CCCCCTCAGCCTCAATGCCACTCAATTTGAGCAGCTGCCTC	P3b_BAG4pm189_rv

C.

Piezas Split Ubiquitina			
pP4a_Cub	Forward (5'-3')	5'- GCATCGTCTCATCGGTCTCAATCCGGTGGTGGCGGATC -3'	P4a_Cub_fw
	Reverse (5'-3')	5'- ATGCCGTCTCAGGTCTCAGCCACTACCCACCGTACTCGTCAATT -3'	pP4a_Cub_rev

3.2.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

Con la intención de amplificar los insertos y, además, adaptarlos al sistema MoClo, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se hizo uso de los cebadores que aparecen en la Tabla 2, además de la DNA polimerasa. Como moldes se usaron distintos plásmidos de la colección del laboratorio que ya contenían los fragmentos a amplificar. La mezcla necesaria para la reacción contenía:

- 1 ng de ADN
- 0,2 μ M Oligonucleótido Fw
- 0,2 μ M Oligonucleótido Rv
- 0,8 mM dNTPs
- 5X Tampón GC
- 2% (v/v) DMSO
- 1U Phusion Taq
- Completar hasta volumen final con H₂O

Preparamos la mezcla de forma que conseguimos un volumen final de 25 μ L y se usó el protocolo mostrado en la Tabla 3 en un termociclador. El primer paso a 95°C suponía la desnaturalización inicial de la doble hebra de ADN. Los siguientes 35 ciclos son en los que se realizaba la amplificación del ADN. El primer paso a 98°C es en el que la doble hebra se desnaturalizaba, en el segundo a 56°C se producía el alineamiento entre los cebadores y las hebras simples y, por último, el paso a 72°C es en el que actuaba la DNA polimerasa amplificando la cadena. El último paso a 72°C se usaba como amplificación final.

Tabla 3. Protocolo para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración
1	98	5'
35	98	20"
	56	30"
	72	40"
1	72	7'

Tras cada reacción, se realizó una comprobación del tamaño del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (0,005% v/v).

3.2.3. Obtención de los plásmidos parte diseñados

Las piezas necesarias no se encontraron en el kit comercial MoClo-YTK de Addgene, que solo contenía varias opciones para cada tipo de pieza, y por eso diseñamos las nuestras propias. La obtención de estos plásmidos se consiguió mediante una reacción combinada de restricción-ligación con la enzima *BsmBI* y la ligasa T4, usando un plásmido de entrada al que añadir el fragmento de interés. El plásmido de entrada fue proporcionado por el kit de Addgene nombrado anteriormente.

- 0,5 μ L producto PCR
- 0,5 μ L pYTK001 (plásmido entrada)
- 10X T4 DNA *Ligase Buffer*
- 0,5 Weiss U T4 DNA *Ligase*
- 5 U enzima de restricción (*BsmBI*)
- H₂O hasta volumen final

En este caso la mezcla se preparó llegando a un volumen final de 10 μ L. Una vez preparada esta mezcla se siguió el protocolo mostrado en la Tabla 4 en un termociclador. Durante los primeros cincuenta ciclos, se llevó a cabo la acción tanto de la endonucleasa como de la ligasa. Los primeros 2 minutos a 42°C la endonucleasa

produjo el corte del vector de entrada, dejándolo disponible para la inserción de producto de amplificación. Los siguientes 5 minutos a 16°C permitieron que la ligasa uniera el inserto al vector de entrada, obteniéndose así un plásmido parte. En nuestro caso, los últimos 2 ciclos de digestión final e inactivación no se realizaron.

Tabla 4. Protocolo para la restricción y posterior ligación de los plásmidos parte.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
50	42	2
	16	5
1	60	10
1	80	10

3.2.4. Transformación de *E. coli*

El protocolo usado para realizar la transformación de las *E. coli* competentes se basó en un choque térmico. Para ello, se añadieron 10 µL del producto de restricción-ligación a un volumen de 50 µL de células competentes *E. coli* de la cepa DH5α, dejándose en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó el choque térmico a 42°C durante 1 minuto, dejando después las células de nuevo en hielo durante 1 minuto más. Tras este paso, se añadieron 600 µL de medio LB líquido a las muestras y se dejaron incubar a 37° durante entre 45 minutos y 1 hora. Para terminar la transformación de las células, estas se sembraron en placas de medio LB sólido con el correspondiente antibiótico de selección (cloranfenicol, ampicilina o kanamicina). Estas placas se dejaron incubando a 37° durante 24 horas.

3.2.5. Extracción de plásmidos en *E. coli*

Una vez seleccionadas las colonias tras la transformación, estas se crecieron en medio LB líquido con el correspondiente antibiótico de selección durante 24 horas a 37°C. Seguidamente, se pasó a la extracción de los plásmidos basada en el método de lisis alcalina con una posterior purificación en columna. Para ello se usó el kit de extracción NZYminiprep® (NZYtech), siguiendo el protocolo que indica el fabricante.

3.2.6. Digestión comprobación

Tras la extracción y purificación de los plásmidos clonados en *E. coli*, se realizó una digestión mediante diferentes enzimas de restricción con la intención de asegurar el correcto ensamblaje de los plásmidos, tanto los parte como los binarios.

- 2 µL plásmido (150-200 ng aproximadamente)
- 1 U enzima restricción
- 1 X *Buffer*
- Completar hasta volumen final con H₂O

Para ello usamos un volumen final de 10 µL. La mezcla de digestión se dejó incubar durante 2 horas a 37°C para asegurar una actividad óptima de la enzima. Posteriormente se añadió tampón de carga LB 6X (40% sacarosa, 0,25% azul de bromofenol y 0,1 M EDTA) a cada muestra y se analizó la muestra en un gel de agarosa 0,8% con bromuro de etidio (0,005% v/v). La electroforesis se realizó a 50 V en tampón de electroforesis [10% TBE 5X (v/v)(0,45 M Tris base, 0,45 M ácido bórico

y 10 mM EDTA, ajustado a pH 8)]. El resultado finalmente se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Para determinar el tamaño de los fragmentos se usó el marcador de peso molecular *MassRuler DNA Ladder Mix* (Thermo scientific).

3.2.7. Obtención de los plásmidos binarios

Existen dos tipos de plásmidos binarios, por un lado, tenemos los receptores y por otro los finales. La obtención de ambos tipos se realizó siguiendo la misma reacción combinada de restricción-ligación mediante la enzima *BsaI*. El corte con *BsaI* permitió que cada una de las partes que se encontraba en un plásmido parte quedara libre para poder unirse con el resto de las partes en el orden adecuado y así formar el plásmido binario. En el caso de un plásmido binario receptor, la reacción se realizó con 6 plásmidos parte, siendo uno de ellos un *GFPdrop* que ocupó el lugar de la unidad transcripcional. En cuanto a los plásmidos binarios finales, para la reacción tan solo se necesitaron un plásmido binario receptor y los plásmidos parte que contuvieran las piezas del tipo 2, 3 y 4 (o cualquiera de sus sub-partes) para sustituir la unidad transcripcional *GFPdrop* por la que se deseaba estudiar. Para ello se siguió el siguiente protocolo para formar cada uno de los plásmidos binario:

- 20 fmol de cada plásmido
- 10X T4 *DNA Ligase Buffer*
- 0,5 Weiss U T4 *DNA Ligase*
- 5 U enzima de restricción (*BsaI*)
- H₂O hasta volumen final

Usamos un volumen final de 10 µL. Tras la preparación de la mezcla, se siguió el protocolo de la Tabla 5 en un termociclador.

Tabla 5. Protocolo para la restricción y posterior ligación de los plásmidos binarios.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
25	42	2
	16	5
1	60	10
1	80	10

En los primeros 25 ciclos se llevó a cabo la restricción y posterior ligación de los plásmidos. El primer paso de 2 minutos a 42°C es en el que la enzima de restricción llevó a cabo el corte de los distintos plásmidos (parte o binario receptor), liberando las partes de interés. Seguidamente, los 5 minutos a 16°C permitieron que la ligasa uniera las distintas partes para bien obtener un plásmido binario receptor o uno final. En este caso no se realizaron los dos últimos ciclos correspondientes a la digestión final y posterior inactivación.

3.2.8. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Para realizar los ensayos Split-Ubiquitina se realizaron dobles transformaciones, con distintas combinaciones de plásmidos binarios de KAT1, KAT2 y BAG4. La transformación se basó en una simplificación del método LiAc/SS-DNA/PEG, que consistió en lo siguiente. Para cada transformación se preparó una mezcla con 1-2 µg de cada plásmido binario, ssDNA (*salmon-sperm DNA*) al 0,1% (m/v) para incrementar

la eficacia de la transformación y H₂O estéril hasta completar el volumen total (se recomiendan 50 µL). Una vez preparada la mezcla se añadió a cada muestra una cantidad suficiente de la cepa THY.AP4 fresca y se completó con 500 µL de solución PLATE (40% PEG 4000, 100 mM Acetato de Litio, 10 mM Tris a pH 7,5 y 0,4 mM EDTA).

Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante la noche y, posteriormente, a 42°C durante 15 minutos, produciendo así un choque térmico en la célula. Seguidamente se recuperaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en H₂O estéril. Entonces se sembraron en placas con medio selectivo, es decir, medio mínimo suplementado con los aminoácidos necesarios para la selección. En este caso, dado que los plásmidos binarios usados contenían los marcadores de selección de *URA3* y *LEU2*, los aminoácidos a añadir para la transformación fueron His, Ade y Trp. De esta forma, las placas de transformación fueron SD+His+Ade+Trp. En ocasiones se complementaron también con X-gal.

3.3. Ensayos de crecimiento en medio sólido

Para poder realizar este ensayo primero debieron prepararse pre-cultivos de las células de levadura THY.AP4 co-transformadas con la combinación de plásmidos de interés. Con la intención de obtener un cultivo saturado, se incubaron dichas células en 1mL de medio selectivo a 28°C durante la noche. Una vez se logró el cultivo saturado, se realizaron tres diluciones seriadas en agua estéril (1:10, 1:100 y 1:1000) para cada co-transformación en una placa de 96 pocillos. Una gota de cada una de las diluciones de cada muestra se sembró mediante un replicador de 48 pocillos en placas de medio sólido selectivo, que se incubaron a 28°C entre 3 y 4 días.

