



***Proteínas que interagem com SnRK1.1 e o seu
envolvimento na via de sinalização do ácido abscísico e
na resposta ao défice de energia***

Sarah Gaspar Ferreira Azinheiro

Trabalho de Projeto para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação do Doutor Américo Rodrigues

2015

Título:

Copyright © Sarah Gaspar Ferreira Azinheiro

Escola Superior de turismo e tecnologia do mar (ESTM)

Instituto Politécnico de Leiria (IPL)

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

Foi com entusiasmo e dedicação que realizei esta tese de Mestrado, e foi através do contributo de algumas pessoas que este trabalho foi possível. Queria assim agradecer:

Ao Professor Doutor Américo Rodrigues pela excelente orientação que me deu e por tudo o que me ensinou ou logo deste ano. Pela atenção e dedicação dada. E pela boa disposição no laboratório.

Ao grupo “Stress plant Sinaling”, do Instituto Gulbenkian da ciência pela simpatia e acolhimento demonstrado durante as minha visitas e em particular a Elena Baena González por me permitir fazer parte deste projeto.

Ao grupo “dos taparueres” pela boa companhia e pela distração

A Joana Patriarca pelas caminhadas e pela sua amizade.

Aos meus pais e ao João por me apoiarem e motivarem ao longo deste ano.

Aos técnicos de laboratório da ESTM e a todos os ocupantes do laboratório que estiveram sempre disponíveis se tivesse em dificuldade.

Muito obrigado a todos!

Resumo

Resumo:

As plantas são organismos sésseis, incapazes de se movimentar de modo a procurar melhores condições ambientais ou nutricionais. Desenvolveram, assim mecanismos que lhes permitem adaptar-se e sobreviver em condição de stress. O stress parece ser parcialmente descodificado num sinal de défice de energia que desencadeia uma resposta, que envolve a indução da expressão de genes relacionados com processos catabólicos e a repressão de genes envolvidos em processos anabólicos. As proteínas quinases e fosfatases desempenham um papel fundamental na regulação das vias de sinalização de stress e, em particular as quinases da superfamília das SnRK encontram-se envolvidas em vários processos da resposta a stress, principalmente abióticos. Enquanto as SnRK2 e SnRK3 estão sobretudo envolvidas na resposta a ABA e a stress hídrico e salino, as SnRK1 têm sido descritas como reguladores chave da resposta a défice energético. No entanto, um número crescente de estudos tem evidenciado a interligação entre estas duas vias de sinalização.

Apesar da importância de SnRK1 na regulação da resposta ao stress e na regulação do crescimento e desenvolvimento em plantas, os mecanismos moleculares envolvidos são ainda pouco conhecidos. Com o objetivo de identificar proteínas que interagem com SnRK1 e que poderão estar envolvidas na sua via de sinalização, foi efetuado um rastreio, pelo método Y2H, utilizando uma biblioteca comercial normalizada construída a partir de mRNA extraído de onze tecidos de *Arabidopsis*.

Foram identificadas 32 proteínas que potencialmente interagem com SnRK1.1, entre as quais MARD1 e NDF4. O estudo destas interações permitiu verificar que MARD1 medeia a interação entre SnRK1.1 e RAPTOR1B, sugerindo que, de forma semelhante à que ocorre em mamíferos, esta interação pode interligar a resposta ao défice energético envolvendo os complexos SnRK1 e TOR. Curiosamente, verificou-se que MARD1 medeia igualmente a interação entre SnRK1.1 e várias das MAPKs de *Arabidopsis*, o que poderá indicar que estas duas vias de sinalização estão igualmente interligadas. Foi também verificado que, no sistema de Y2H, SnRK1.1 interage, em alguns casos de forma dependente de NDF4, com as proteínas DELLA, componentes essenciais da via de sinalização de giberelinas, o que pode sugerir uma interligação entre estas duas vias de sinalização e, desta forma, explicar parcialmente o papel de SnRK1 no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Um novo mecanismo de interligação entre as vias de sinalização de ABA e energia é sugerida pelos resultados obtidos em ensaios de Y2H mostrando que SnRK1.1 interage com SnRK2.3 e, pela observação de que em plantas que não expressam SnRK1.1/2, a expressão de genes de resposta a ABA é fortemente comprometida, sugerindo que SnRK1 poderá ativar as SnRK2 e, deste modo, ativar a resposta a ABA.