El ensayo se realizó con distintas combinaciones de los plásmidos binarios de KAT1-Cub y de BAG4-Nub (y sus diferentes dominios) para así poder conocer los dominios implicados en la interacción entre las proteínas. Como control positivo de la interacción se co-transformaron los plásmidos KAT1 y BAG4 del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004). Como control negativo se co-transforma el plásmido KAT1-Cub con un plásmido que contenía solo el fragmento Nub (plásmido de la colección del laboratorio). El medio selectivo usado consistió en medio SD suplementado con diferentes aminoácidos y bases nucleotídicas: adenina (A), histidina (H) y triptófano (W). Adenina e histidina por ser los reporteros de la expresión y triptófano por la auxotrofia que presenta la cepa. Además, se pudo suplementar a su vez con X-gal, para comprobar la actividad β-galactosidasa, regulada por el promotor LexA. Dado que los plásmidos binarios contenían los marcadores de selección de *URA3* y *LEU2*, estos no se suplementaron. Por tanto, los distintos medios selectivos usados fueron SD+W+A+H, SD+W+A, SD+W+H y SD+W. Además, como control negativo también se crecieron las células en medio SD sin suplementar.

3.4. Inmunodetección de proteínas

3.4.1. Extracción total de proteínas

Con la intención de obtener muestras proteicas de las diferentes levaduras co-transformadas, se realizaron extracciones totales de proteínas siguiendo un protocolo de extracción basado en el uso de ácido tricloroacético (TCA). En un primer paso se inocularon 5 mL de medio de cultivo líquido, dejándolo crecer por la noche a 28°C, hasta alcanzar una densidad óptica de cultivo (OD_{600}) de entre 0,5 y 0,8. Una vez llegado ese punto, se añadieron 90 μ L de TCA (100% m/v) a 1,5 mL del cultivo crecido, para después dejarlo en hielo al menos durante 5 minutos.

A partir de ese momento, todos los pasos se realizaron en hielo para evitar posibles daños a la muestra. Tras la adición del TCA, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad, manteniendo la temperatura a 4°C. Posteriormente se desechó el medio residual y se añadieron 0,5 mL de acetona fría, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones pero esta vez solo durante 2 minutos. Una vez terminó, se desechó el sobrenadante y se realizó un nuevo lavado con 0,5 mL de acetona fría. Tras una centrifugación rápida de 10 segundos para eliminar toda la acetona, las muestras se secaron completamente y se les añadieron 100 μ L de tampón de urea (6 M urea, 1% SDS y 25 mM Tris pH 6,8) y 200 μ L de bolas de vidrio. Entonces las células se lisaron durante 5 minutos en un agitador, se calentaron hasta 65°C durante otros 5 minutos y finalmente se centrifugaron otros 5 minutos a máxima velocidad. Finalmente, se añadieron 100 μ L de tampón de muestra SDS 2,5X (3,8 % SDS, 15% sacarosa, 0,125 mg/mL azul de bromofenol, 0,15 M Tris/HCl pH 6,8, 0,05 M ditioeritriol y 5 mM EDTA) y se hizo una última centrifugación durante 1 minuto. De esta centrifugación se recuperó el sobrenadante, donde se encontraban las proteínas.

3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Quince μ L de las muestras proteicas obtenidas se separaron en un gel de poliacrilamida al 8%. En este gel se diferencian dos regiones: el gel *resolving*, en la parte inferior, y el gel *stacking*, en la parte superior. Así pues, para obtener el gel se usaron 7,5 mL de gel *resolving* [4,5 mL de tampón *resolving* (0,2% SDS, 0,75 M Tris/HCl, y ajustado con HCl a pH 8,8), 1,8 mL H₂O, 1,8 mL de acrilamida/bisacrilamida, 0,9 mL glicerol, 60 μ L persulfato amónico (APS) y 6 μ L tetrametilendiamina (TEMED)] y, antes de que este polimerizara, se completó el volumen con el gel *stacking* [1,8 mL de tampón *stacking* (0,2% SDS, 0,25 M Tris/HCl, y ajustado con HCl a pH 6,8), 1,5 mL H₂O, 0,3 mL acrilamida/bisacrilamida, 30 μ L APS y 3 μ L TEMED].

El hecho de que el gel tuviera dos fases diferenciales hizo que durante la electroforesis se le aplicase primero un voltaje de 70V para, una vez las muestras hubieran superado la interfase, aumentarlo hasta 120V. Todo esto en una cubeta con tampón de electroforesis (0,1 % SDS (v/v) y 14,4 g/L glicina).

3.4.3. Electrotransferencia (Western Blot)

Una vez separadas las proteínas mediante la electroforesis, estas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (0,45 μ m). Para ello

se realizó una electrotransferencia a 120V durante 1,5-2 hora en tampón TOWBIN (0,01% SDS, 20% etanol, 0,19 M glicina y ajustado con Tris a pH 8,3) a una temperatura de 4°C. La transferencia termina una vez se alcancen los 280-300 mA.

3.4.4. Tinción de membrana

Para comprobar la correcta extracción y transferencia de las proteínas a la membrana, esta se tiñó durante 2 minutos en agitación con solución Direct Blue (Aldrich Chemistry). Para retirar el exceso de tinte y lograr una intensidad de tinción correcta se realizaron lavados con solución de lavado (40% etanol absoluto (v/v) y 10% ácido acético glacial (v/v)). Una vez escaneadas las membranas, estas se destiñeron al ser incubadas durante 20 minutos en agitación con una solución de destiño (1 M NaHCO₃ y 50 % etanol absoluto (v/v)).

3.4.5. Inmunodetección

Para eliminar cualquier resto de la solución de tinción de la membrana, esta se lavó varias veces con tampón TBS-T (0,1% Tween 20 (v/v), 150 mM NaCl y 20 mM Tris pH7,6). Con la intención de bloquear cualquier posible sitio de unión no específico del antígeno, tras los lavados se incubó la membrana en tampón de bloqueo (2% leche en polvo (m/v) y TBS-T) durante 30 minutos en agitación.

Una vez realizado el bloqueo la membrana se incubó en 10 mL del tampón de bloqueo con el anticuerpo primario (dilución necesaria en la Tabla 6) a 4°C durante la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron con 10 mL de TBS-T a T^a ambiente entre 4 y 5 veces, durando 10 minutos cada lavado y cambiando en tampón TBS-T cada vez. De esta forma se eliminó cualquier rastro de anticuerpo primario no unido. Entonces las membranas se incubaron en 10 mL del tampón de bloqueo con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (dilución necesaria en la Tabla 6) durante al menos una hora a T^o ambiente y en agitación. Después de esta incubación se volvieron a realizar varios lavados a la membrana con la solución TBS-T, con la misma intención que anteriormente.

Tabla 6. Anticuerpos usados para la detección de las proteínas KAT1, KAT2, BAG4 y sus variaciones. El anticuerpo α -HA de ratón se une al epítipo HA fusionado a las distintas proteínas “prey” (proteínas BAG4) y es detectado, a su vez, por el anticuerpo secundario α -mouse. Por otro lado, el anticuerpo α -LexA de conejo se une al dominio LexA presente en las proteínas de fusión “bait” (proteínas KAT1 y KAT2), siendo detectado por el anticuerpo secundario α -rabbit.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
α -HA	1:5000	α -mouse	1:5000
α -LexA	1:10000	α -rabbit	1:5000

Finalmente, para detectar aquellas proteínas unidas a los anticuerpos se usó el sistema de revelado quimioluminiscente ECL Western Blotting Detection Reagent Kit (GE Healthcare Life Sciences). La membrana se incubó 5 minutos con los reactivos de detección, siendo posteriormente detectada la señal quimioluminiscente emitida con las películas Fuji Medical X-Ray Films (Fujifilm).

4. Resultados

4.1. Diseño y obtención de los plásmidos específicos de Split Ubiquitina

Se llevó a cabo el diseño de tres plásmidos parte con la intención de poder usarlos para realizar un ensayo Split Ubiquitina. Por ello contienen un promotor, la región N terminal y la región C terminal de la ubiquitina, junto con el factor de transcripción (Cub). Cada plásmido parte, además de su correspondiente pieza, contiene un marcador de selección en *E. coli*, que consiste en la resistencia al antibiótico cloranfenicol (Tabla 7).

Tabla 7. Estructura de los plásmidos parte diseñados pP2_pMET25, pP3a_3XHA-Nub y pP4a_Cub. El plásmido pP2_pMET25 contiene una parte 2 que corresponde al promotor MET25, pP3a_3XHA-Nub contiene una subparte 3a que corresponde a la región Nub junto con un tag de tres epítomos de la hemaglutinina y pP4a_Cub contiene una subparte 4a que corresponde a la región Cub.

Nombre de la construcción	1	2	3a	3b	4a	4b	5	6	7	8a	8b
pP2_pMET25		pMET25									CamR-ColE1
pP3a_3XHA-Nub			Nub_3XHA								CamR-ColE1
pP4a_Cub					Cub						CamR-ColE1

Por tanto, se pueden considerar estos plásmidos como específicos del ensayo Split-Ubiquitina, ya que contienen las piezas clave para poderlo realizar. Estas piezas posteriormente unidas a otros plásmidos parte diseñados permitirían obtener las proteínas de fusión listas para realizar el estudio de interacción. Tal y como se explica en el apartado 3.2.1, pP2_pMET25 y pP3a_Nub-3XHA se recibieron ya sintetizados, pero para el fragmento Cub fue necesario realizar una amplificación por PCR en la que se esperaba un fragmento de 1483 pb. Para comprobar su correcta obtención, se realizaron digestiones tanto del plásmido de entrada (pYTK001) como de los plásmidos parte pP2_pMET25, pP3a_Nub-3XHA y pP4a_Cub. Las enzimas usadas para realizar estas digestiones de comprobación así como los fragmentos esperados para cada una de las construcciones se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las diferentes piezas específicas de Split-Ubiquitina.

Plásmidos	Enzima restricción	Resultado digestión
pYTK001	PvuII	983 pb + 1693 pb
pP2_MET25	EcoRV	399 pb + 1649 pb
pP3a_3XHA-Nub	EcoRV + PvuII	552 pb + 1356 pb
pP4a_Cub	EcoRV	611 pb + 2492 pb

Como se puede observar en la Figura 8, los fragmentos obtenidos fueron los esperados, por lo que los plásmidos parte se obtuvieron correctamente.

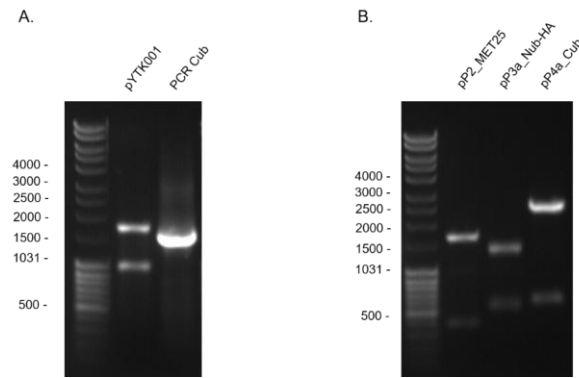


Figura 8. Electroforesis de la digestión de los plásmidos parte específicos de Split-Ubiquitina. (A) Digestión del plásmido receptor pYTK001 mediante *PvuII* y producto de la PCR de la secuencia Cub. (B) Digestión de los plásmidos parte pP2_pMET25 (*EcoRV*), pP3a_Nub-HA (*EcoRV* y *PvuII*) y pP4a_Cub (*EcoRV*). Fragmentos esperados en la Tabla 8. Carril 1 de cada gel: Marcador de peso molecular (pb).

4.2. Plásmidos binarios receptores

Se diseñaron dos plásmidos: YCp_GFPdrop_URA3_KanR y YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR (Tabla 9). Estos solo se diferencian en la parte 6 (marcador *URA3* o *LEU2*) y en la parte 8 (resistencia a kanamicina o ampicilina). Un detalle que destacar es el *GFPdrop*, que está constituido por las partes 2-3-4. Es esta pieza la que permite que estos plásmidos se puedan usar como base, ya que con la sustitución del *GFPdrop* por el promotor, CDS y terminador de interés se consigue el plásmido concreto deseado para su expresión.

Tabla 9. Estructura de los plásmidos binarios receptores YCp_GFPdrop_URA3_KanR y YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR. Al tratarse de plásmidos binarios receptores, en lugar de piezas 2, 3 y 4, contienen una pieza *GFPdrop*. Los plásmidos se diferencian tan solo en las piezas correspondientes a sus partes 6 y 8.

Nombre de la construcción	1	2	3a	3b	4a	4b	5	6	7	8a	8b
YCp_GFPdrop_URA3_KanR	ConLS	GFPdrop				ConRE	URA3	CEN/ARS	KanR-ColE1		
YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR	ConLS	GFPdrop				ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1		

Cada una de las partes pre-diseñadas se puede encontrar en el kit de Addgene: MoClo-YTK, en forma de plásmidos parte. En un primer paso se rescataron estos plásmidos parte del kit comercial, se cultivaron en *E. coli* y luego fueron extraídos tal y como se indica en 3.2.5. Para comprobar que realmente estos eran los plásmidos deseados, se llevó a cabo una digestión. Las enzimas usadas para ello así como los fragmentos esperados se pueden encontrar en la Tabla 10.

Tabla 10. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios receptores y de estos mismos.

Plásmidos	Enzima restricción	Resultado digestión
pYTK002	EcoRV	1856 pb
pYTK047	EcoRV	2684 pb
pYTK072	EcoRV	1835 pb
pYTK074	EcoRV	809 pb + 1916 pb
pYTK075	EcoRV	635 pb + 2984 pb
pYTK081	EcoRV	2174 pb
pYTK083	NotI	931 pb + 1858 pb
pYTK084	NotI	931 pb + 1763 pb
YCp_GFPdrop_URA3_KanR	NotI	1763 pb + 3005 pb
YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR	NotI	1858 pb + 3842 pb

El resultado fue el esperado para todos los plásmidos puesto que, tal y como se observa en la Figura 9, los tamaños son los que se esperaban, por lo que la extracción de plásmidos había sido un éxito.

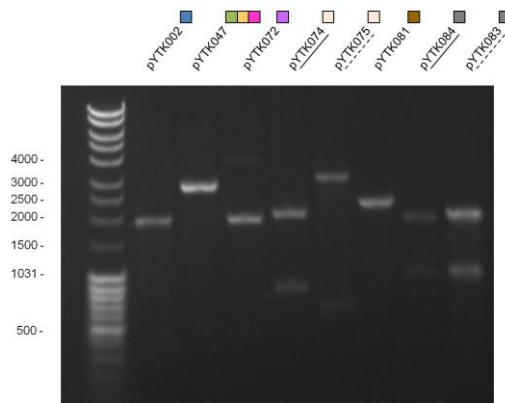


Figura 9. Electroforesis de la digestión de los plásmidos parte que forman los plásmidos binarios receptores. Cada uno de los colores indica qué tipo de pieza contiene ese plásmido, en base a la Tabla 1. Las enzimas utilizadas para la digestión de cada plásmido se encuentran en la Tabla 10. Carril 1: Marcador molecular (pb).
Partes del plásmido YCp_GFPdrop_URA3_KanR → _____
Partes del plásmido YCp_GFPdrop_LEU2_AmpR → - - - - -

Tras la restricción-ligación se llevó a cabo una digestión de ambos plásmidos con la enzima *NotI*. Este paso se realizó con la intención de comprobar que el ensamblaje de ambos plásmidos se había llevado a cabo de forma correcta y se habían obtenido los plásmidos esperados (Figura 10B) y no artefactos no deseados.

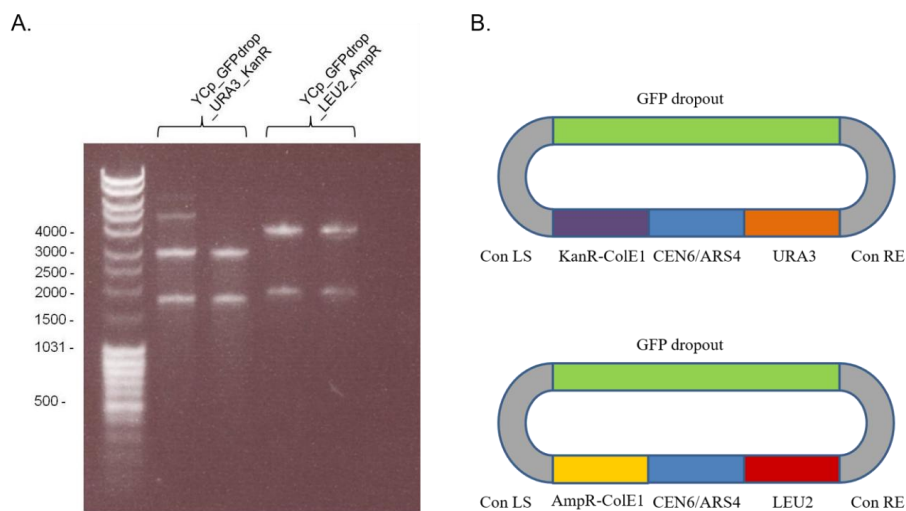


Figura 10. Obtención de los plásmidos binarios receptores. (A). Electroforesis de la digestión de los plásmidos binarios receptores YCp_GFPdro_URA3_KanR y YCp_GFPdro_LEU_AmpR. Las enzimas usadas se encuentran en la Tabla 10. Carril 1: Marcador molecular (pb). (B). Representación de los plásmidos obtenidos

Como se puede ver en la Figura 10A, se obtuvieron correctamente ambos plásmidos. En el carril dos, correspondiente al plásmido YCp_GFPdrop_URA3_KanR se observa una tercera banda que parece corresponderse con el plásmido sin digerir.

4.3. Diseño y obtención plásmidos quimera KAT1-KAT2

De la misma forma que se diseñaron los plásmidos parte específicos del ensayo Split Ubiquitina, se diseñaron los plásmidos parte para el estudio de la interacción entre KAT1/KAT2. En primer lugar, se encuentran los plásmidos con fragmentos de los genes KAT1 y KAT2. Por una parte, se diseñan plásmidos que contienen los genes completos, tanto KAT1 como KAT2. Estos contienen la CDS completa y, por tanto, son partes 3 completas. Por otro lado, hay distintos plásmidos cada uno con una región de la CDS ya sea del gen KAT1 o del KAT2 que permiten la formación de las quimeras. En función de si el fragmento codifica la región N terminal o C terminal de la proteína se considera parte 3a o 3b respectivamente. Para obtener tres quimeras diferentes se diseñan 6 plásmidos parte distintos (Tabla 11).

Tabla 11. Estructura de los plásmidos correspondientes a KAT1, KAT2 y los fragmentos para formar quimeras. La numeración que aparece se refiere al aminoácido donde empieza y acaba la traducción de dicha secuencia. pP3_KAT1 y pP3_KAT2 hacen referencia a los plásmidos parte con los genes completos.