No seu conjunto, estes dados evidenciam o papel de SnRK1 como regulador central da resposta ao déficit energético em plantas e sugerem alguns dos mecanismos moleculares que poderão estar envolvidos, nomeadamente através da interação com várias outras vias de sinalização como o complexo TOR (interagindo com RAPTOR1B), as MAPKs, a via de sinalização de ABA (através da interação com SnRK2) e a via de sinalização de giberelinas (através da interação com proteínas DELLA).

Palavras-chave: SnRK1, sinalização de stress, ABA, GA, MAPK

Abstract

Abstract:

Plants are sessile organisms, unable to move to areas with better environmental or nutritional conditions. They developed mechanisms that allow them to adapt and to survive in stress condition. Stress seems to be partially decoded in an energy deficit signal that triggers a response involving the induction of genes related with catabolic processes and repression of genes involved in anabolic processes. The kinases and phosphatases proteins play a key role in the regulation of stress signaling pathways and, particularly, the SnRK superfamily is involved in the response to different types of stress, especially abiotic stress. While SnRK2 and SnRK3 are involved in the response to ABA and water and salt stress, SnRK1 have been described as a key regulator of the response to energy deficit. Interestingly, an increasing number of studies have suggested the existence of a link between these two signaling pathways.

Despite the importance of SnRK1 in regulating the response to stress and in the regulation of plant growth and development, the molecular mechanisms involved are still largely unknown. In order to identify proteins that interact with SnRK1 and, therefore, may be involved in this signaling pathway, an Y2H screen was performed using a standard commercial library constructed from mRNA extracted from eleven Arabidopsis tissues.

We identified 32 proteins that potentially interact with SnRK1.1, including MARD1 and NDF4. The study of these interactions showed that MARD1 mediates the interaction between SnRK1.1 and RAPTOR1B, suggesting that, similar to what occurs in mammals, this interaction might be a link between SnRK1 and TOR complexes response to energy deficit. Interestingly, we observed that MARD1 also mediates the interaction between SnRK1 and various Arabidopsis MAPKs, which may indicate that these two signaling pathways are also connected. It was also found that, in the Y2H system, SnRK1.1 interacts, in some cases depending on the presence of NDF4, with the DELLA proteins, essential components of gibberellin signaling pathway, suggesting a link between these two signaling pathways and thus partially explaining the SnRK1 role in the growth and development of plants.

A new mechanism of interconnection between the ABA and energy signaling pathways is suggested by the results obtained in Y2H assays, showing that SnRK1.1 interacts with SnRK2.3 and by the observation that in plants that do not express SnRK1.1 / 2 the of ABA marker genes expression is strongly compromised, indicating that SnRK1 may activate the SnRK2 and, consequently, enable the response to ABA.

Taken together, these data highlight the role of SnRK1 as a central regulator of the response to energy deficit in plants and suggest that, the molecular mechanisms involved, might include the interaction with several other signaling pathways such as TOR complex (interacting with RAPTOR1B), the MAPKs, the ABA signaling pathway (via interaction with SnRK2) and gibberellin signaling pathway (via interaction with DELLA proteins).

Keywords: SnRK1, Stress signaling, ABA, GA, MAPK.

Índices

	Paginas
Resumo	IX
Abstract	XIII
Índice de matérias	XV
Índice de figuras	XVII
Índice de tabelas	XIX
Lista de abreviaturas e siglas	XXIII
1 Introdução.....	3
1.1 MAPKs	4
1.2 SnRK	4
1.3 Envolvimentos de SnRK1 na regulação da disponibilidade de energia	8
1.4 Via de sinalização do ácido abscísico.....	9
1.5 Possível relação entre a sinalização ABA e o controlo energético	12
2 Materiais e Métodos	19
2.1 Rastreo de dois híbridos em levedura.....	19
2.2 Construção de plasmídeos	22
2.2.1 Interações binárias	22
2.2.2 Interações envolvendo complexos proteicos ternários.....	23
2.3 Dois/três híbridos em levedura.....	23
2.4 Ensaio da atividade da PP2CA, <i>in vitro</i>	24
2.5 Análise da expressão de genes	24
3 Resultados.....	29
3.1 Identificação de proteínas que interagem com SnRK1.1	29
3.2 Interligação entre a via de sinalização de energia e ácido abscísico	34
4 Discussão e conclusão.....	39
4.1 Identificação de proteínas que interagem com SnRK1.1	39
4.2 Interligação entre a via de sinalização de energia e ácido abscísico	42
5 Perspetivas futuras.....	47
6 Bibliografia	51
7 Anexos	61