Nombre de la construcción	1	2	3a	3b	4a	4b	5	6	7	8a	8b
pP3_KAT1			KAT1								CamR-ColE1
pP3_KAT2			KAT2								CamR-ColE1
pP3a_KAT1leader_1-63			KAT1(1-63)								CamR-ColE1
pP3b_KAT2_64-697				KAT2 (64-697)							CamR-ColE1
pP3a_KAT1_1-299			KAT1(1-299)								CamR-ColE1
pP3b_KAT2_300-697				KAT2 (300-697)							CamR-ColE1
pP3a_KAT2_1-299			KAT2(1-299)								CamR-ColE1
pP3b_KAT1_300-677				KAT1 (300-677)							CamR-ColE1
YcP_KAT1-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT1		Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	
YcP_KAT2-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT2		Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	
YcP_KAT1leader-KAT2-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT1(1-63)	KAT2 (64-697)	Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	
YcP_KAT1-KAT2-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT1(1-299)	KAT2 (300-697)	Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	
YcP_KAT2-KAT1-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT2(1-299)	KAT1 (300-677)	Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	
YcP_KAT1-KAT1-Cub_LEU2	ConLS	pMET25	KAT1(1-299)	KAT1 (300-677)	Cub	tTDH1	ConRE	LEU2	CEN/ARS	AmpR-ColE1	

Se pretende obtener quimeras distintas entre ellas, cada una con unas regiones diferentes de las proteínas KAT1 y KAT2. Esto viene del hecho de que KAT2 no parece interactuar con BAG4 en levaduras, por lo que mediante su uso se lograrán canales de potasio capaces de integrarse en la membrana pero que solo interactuarán con BAG4 si contienen la región de KAT1 implicada en esta interacción. Para decidir las regiones que tendría cada una de ellas, se compararon ambas proteínas tanto a nivel de secuencia como de estructura secundaria. Ambos genes tienen alta homología en sus regiones transmembranales, siendo más divergentes en las regiones N y, especialmente, C terminal que quedan en la región citosólica donde la proteína KAT2 tiene mayor número de aminoácidos. Teniendo en cuenta estas características se diseñaron tres quimeras (Figura 11).

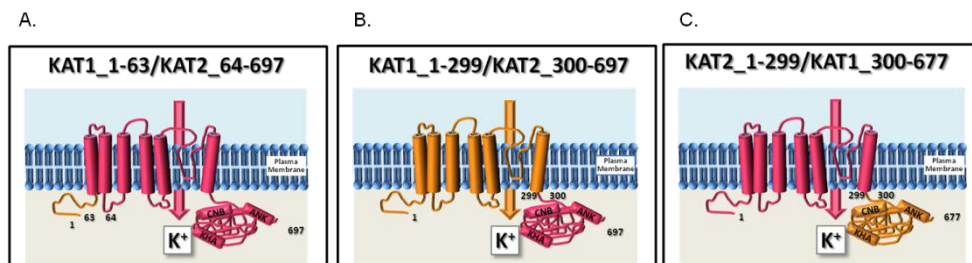


Figura 11. Representación esquemática de las quimeras de KAT1 y KAT2, haciendo la numeración referencia al número de aminoácidos. (A) Quimera KAT1 líder-KAT2. La región del aminoácido 1 al 63, correspondiente a la región N terminal citosólica y el resto correspondiente a las regiones transmembranales y C terminal. (B) Quimera KAT1-KAT2. Los primeros 299 aminoácidos se corresponden con la zona N terminal y la región transmembranales, el resto abarca la región C terminal citosólica. (C) Quimera KAT2-KAT1. Inversa de la quimera KAT1-KAT2.

En el diseño de estas quimeras se hicieron servir distintas predicciones de la topología y estructura tanto de KAT1 y KAT2 obtenidas de diferentes fuentes como *iTasser* o *Phyre*. Estas apuntaban a una clara región N-terminal citosólico en ambas proteínas de 63 aminoácidos de longitud, por lo que se tomó como referencia para la obtención de los fragmentos KAT1líder (1-63) y KAT2 (64-697) (Figura 11A). Las diferentes predicciones apuntaban a que los dominios transmembrana terminan alrededor del aminoácido 300 en ambas proteínas, así que se tomó este punto como corte para las otras dos quimeras. De esta forma, una de ellas contendría la región N terminal y transmembrana de KAT1 mientras que la otra contendría la región citosólica C-terminal del canal (Figura 11B y C).

Con estas tres quimeras se pretende determinar si la zona de interacción con BAG4 se encuentra en la región citoplasmática donde ya aparecen otros dominios de interacción como CNBD o en la región N terminal. Para poder ajustar más la zona de interacción en el caso de que esta ocurriera en la zona N-terminal, se diseñó la quimera KAT1líder-KAT2, ya que permitiría establecer si dentro de esta zona N-terminal, la implicada es la zona transmembrana o la zona citosólica. Entonces se diseñaron los cebadores indicados para obtener los distintos fragmentos (Tabla 2A) y se amplificaron mediante PCR (Figura 12A).

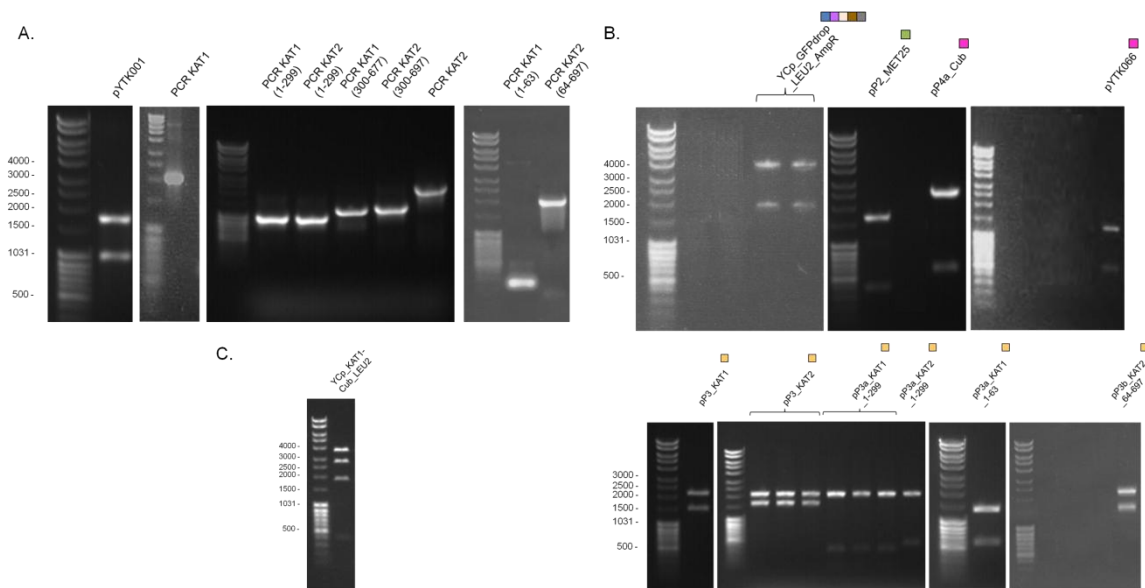


Figura 12. Obtención de las construcciones quiméricas KAT1-KAT2. (A) Digestión del plásmido de entrada pYTK001 y producto de PCR de las distintas secuencias KAT1/KAT2 a insertar. (B) Digestión de los distintos plásmidos parte necesarios para la obtención de los plásmidos binarios finales así como del plásmido binario receptor en el que se introducen. Cada plásmido binario final contendrá las piezas de la parte superior (plásmido binario receptor, promotor *pMET25*, terminador *tTDH1* y el fragmento Cub) y una pieza 3 o dos subpiezas (a+b) de la parte inferior, correspondientes a las secuencias KAT1 o KAT2. (C) Digestión del plásmido binario final YCp_KAT1-Cub_LEU2. Carril 1 de cada gel: Marcador de peso molecular (pb). Las enzimas utilizadas se encuentran en las Tablas 10 y 12.

Una vez amplificados los fragmentos, mediante una restricción-ligación con *BsmBI* se obtuvieron los plásmidos parte (Figura 12B). Posteriormente, para lograr los plásmidos binarios finales era necesaria una nueva restricción-ligación, esta vez con *BsaI* y con cada una de las piezas necesarias. Para los binarios KAT1-KAT2 se usaron el binario receptor YCp_GFPdrop_LEU2, el promotor *pMET25*, el terminador *tTDH1*, el

fragmento Cub-VP16 y una de las piezas 3 o dos de las subpiezas 3a y b. Mediante este proceso logramos obtener el plásmido YCp_KAT1-Cub_LEU2 (Figura 12C). Para comprobar la correcta obtención de cada uno de estos plásmidos se realizaron digestiones con las enzimas indicadas en la Tabla 12 para las piezas específicas KAT1-KAT2 y en la Tabla 10 para las piezas Split-Ubiquitina y los binarios receptores. Tal y como se puede ver en la Figura 12, se pudieron conseguir todos los plásmidos parte a excepción de pP3b_KAT1_300-677 y pP3b_KAT2_300-697. También se pudo obtener el plásmido binario final YCp_KAT1-Cub_LEU2, a falta de conseguir las piezas para obtener los plásmidos binarios quimeras.

Tabla 12. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios quimera KAT1/KAT2 y de estos mismos.

Plásmidos	Enzima restricción	Resultado digestión
pP3_KAT1	EcoRV	103 pb + 1482 pb + 2111 pb
pP3_KAT1_1-299	EcoRV	103 pb + 348 pb + 2111 pb
pP3_KAT2	EcoRV	1645 pb + 2111 pb
pP3_KAT2_1-299	EcoRV	451 pb + 2111 pb
pP3_KAT2_64-697	EcoRV	1645 pb + 1925 pb
pP3a_KAT1leader	EcoRV + Pvull	552 pb + 1302 pb
pYTK066	EcoRV + Pvull	552 pb + 1338 pb
YCp_KAT1-Cub_LEU2_AmpR	NotI	396 pb + 1858 pb + 2798 pb + 3070 pb

4.4. Diseño y obtención plásmidos BAG4

En segundo lugar, tenemos el diseño de plásmidos del gen BAG4 y sus modificaciones (Tabla 13). El interés mayoritario en este gen radica en su dominio BAG, ya que se ha visto que este interactúa con la HSP70. Además del interés en caracterizar la interacción de este gen con el canal KAT1, se quería ver cómo afecta la interacción de BAG4 con HSP70 a la interacción con KAT1. Por tanto, se diseñaron distintos plásmidos cuya diferencia principal se basaba en la presencia, ausencia o inactividad de este dominio.

Tabla 13. Estructura de los plásmidos correspondientes a BAG4 y sus distintas modificaciones. pP3b_BAG4 es el plásmido parte con el gen completo, pP3b_BAG4_HSP70pm tiene mutaciones puntuales que inactivan el BD, pP3b_BAG4ΔBAGdomain es el gen BAG4 sin el BD y, por último, pP3b_BAGdomain es solamente el BD.