Índice de figuras

Figura 1.1- Superfamília das SnRK, presentes em plantas.	5
Figura 1.2- Representação das subunidades que compõem as proteínas SnRK1.	7
Figura 1.3- Modelo proposto da via de sinalização ABA.	11
Figura 3.1- Interação entre SnRK1.1 e MARD1 e as deleções Δ DUF581 (aa 1-210) e DUF581 (aa 211-263).	31
Figura 3.2- Interação entre as diferentes MAPKs e SnRK1.1 na presença e ausência de MARD1.	32
Figura 3.3- Interação entre RAPTOR 1B e SnRK1.1 na presença e ausência de MARD1.	32
Figura 3.4- Interação entre as diferentes proteínas DELLA testadas e SnRK1.1 na presença e ausência de NDF4.	34
Figura 3.5- Atividade da PP2CA na presença concentrações crescentes de AMP e ADP.	35
Figura 3.6- Interação entre SnRK1.1 e as diferentes SnRk2.	35
Figura 3.7- Expressão Relativa de RD29A, RD29B e RD22 na presença e ausência de ABA.	36
Figura 7.1 (Anexo) - Controlos da interação das MAPKs com SnRK1.1, na presença de MARD1.	61
Figura 7.2 (Anexo) - Controlos da interação das SnRK2.2, -2.3, OST1 com SnRK1.1.	62

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Primers utilizados para a amplificação das sequências dos genes a serem clonados.	21
Tabela 3.1- Proteínas que potencialmente interagem com SnRK1.1.	30
Tabela 7.1 (Anexo) - Categorias funcionais (níveis 2 e 3) sobre-representadas, no conjunto de proteínas identificadas através do rastreamento de Y2H efetuado.	61

Lista de abreviaturas e siglas

μL- Microlitro

A ou **ADE**- Adenina

aa- Aminoácidos

ABA- ácido abscísico

AD- Domínio de ativação

ADP- adenosina difosfato

AMP- adenosina monofosfato

ATP- Adenosina trifosfato

BD- Domínio de ligação

cDNA- DNA complementar

CDS- sequência codificante

DTT- Ditioneitol

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

H ou **His**- Histidina

L- Leucina

LB- Meio Luria Bertani

MCS- Local de clonagem múltipla

mM- Milimolar

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PEG- Polietilenoglicol

qRT-PCR- PCR quantitativo em tempo real

SD- meio de cultura sintético com dextrose como fonte de carbono

Tris- trisaminometano

W- Triptofano

Lista de abreviaturas e siglas

YPDA- meio de cultura com extrato de levedura (Y), peptona (P), dextrose (D) e Adenina (A)

Introdução

1 Introdução

O controlo da homeostase do metabolismo é um desafio para todos os organismos. As plantas, como organismos sésseis, são constantemente desafiadas por uma grande variedade de alterações climáticas e restrições nutricionais. As limitações de crescimento provocado por estes tipos de stress resultam numa perda significativa da produtividade, e por isso os mecanismos de resistência e adaptação a estas alterações tem sido o foco de uma intensa investigação (Baena-Gonzalez, 2010). De modo a poderem sobreviver, as plantas tem de ser capaz de detetar sinais de alerta, que podem prejudicar o seu crescimento e desenvolvimento. Existe uma relação entre a disponibilidade de energia e a tolerância ao stress, a sobrevivência, o crescimento das células e a longevidade (Kenyon, 2005) o que sugere, que uma parte do stress é traduzida num sinal de défice de energia que leva a respostas convergente, independentemente da sua causa. Estudos comparativos de dados de *microarray* demonstraram que este sinal originado por estímulos de diversos stresses, provoca uma mudança na expressão génica, onde genes envolvidos em processos catabólicos e sinalizadores são induzidos e outros envolvidos em processos anabólicos são reprimidos (Fujita et al., 2006; Baena-Gonzalez et al., 2007a).