Construct Name	1	2	3a	3b	4a	4b	5	6	7	8a	8b
pP3b_BAG4				BAG4							CamR-ColE1
pP3b_BAG4 Hsp70 pm				BAG4 Hsp70 pm							CamR-ColE1
pP3b_BAG4ΔBD				BAG4ΔBD							CamR-ColE1
pP3b_BD				BD							CamR-ColE1
YCp_Nub-BAG4_URA3	ConLS	pTDH3	Nub_3XHA	BAG4	tTDH1		ConRE	URA3	CEN/ARS		KanR-ColE1
YCp_Nub-BAG4pm_URA3	ConLS	pTDH3	Nub_3XHA	BAG4 Hsp70 pm	tTDH1		ConRE	URA3	CEN/ARS		KanR-ColE1
YCp_Nub-BAG4ΔBD_URA3	ConLS	pTDH3	Nub_3XHA	BAG4ΔBD	tTDH1		ConRE	URA3	CEN/ARS		KanR-ColE1
YCp_Nub-BD_URA3	ConLS	pTDH3	Nub_3XHA	BD	tTDH1		ConRE	URA3	CEN/ARS		KanR-ColE1

Como bien se ha indicado ya, los distintos plásmidos presentaban regiones diferentes de la proteína BAG4. De tal forma, uno de los plásmidos consistiría del gen completo de *A. thaliana*, BAG4. Para determinar si el dominio BAG está implicado en la interacción se plantearon otras tres construcciones: una de ellas contendría tan solo la región C-terminal de la proteína, con el dominio BAG, la otra estaría formada por la proteína BAG a excepción de esa zona C-terminal con el BD y la última sería un mutante con el BD inactivo. Las mutaciones usadas, capaces de inactivar el dominio BAG, fueron definidas por Doukhanina *et al.* (2006), que afirman que realizar una doble mutación en los aminoácidos 179 (ácido glutámico) y 189 (ácido aspártico) de

BD conlleva la inactivación del mismo. Así pues señalan que el ácido glutámico en posición 179 se debe sustituir por una glicina mientras que el ácido aspártico en posición 189 debe sustituirse por una serina.

Una vez planteados los distintos fragmentos, se diseñaron los cebadores necesarios para su obtención (Tabla 2A) y mediante una amplificación por PCR se lograron las distintas fracciones (Figura 13A). Estas fracciones, mediante una restricción-ligación junto al plásmido de entrada y por acción de BsmBI, llevaron a la obtención de los plásmidos parte (Figura 13B). El último paso para conseguir los plásmidos binarios finales consistió en una nueva restricción-ligación con BsaI. En esta se debían unir las piezas necesarias, que en el caso de los binarios BAG4 consistía en el plásmido binario receptor YCp_GFPdrop_URA3, el promotor *pTDH3*, el terminador *tTDH1*, la región Nub y uno de los plásmidos parte BAG4. De esta forma se consiguieron tres plásmidos binarios finales YCp_Nub-BAG4_URA3, YCp_Nub-BAG4ΔBD_URA3 y YCp_Nub-BD_URA3 (Figura 13C). Por falta de tiempo, la versión de BAG4 con las mutaciones puntuales quedó pendiente de completar.

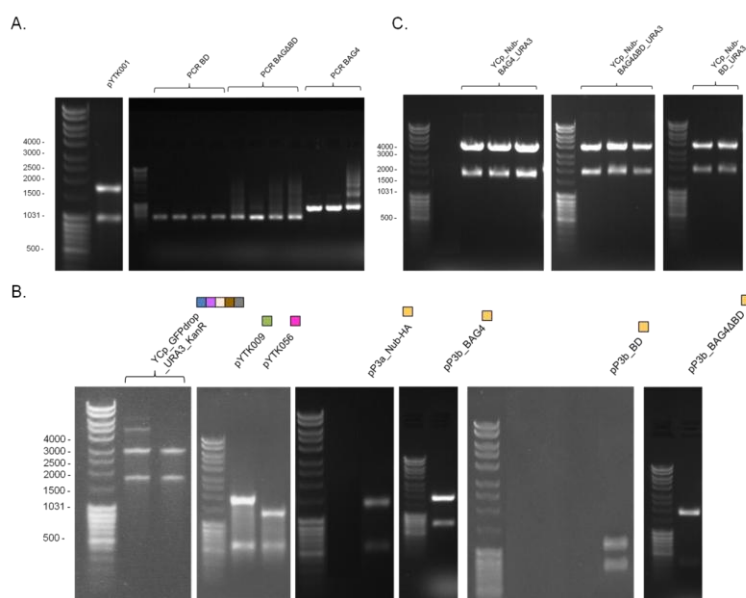


Figura 13. Obtención de las construcciones BAG4. (A) Digestión del plásmido de entrada pYTK001 y producto de PCR de las distintas secuencias derivadas de BAG4 a insertar. (B) Digestión de los distintos plásmidos parte necesarios para la obtención de los plásmidos binarios finales así como del plásmido binario receptor en el que se introducen. Cada plásmido binario final contendrá las piezas presentes en el plásmido binario receptor, el promotor *pTDH3* (pYTK009), el terminador *tTDH1* (pYTK056), el fragmento Nub y una de las subpiezas 3b de BAG4. (C) Digestión de los plásmidos binarios finales YCp_Nub-BAG4_URA3, YCp_Nub-BAG4ΔBD_URA3 y YCp_Nub-BD_URA3. Carril 1 de cada gel: Marcador de peso molecular (pb). Las enzimas usadas se encuentran en las Tablas 10 y 14.

Para asegurar la correcta obtención de cada uno de los plásmidos conseguidos, se realizaron digestiones con las enzimas indicadas en la Tabla 14 para las piezas específicas BAG4 y en la Tabla 10 para las piezas Split-Ubiquitina y los binarios receptores. Como se puede observar en la Figura 13, se consiguieron todos los plásmidos parte, a excepción del plásmido con la secuencia BAG4 mutante pP3b_BAG4Hsp70. En consecuencia, también se consiguieron todos los plásmidos binarios finales a excepción de YCp_Nub-BAG4pm_URA3.

Tabla 14. Enzimas de restricción usadas para las digestiones de comprobación de las piezas usadas para los plásmidos binarios BAG4 y de estos mismos.

Plásmidos	Enzima restricción	Resultado digestión
pP3b_BAG4	BamHI	709 pb + 1736 pb
pP3b_BAG4 Δ BD	BamHI	319 pb + 1736 pb
pP3b_BD	PstI	165 pb + 1893 pb
pYTK009	EcoRV + PvuII	552 pb + 1799 pb
pYTK056	EcoRV + PvuII	552 pb + 1347 pb
YCp_Nub-BAG4_URA3_KanR	NotI	1763 pb + 3930 pb
YCp_Nub-BD_URA3_KanR	NotI	1763 pb + 3543 pb
YCp_Nub- Δ BD_URA3_KanR	NotI	1763 pb + 3540 pb

4.5. Ensayos de crecimiento en levadura

Una vez obtenidos los plásmidos binarios finales, se pasó a comprobar si las proteínas seguían siendo capaces de interactuar y cómo lo hacían. Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento haciendo uso del sistema Split-Ubiquitina (Figura 14).

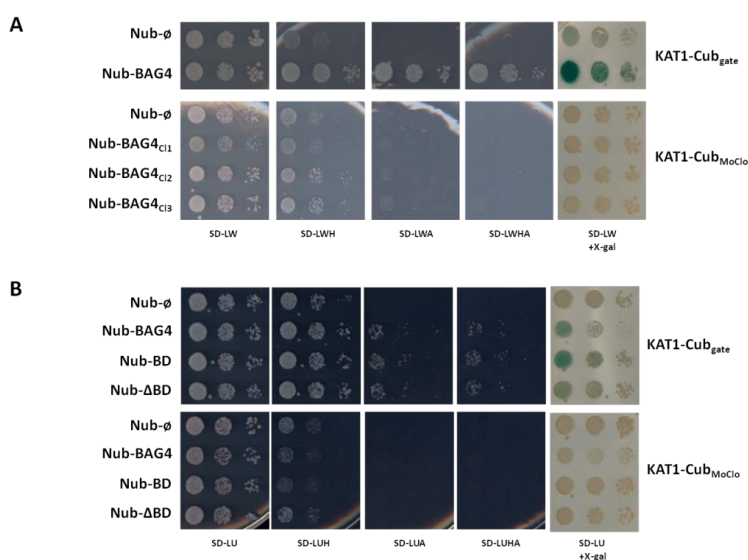


Figura 14. Ensayo de doble híbrido Split-Ubiquitina en levadura. Transformantes de cada combinación de plásmidos indicados fueron crecidos hasta saturación en medios selectivos y diluciones seriadas fueron depositadas en los medios indicados. Las imágenes se obtuvieron tras 3 días de crecimiento a 28°C. (A) En las dos primeras filas, se realizan los controles de interacción del ensayo. Para ello se usan los plásmidos KAT1-Cub_{gate} y Nub-BAG4_{gate} del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004) como control positivo y, como control negativo, se enfrenta el plásmido KAT1-Cub_{gate} con un plásmido solo con el fragmento Nub (plásmido de la colección del laboratorio Nub-ø). Abajo, se comprueba si KAT1-Cub_{MoClo} es capaz de interactuar con distintos clones de Nub-BAG4_{gate} y de nuevo el control negativo con Nub-ø. (B) Arriba, se enfrenta el plásmido del sistema original KAT1-Cub_{gate} contra los distintos Nub-BAG4_{MoClo} y contra el control negativo Nub-ø. Abajo, los mismos ensayos esta vez con KAT1-Cub_{MoClo}. En cada columna se usa un medio concreto, siendo de izquierda a derecha de menos a más selectivo y usando el X-gal como medida de la interacción.

Por una parte se pretendía comprobar si la construcción KAT1-Cub_{MoClo} (YCp_KAT1-Cub_LEU2) mantenía la capacidad de interactuar con BAG4. Para ello se enfrentó esta construcción a distintos clones de Nub-BAG4_{gate} del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004). Además, como controles positivo y negativo de interacción, se enfrentó KAT1-Cub_{gate}, por una parte, a Nub-BAG4_{gate} y por otra, a un plásmido con tan solo el fragmento Nub (Nub-ø). Así se observó que la construcción de MoClo es capaz de interactuar con el plásmido Nub-BAG4_{gate} pero de forma mucho más débil que el plásmido del sistema original (Figura 14A).

Posteriormente, se realizó un ensayo de interacción para descubrir con qué fragmento de BAG4 se produce la interacción con KAT1, así como el funcionamiento de las construcciones MoClo juntas (Figura 14B). Por ello, por una parte se enfrentaron los distintos plásmidos Nub-BAG4_{MoClo} (YCp_Nub-BAG4_URA3, YCp_Nub-BAG4ΔBD_URA3 y YCp_Nub-BD_URA3) tanto al plásmido del sistema original KAT1-Cub_{gate} como a la construcción KAT1-Cub_{MoClo}. Como control negativo se enfrentaron ambos plásmidos KAT1-Cub al vector Nub vacío (Nub-∅). De esta forma se volvió a hacer evidente el hecho de que el plásmido KAT1-Cub_{MoClo} funciona peor que la construcción original KAT1-Cub_{gate}, llegando casi a ni observarse ningún tipo de interacción con los Nub-BAG4_{MoClo}. Sin embargo, si se observó que plásmido YCp_Nub-BAG4_URA3, como era de esperar, interacciona con KAT1-Cub_{gate}, por lo que funciona correctamente. Además, parece que la interacción entre KAT1 y BAG4 ocurre principalmente en la región C-terminal, donde se encuentra el BD ya que es donde se ve un mayor crecimiento y, por tanto, una interacción más fuerte. Sin embargo, parece que también hay cierta interacción con la proteína sin el BD, por lo que puede que el dominio de ubiquitinación de la región N-terminal de BAG4 esté implicado en la interacción.

4.6. Comprobación de la expresión de las proteínas de fusión construidas

Una vez realizados los ensayos de interacción se analizó la expresión de las distintas proteínas ensayadas. Para ello, se realizó una inmunodetección siguiendo el protocolo indicado en el punto 3.4 (Figura 15). Tanto la extracción proteica como su separación y posterior transferencia a membrana se llevaron a cabo correctamente, como se puede ver gracias a la tinción *Direct Blue*.

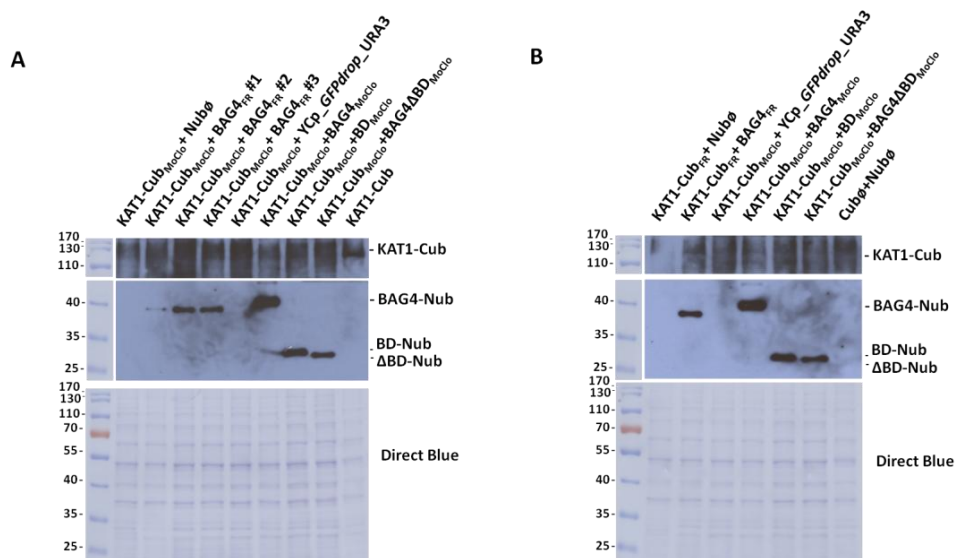


Figura 15. Inmunodetección del ensayo de crecimiento Split-Ubiquitina. (A) Inmunodetección de las muestras ensayadas en la Figura 14A. Control positivo de KAT1-Cub_{gate} en el último carril. (B) Inmunodetección de las muestras ensayadas en la Figura 14B. Control negativo en el último carril. En ambas imágenes abajo se encuentra la tinción *Direct Blue*, donde se observan la correcta extracción y transferencia proteicas. En medio, se encuentra la inmunodetección de las distintas proteínas Nub-BAG4, Nub-BD y Nub-BAG4ΔBD mediante el anticuerpo α-HA. Arriba, la inmunodetección de las proteínas KAT1-Cub_{gate} y KAT1-Cub_{MoClo} con el anticuerpo α-LexA. Los números de la izquierda muestran el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

Tal y como se observa en la Figura 15, las proteínas de MoClo Nub-BAG4, Nub-BAG4 Δ BD y Nub-BD se expresan correctamente y aparecen cerca de 40 kDa, 24 kDa y 25 kDa respectivamente. El Nub-BAG4_{gate} o Nub-BAG4_{FR}, como era de esperar, se expresa correctamente pero hay que recalcar el hecho de que la construcción Nub-BAG4 de MoClo es ligeramente más pesada, probablemente como resultado de los aminoácidos añadidos a la proteína de fusión para no perder la pauta de lectura. Respecto a las construcciones KAT1-Cub, al incubar las muestras a 65°C parece que las proteínas de membrana KAT1 se agregaron y precipitaron, por lo que no se pudieron observar las bandas específicas correspondientes a estas proteínas de fusión. Por esto el control negativo sin KAT1-Cub ni Nub-BAG4 muestra la misma señal que el resto de muestras, excepto KAT1-Cub_{gate} (KAT1-Cub_{FR}). De hecho, en la última muestra en la Figura 15A, un control no calentado, se aprecia la banda correspondiente a KAT1-Cub. Para resolver este problema, repetimos el experimento esta vez evitando este paso (Figura 16).

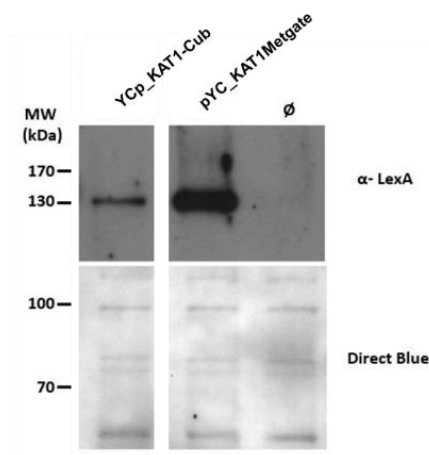


Figura 16. Inmunodetección de la construcción YCp_KAT1-Cub de MoClo. En la parte inferior se observa el resultado de la extracción proteica y la transferencia a la membrana mediante la tinción con *Direct Blue*. En la parte superior se encuentra el resultado de la inmunodetección mediante el anticuerpo de detección α -LexA, capaz de unirse a las proteínas de fusión que contengan el fragmento Cub-VP16-LexA como KAT1-Cub. Como control positivo de expresión se usa el plásmido KAT1-Cub_{gate} del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004), mientras que como control negativo se usa Nub- \emptyset .

También en este caso, se usó el plásmido KAT1-Cub_{gate} del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004) como control positivo de expresión y detección, ya que este plásmido contiene el factor de transcripción LexA, al que se une el anticuerpo de detección α -LexA. A su vez, se realizó el procedimiento con una muestra sin plásmido y, por tanto, sin expresión del factor de transcripción LexA, que no se detectaría y actuaría como control negativo en la inmunodetección.

La expresión de la proteína KAT1-Cub es correcta ya que se encontró una señal sobre los 130 kDa, que corresponde con el tamaño de la proteína de fusión. Sin embargo, el nivel de expresión de esta construcción obtenida era inferior al observado en el plásmido control KAT1-Cub_{gate}. Lo esperado hubiera sido una expresión similar, ya que ambos plásmidos deberían ser equivalentes funcionales en base a su diseño.

5. Discusión

En la regulación y control de los movimientos estomáticos, tienen una gran importancia los canales de entrada de potasio, como KAT1, presentes en la membrana de las células oclusivas. Estos garantizan la presencia del suficiente potasio intracelular, lo que se ha visto relacionado con una mayor tolerancia frente a la sequía (Zörb *et al.*, 2014). Dada la gran importancia que tiene KAT1 como uno de los principales transportadores de potasio en la célula, surge interés por estudiar los mecanismos detrás de su regulación. Siguiendo esta línea, en nuestro laboratorio se realizó un rastreo basado en un ensayo Split-Ubiquitina en levadura para encontrar proteínas capaces de interactuar con el canal de potasio KAT1 y estudiar el posible efecto regulador que esta interacción ejerciera sobre KAT1.

De esta forma se encontró que una de las proteínas capaces de interactuar con KAT1 es BAG4. En el mismo estudio se comprobó que mediante esta interacción BAG4 regula de forma indirecta el movimiento de apertura y cierre estomático y es capaz de aumentar la actividad de este canal de potasio. Por tanto, BAG4 actúa como regulador de KAT1. En concreto, nuestros datos indican que BAG4 facilita la salida del retículo endoplasmático y por tanto, se podría considerar como una chaperona para KAT1 (Locascio, Marques, *et al.*, 2019).

La proteína BAG4 pertenece a la familia *Bcl2-associated athanogene*, que se encuentra en distintos organismos como mamíferos, levaduras o, en este caso, plantas. Las funciones de esta familia de proteínas en mamíferos están relacionadas con la regulación de la muerte celular programada mediante el reclutamiento de sistemas de chaperonas como las proteínas de choque térmico o Hsp70. Todas las proteínas pertenecientes a esta familia, incluida BAG4, contienen un dominio BAG conservado que les proporciona la capacidad de reclutar con alta afinidad las Hsp70. En cambio, su función en las plantas se ha visto implicada en la resistencia a estreses bióticos y abióticos, como la sequía (Doukhanina *et al.*, 2006; Takayama y Reed, 2001).