A adição covalente de grupos fosfatos, em aminoácidos específicos, catalisada por proteínas quinases, e a sua subsequente remoção por proteínas fosfatases constitui um dos mais importantes mecanismos de sinalização em células eucariotas (Wang et al., 2013a). A fosforilação reversível de aminoácidos serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) é a modificação pós-traducional de proteínas mais comum. A carga negativa introduzida na proteína por fosforilação pode alterar a conformação alostérica da proteína, modificando as forças atrativas e repulsivas entre aminoácidos. Como consequência, este tipo de modificação pode alterar a função das proteínas alvo e, igualmente, afetar a associação destas proteínas com outras proteínas ou outras macromoléculas, como o DNA (Kirchler et al., 2010). O controlo do estado de fosforilação de proteínas, em resíduos específicos, é realizado por uma variedade de famílias de genes que codificam quinases e fosfatases (Kirchler et al., 2010). As proteínas quinases desempenham um papel chave no controlo da divisão celular, na resposta celular a estímulos externos e na regulação metabólica. Muitas das proteínas quinases, envolvidas na transdução de sinal de stress em plantas, são comuns a todos os organismos

eucariotas, como é o caso das MAPKs (mitogen-activated protein kinases), das GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), CDPKs (calcium-dependent protein kinases) e a maioria das SnRKs (SNF1-related kinases) (Kulik et al., 2011).

1.1 MAPKs

Cerca de 10% de todas as quinases, presentes em plantas, estão envolvidas na via das MAPK, o que revela a sua importância (Colcombet and Hirt, 2008). O genoma de *Arabidopsis* codifica 20 MAPK que tendo em conta as semelhanças ao nível da sequência de aminoácidos são divididas em 4 grupos (A, B, C e D) (Hamel et al., 2006)

A cascata de sinalização das MAPKs é composta por 3 elementos principais de sinalização, que consistem em fosforilações consecutivas, em resposta a sinais extracelulares e intracelulares. As MKKK ativam as MKK, que por sua vez ativam as MAPK. As MAPK são quinases de aminoácidos serina/ treonina capazes de fosforilar um grande leque de substratos citoplasmáticos e nucleares, incluindo outras quinases e fatores de transcrição, o que tem consequência na localização, estado de atividade, estabilidade e níveis de transcrição destas proteínas (Colcombet and Hirt, 2008). Estudos genéticos e abordagens bioquímicas permitiram verificar, que as MAPK não estão apenas envolvidas na sinalização do stress biótico e abiótico, mas igualmente em processos como a sinalização hormonal e do desenvolvimento da planta (Colcombet and Hirt, 2008; Popescu et al., 2009).

1.2 SnRK

O genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica 38 SnRK (Sucrose–Non-Fermenting-Related Kinases) e esta superfamília divide-se em três subfamílias, SnRK1, SnRK2 e SnRK3 (Figura 1.1) (Hrabak et al., 2003). As SnRK2 e SnRK3 englobam um total de 35 proteínas quinases distintas envolvidas na resposta ao stress e na via de sinalização do ácido abscísico, em *Arabidopsis* (Boudsocq et al., 2007; Tominaga et al., 2010; Zheng et al., 2010).

As duas subfamílias diferem bastante das SnRK1, pois parecem ser exclusivas de plantas e são subfamílias relativamente maiores e mais diversas que SnRK1. As suas seqüências de aminoácidos são idênticas em 42-45% com a de SnRK1, no entanto apresentam funções distintas (Halford et al., 2003; Hrabak et al., 2003).