Todo lo anterior, sumado al hecho de que BAG4 regula el canal de potasio KAT1, hace que el estudio y caracterización de esta interacción gane interés ya que podría tener grandes repercusiones en la obtención de cultivos con mayor tolerancia a la sequía. De esta forma pretendemos concretar las regiones de cada proteína que participan en la interacción y así conocer de forma más precisa cómo BAG4 regula la acción de este canal. A su vez, sería posible ver los efectos que tiene la interacción de KAT1 y BAG4 con la capacidad de la última de unirse a la Hsp70. En definitiva, tratamos de estudiar cómo esta interacción afecta a la función reguladora de BAG4. Para ello se plantea un ensayo Split-Ubiquitina en el que se combinen diferentes fracciones tanto de la proteína KAT1 como de BAG4, para ver entre cuales de ellas se produce la interacción.

Con este objetivo en mente, se adaptaron las distintas secuencias al sistema de clonación modular en levadura MoClo. Se diseñaron tres conjuntos de construcciones que se dividían en piezas específicas del sistema Split-Ubiquitina, piezas KAT1/KAT2 y piezas BAG4. La intención al diseñar las quimeras KAT1/KAT2 fue obtener canales de potasio capaces de integrarse en la membrana donde solo se encontrara una

región determinada de KAT1, siendo el resto del canal parte de KAT2, que no interacciona con BAG4 en levaduras. Así se plantearon 3 quimeras donde se aislaba la parte N o C-terminal de KAT1, para perfilar la zona de interacción. Por otra parte, para BAG4 se diferenció entre el dominio BAG y el resto de la proteína, obteniéndose así 2 fragmentos distintos. Además, se planteó un mutante cuyo dominio BAG estuviera inactivado, para así poder ver si el dominio funcional es partícipe de la interacción.

Los fragmentos se adaptaron al sistema sin gran dificultad, permitiendo obtener plásmidos capaces de actuar como unidades transcripcionales completas y capaces de ser usados en el ensayo Split-Ubiquitina. El hecho de obtener un alto número de proteínas de fusión y proteínas quiméricas, si se hiciese usando métodos de clonación tradicionales en levadura, implicaría un alto consumo de tiempo. Sin embargo, el sistema MoClo, jerarquizado y estructurado en piezas, soluciona este problema y permite, si todas las construcciones se obtienen en un primer intento, obtener plásmidos binarios finales en apenas unas dos semanas.

Mediante los ensayos Split-Ubiquitina en levadura (Figura 14) se pudo confirmar que la construcción YCp_KAT1-Cub_LEU2 obtenida mediante el sistema MoClo mantiene la capacidad de interactuar con el plásmido Nub-BAG4_{gate} del sistema original de Split-Ubiquitina (Obrdlik *et al.*, 2004). Sin embargo, esta interacción parece ser más débil que la que presenta la construcción control KAT1-Cub_{gate}. Estos datos apuntan a que la construcción de MoClo, pese a ser funcional, no es tan eficaz como la construcción original. De hecho, al enfrentar KAT1-Cub_{MoClo} a las construcciones de MoClo Nub-BAG4, Nub-BAG4ΔBD y Nub-BD tampoco se observó la interacción. Sin embargo, las construcciones Nub-BAG4 funcionan ya que sí que interactúan con KAT1-Cub_{gate}. Es más, parece que KAT1 interacciona con el BD de BAG4 y también con la región N-terminal de BAG4, aunque en menor medida. Pensamos que este hecho podría tener relación con la presencia de otro dominio capaz de interactuar con KAT1 con menor afinidad, como por ejemplo el dominio de ubiquitinación en la región N-terminal de BAG4.

Posteriores inmunodetecciones (Figura 15 y 16) mostraron que todas las proteínas se expresan correctamente. Por una parte, las proteínas Nub-BAG4, Nub-BAG4ΔBD y Nub-BD parece que se expresan incluso a niveles más altos que los controles usados. Sin embargo, la proteína KAT1-Cub_{MoClo} se expresa a niveles inferiores en comparación con KAT1-Cub_{gate}, cuando lo esperado era que ambas construcciones presentaran niveles de expresión similares. De forma complementaria, en nuestro laboratorio se realizaron ensayos de complementación funcional donde, entre otras, se estudió la construcción YCp_KAT1-Cub_LEU2. Estos ensayos se realizaron en cepas sensibles al cloruro de litio (LiCl), de forma que frente a un tratamiento con LiCl, la presencia de canales transportadores de potasio funcionales permite el crecimiento de la cepa. En estos ensayos se vio que las cepas transformadas con la construcción YCp_KAT1-Cub_LEU2 eran capaces de crecer incluso en las condiciones con mayor concentración de LiCl. Estos resultados, junto con los resultados de expresión vistos en la inmunodetección, parecen apuntar a que el canal KAT1-Cub está altamente activo. Esta hipótesis explicaría el hecho de que su expresión se mantenga en niveles mínimos para evitar una entrada excesiva de K⁺ en la célula y una consecuente toxicidad celular. Esta reducción en los niveles de expresión podría explicar por qué

los plásmidos diseñados presentan un nivel inferior de interacción en los ensayos de Split-Ubiquitina

En futuros estudios, con las piezas diseñadas, se podrá caracterizar de forma más definida esta interacción, perfilando de una forma más precisa las regiones implicadas en ello. Se completarán las construcciones y los ensayos correspondientes con las quimeras y versiones de BAG4 con mutaciones puntuales diseñadas en este proyecto. Sin embargo, el hecho de que tanto el BD como la región N-terminal participen en la interacción puede ser muy interesante en futuros estudios. Al mismo tiempo, se podrá estudiar la eficacia de las construcciones obtenidas mediante MoClo para conocer las razones detrás de las aparentes interacciones más débiles.

6. Conclusiones

- El sistema MoClo simplifica la obtención de las construcciones complejas necesarias para este estudio.
- Las construcciones obtenidas son funcionales, aunque parece que KAT1-Cub_{MoClo} los es a un nivel mucho más bajo de lo esperado.
- La proteína KAT1 es capaz de interactuar tanto con el BD de BAG4 como, en menor medida, con su región N-terminal.

7. Referencias

- ADAMS, E., & SHIN, R. (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. In *Journal of Integrative Plant Biology*. <https://doi.org/10.1111/jipb.12159>
- ANDERSON, J. A., HUPRIKAR, S. S., KOCHIAN, L. V., LUCAS, W. J., & GABER, R. F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(9), 3736–3740. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1570292>
- ANDREOU, A. I., & NAKAYAMA, N. (2018). Mobius assembly: A versatile golden-gate framework towards universal DNA assembly. *PLoS ONE*, *13*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189892>
- ANDRÉS, Z., PÉREZ-HORMAECHE, J., LEIDI, E. O., SCHLÜCKING, K., STEINHORST, L., MCLACHLAN, D. H., SCHUMACHER, K., HETHERINGTON, A. M., KUDLA, J., CUBERO, B., & PARDO, J. M. (2014). Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(17), E1806–E1814. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320421111>
- ANSCHÜTZ, U., BECKER, D., & SHABALA, S. (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J Plant Physiol*, *171*(9), 670–687. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.009>
- ASSMANN, S. M. (1993). Signal Transduction in Guard Cells. *Annual Review of Cell Biology*, *9*(1), 345–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.002021>
- BERKOWITZ, G., ZHANG, X., MERCIÉ, R., LENG, Q., & LAWTON, M. (2000). Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K⁺ channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol*, *41*(6), 785–790.
- CASSON, S., & GRAY, J. E. (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, *178*(1), 9–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02351.x>
- CORRATGÉ-FAILLIE, C., JABNOUNE, M., ZIMMERMANN, S., VÉRY, A. A., FIZAMES, C., & SENTENAC, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci*, *67*(15), 2511–2532. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0317-7>
- COTELLE, V., & LEONHARDT, N. (2016). 14-3-3 Proteins in Guard Cell Signaling. *Frontiers in Plant Science*, *6*(1210). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01210>
- DASZKOWSKA-GOLEC, A., & SZAREJKO, I. (2013). Open or close the gate - Stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *4*(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00138>
- DOUKHANINA, E. V., CHEN, S., VAN DER ZALM, E., GODZIK, A., REED, J., & DICKMAN, M. B. (2006). Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(27). <https://doi.org/10.1074/jbc.M511794200>
- DREYER, I., & BLATT, M. R. (2009). What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K⁺ channels in plants. *Trends Plant Sci*, *14*(7), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.001>
- DUPORTET, X., WROBLEWSKA, L., GUYE, P., LI, Y., EYQUEM, J., RIEDERS, J., RIMCHALA, T., BATT, G., & WEISS, R. (2014). A platform for rapid prototyping of synthetic gene networks in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, *42*(21), 13440–13451. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1082>
- ENGLER, C., GRUETZNER, R., KANDZIA, R., & MARILLONNET, S. (2009). Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIS restriction enzymes. *PLoS ONE*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>
- EPSTEIN, E., RAINS, D., & ELZAM, O. (1963). Resolution of fual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *49*, 648–692.
- FIELDS, S., & SONG, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, *340*(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- GIERTH, M., & MÄSER, P. (2007). Potassium transporters in plants--involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Lett*, *581*(12), 2348–2356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.035>

- GISLER, S. M., KITTANAKOM, S., FUSTER, D., WONG, V., BERTIC, M., RADANOVIC, T., HALL, R. A., MURER, H., BIBER, J., MARKOVICH, D., MOE, O. W., & STAGLJAR, I. (2008). Monitoring Protein-Protein Interactions between the Mammalian Integral Membrane Transporters and PDZ-interacting Partners Using a Modified Split-ubiquitin Membrane Yeast Two-hybrid System. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 7(7), 1362–1377. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800079-MCP200>
- HAHN, F., KOROLEV, A., LOURES, L. S., & NEKRASOV, V. (2020). A modular cloning toolkit for genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 20, 1–10. <https://doi.org/10.1101/738021>
- HANTOUCHE, C., WILLIAMSON, B., VALINSKY, W. C., SOLOMON, J., SHRIER, A., & YOUNG, J. C. (2017). Bag1 Co-chaperone Promotes TRC8 E3 Ligase-dependent Degradation of Misfolded Human Ether a Go-Go-related Gene (hERG) Potassium Channels. *J Biol Chem*, 292(6), 2287–2300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752618>
- HAYASHI, M., INOUE, S. I., TAKAHASHI, K., & KINOSHITA, T. (2011). Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells. *Plant and Cell Physiology*, 52(7), 1238–1248. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr072>
- HEDRICH, R., NEIMANIS, S., SAVCHENKO, G., FELLE, H. H., KAISER, W. M., & HEBER, U. (2001). Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta*, 213(4), 594–601. <https://doi.org/10.1007/s004250100524>
- HERNANZ-KOERS, M., GANDÍA, M., GARRIGUES, S., MANZANARES, P., YENUSH, L., ORZAEZ, D., & MARCOS, J. F. (2018). FungalBraid: A GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology. *Fungal Genetics and Biology*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.04.010>
- HETHERINGTON, A. M., & WOODWARD, F. I. (2009). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(August), 6951–6951. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
- HOANG, T. M., MOGHADDAM, L., WILLIAMS, B., KHANNA, H., DALE, J., & MUNDREE, S. G. (2015). Development of salinity tolerance in rice by constitutive-overexpression of genes involved in the regulation of programmed cell death. *Front Plant Sci*, 6, 175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00175>
- IVERSON, S. V., HADDOCK, T. L., BEAL, J., & DENSMORE, D. M. (2016). CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New E. coli Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synthetic Biology*, 5(1), 99–103. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00124>
- JOHANSSON, N., & VARSHAVSKY, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10340–10344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45015/>
- KABBAGE, M., & DICKMAN, M. B. (2008). The BAG proteins: A ubiquitous family of chaperone regulators. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1390–1402. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7535-2>
- KABBAGE, M., KESSENS, R., & DICKMAN, M. B. (2016). A plant Bcl-2-associated athanogene is proteolytically activated to confer fungal resistance. *Microbial Cell*, 3(5), 224–226. <https://doi.org/10.15698/mic2016.05.501>
- KIRKHAM, M. B. (2014). *Principles of Soil and Plant Water Relations* (2nd ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420022-7.00024-0>
- LEBAUDY, A., PASCAUD, F., VÉRY, A. A., ALCON, C., DREYER, I., THIBAUD, J. B., & LACOMBE, B. (2010). Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K⁺ current properties in Arabidopsis guard cells. *J Biol Chem*, 285(9), 6265–6274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068445>
- LEE, M. E., DELOACHE, W. C., CERVANTES, B., & DUEBER, J. E. (2015). A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synthetic Biology*, 4, 975–986. <https://doi.org/10.1021/sb500366v>
- LI, J., JULIE LEE, Y.-R., & ASSMANN, S. M. (1998). Guard Cells Possess a Calcium-Dependent Protein Kinase That Phosphorylates the KAT1 Potassium Channel. *Plant Physiology*, 116(2), 785–795. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.785>
- LOCASCIO, A., ANDRÉS-COLÁS, N., MULET, J. M., & YENUSH, L. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to investigate plant potassium and sodium transporters. *International Journal of Molecular*

- LOCASCIO, A., MARQUES, M. C., GARCÍA-MARTÍNEZ, G., CORRATGÉ-FAILLIE, C., ANDRÉS-COLÁS, N., RUBIO, L., FERNANDEZ, J. A., VÉRY, A.-A., MULET, J. M., & YENUSH, L. P. (2019). BCL2-ASSOCIATED ATHANOGENE4 Regulates the KAT1 Potassium Channel and Controls Stomatal Movement. *Plant Physiology*, *in press*. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00224>
- MARTELLA, A., MATJUSAITIS, M., AUXILLOS, J., POLLARD, S. M., & CAI, Y. (2017). EMMA: An Extensible Mammalian Modular Assembly Toolkit for the Rapid Design and Production of Diverse Expression Vectors. *ACS Synthetic Biology*, *6*(7), 1380–1392. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00016>
- MUMBERG, D., MÜLLER, R., & FUNK, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, *22*(25), 5767–5768. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7838736>
- NAKAMURA, R. L., MCKENDREE JR, W. L., HIRSCH, R. E., SEDBROOK, J. C., GABER, R. F., & SUSSMAN, M. R. (1995). Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard Cells. *Plant Physiology*, *109*(2), 371–374. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.371>
- NAWKAR, G. M., MAIBAM, P., PARK, J. H., WOO, S. G., KIM, C. Y., LEE, S. Y., & KANG, C. H. (2017). In silico study on Arabidopsis BAG gene expression in response to environmental stresses. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0961-3>
- OBRDLIK, P., EL-BAKKOURY, M., HAMACHER, T., CAPPELLARO, C., VILARINO, C., FLEISCHER, C., ELLERBROK, H., KAMUZINZI, R., LEDENT, V., BLAUDEZ, D., SANDERS, D., REVUELTA, J. L., BOLES, E., ANDRE, B., & FROMMER, W. B. (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(33), 12242–12247. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404467101>
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, *1469*(1), 1–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692635>
- ROUACHED, H., SECCO, D., & ARPAT, B. A. (2010). Regulation of ion homeostasis in plants: Current approaches and future challenges. *Plant Signaling and Behavior*, *5*(5), 501–502. <https://doi.org/10.4161/psb.11027>
- SANGSODA, S., CHEREST, H., & SURDIN-KERJAN, Y. (1985). The expression of the MET25 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated transcriptionally. *MGG Molecular & General Genetics*, *200*(3), 407–414. <https://doi.org/10.1007/BF00425724>
- SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E. E., ZANDALINAS, S. I., JUÁREZ, P., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., GRANELL, A., & ORZAEZ, D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One*, *6*(7), e21622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- SCHARWIES, J. D., & DINNENY, J. R. (2019). Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research*, *132*(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01089-8>
- SHABALA, S., & POTTOSIN, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: Implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, *151*(3), 257–279. <https://doi.org/10.1111/ppl.12165>
- SHARMA, T., DREYER, I., & RIEDELSBERGER, J. (2013). The role of K(+) channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, *4*, 224. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00224>
- SINAH, N., WILLIAMS, C. A., PIPER, R. C., & SHIELDS, S. B. (2012). A set of dual promoter vectors for high throughput cloning, screening, and protein expression in eukaryotic and prokaryotic systems from a single plasmid. *BMC Biotechnology*, *12*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-54>
- SNIDER, J., KITTANAKOM, S., CURAK, J., & STAGLJAR, I. (2010). Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: A powerful tool for identifying protein-protein interactions. *Journal of Visualized Experiments*, *36*, 1–7. <https://doi.org/10.3791/1698>
- SOLOW, S. P., SENGBUSCH, J., & LAIRD, M. W. (2005). Heterologous protein production from the inducible MET25 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, *21*(2), 617–620. <https://doi.org/10.1021/bp049916q>

- SOTTOCORNOLA, B., GAZZARRINI, S., OLIVARI, C., ROMANI, G., VALBUZZI, P., THIEL, G., & MORONI, A. (2008). 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *Plant Biol (Stuttg)*, *10*(2), 231–236. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00028.x>
- SOTTOCORNOLA, B., VISCONTI, S., ORSI, S., GAZZARRINI, S., GIACOMETTI, S., OLIVARI, C., CAMONI, L., ADUCCI, P., MARRA, M., ABENAVOLI, A., THIEL, G., & MORONI, A. (2006). The potassium channel KAT1 is activated by plant and animal 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, *281*(47), 35735–35741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603361200>
- STAGLJAR, I., KOROSTENSKY, C., JOHNSON, N., & TE HEESSEN, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(9), 5187–5192.
- SUSSMILCH, F. C., ROELFSEMA, M. R. G., & HEDRICH, R. (2019). On the origins of osmotically driven stomatal movements. *New Phytologist*, *222*(1), 84–90. <https://doi.org/10.1111/nph.15593>
- SZCZERBA, M. W., BRITTO, D. T., & KRONZUCKER, H. J. (2009). K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology*, *166*(5), 447–466. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.009>
- SZYBALSKI, W., KIM, S. C., HASAN, N., PODHAJSKAB, A. J., AATT, C. I. I., & NNNN, C. I. I. S. (1991). Class-II restriction enzymes - a review. *Gene*, *100*, 13–26.
- SZYROKI, A., IVASHIKINA, N., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M. R., ACHE, P., REINTANZ, B., DEEKEN, R., GODDE, M., FELLE, H., STEINMEYER, R., PALME, K., & HEDRICH, R. (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(5), 2917–2921. <https://doi.org/10.1073/pnas.051616698>
- TAKAYAMA, S., SATO, T., KRAJEWSKI, S., KOCHER, K., IRIE, S., MILLAN, J. A., & REED, J. C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, *80*(2), 279–284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834747>
- TAKAYAMA, S., & REED, J. C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nature Cell Biology*, *3*, doi:10.1038/ncb1001-e237. <https://doi.org/10.1038/ncb1001-e237>
- THAMINY, S., MILLER, J., & STAGLJAR, I. (2004). The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol*, *261*, 297–312. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:297>
- VERY, A. A., & SENTENAC, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, *54*, 575–603. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134831>
- WANG, M., ZHENG, Q., SHEN, Q., & GUO, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 7370–7390. <https://doi.org/10.3390/ijms14047370>
- WANG, YI, & WU, W. H. (2017). Regulation of potassium transport and signaling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *39*, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.006>
- WANG, YIN, NOGUCHI, K., ONO, N., INOUE, S. I., TERASHIMA, I., & KINOSHITA, T. (2014). Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(1), 533–538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305438111>
- WEBER, E., ENGLER, C., GRUETZNER, R., WERNER, S., & MARILLONNET, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, *6*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- YENUSH, L. (2016). Potassium and sodium transport in yeast. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 892). https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_8
- YOUNG, J. C. (2014). The role of the cytosolic HSP70 chaperone system in diseases caused by misfolding and aberrant trafficking of ion channels. *Disease Models & Mechanisms*, *7*(3), 319–329. <https://doi.org/10.1242/dmm.014001>
- ZÖRB, C., SENBAYRAM, M., & PEITER, E. (2014). Potassium in agriculture - Status and perspectives. *Journal of Plant Physiology*, *171*(9), 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008>