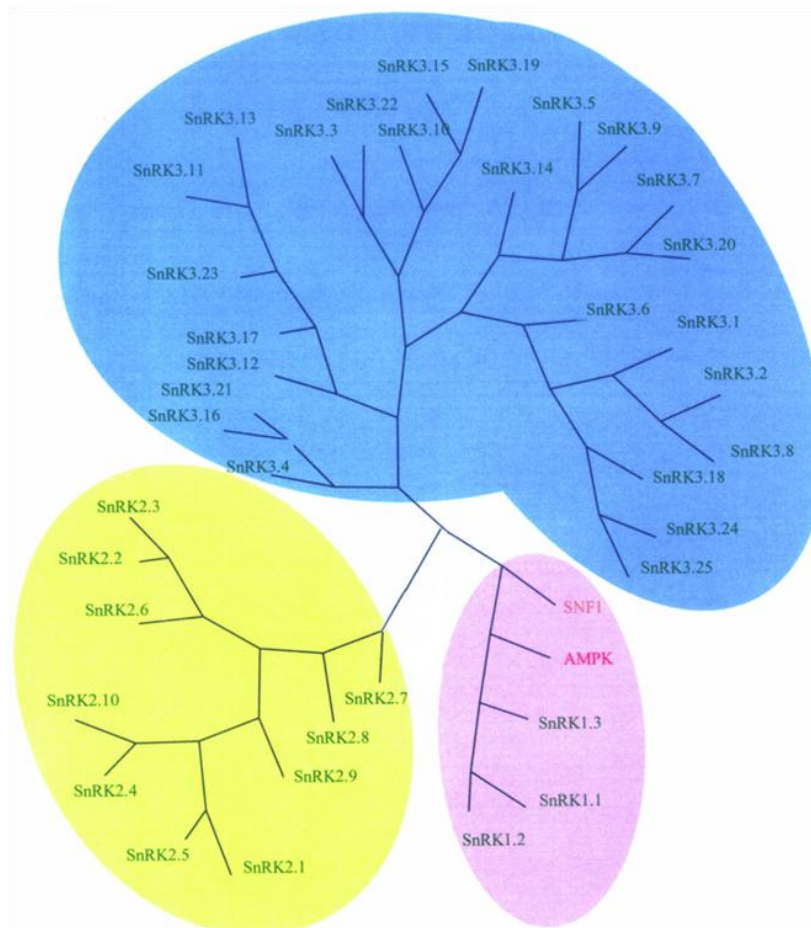


Figura 1.1- Superfamília das SnRK, presentes em plantas.

Em *Arabidopsis* existem três grupos de SnRK. As SnRK1, ou contrário dos dois outros grupos, apresentam órtologos em levedura, Snf1, e em mamíferos, AMPK (Halford and Hey, 2009).

A primeira seqüência de SnRK1, em plantas, foi descrita em 1991, ao ser isolada de uma biblioteca de cDNA, proveniente do endosperma de centeio. Esta codificava uma proteína de 57.7kDa com 502 aminoácidos.(Alderson et al., 1991). Três das SnRK pertencem a este grupo, sendo elas, a SnRK1.1 (KIN10/AKIN10), a SnRK1.2 (KIN11/AKIN11), e a SnRK1.3 (KIN12/AKIN12) (Figura 1.1) (Hrabak et al., 2003). SnRK1.3 é considerado um pseudogene, ou seja um gene não funcional, por apresentar níveis de expressão muito baixos (Baena-Gonzalez et al., 2007a). As proteínas SnRK1.1 e SnRK1.2 apresentam 81% de semelhança em termos da seqüência de aminoácidos e contêm um arranjo similar de domínios funcionais, que incluem um domínio quinase na

extremidade N-terminal, um domínio de associação a ubiquitina e um domínio de associação a outras quinases na extremidade C-terminal (Crozet et al., 2014a). A região não catalítica parece facilitar a interação de SnRK1 com várias proteínas, o que indica que as SnRK1 podem fazer parte de diferentes complexos de proteínas (Williams et al., 2014).

As SnRK1 são os órtologos em plantas de AMP-activated protein kinases (AMAPK), presente em mamíferos, e de sucrose non-fermenting-1 protein kinase (Snf1), encontrada em levedura (Figura 1.1). SnRK1 apresenta uma semelhança de 48% com a sequência de Snf1 e AMAPK, sendo o domínio catalítico idêntico em 62-64% dos aminoácidos (Halford et al., 2003). Estas quinase encontram-se envolvidas nas respostas celulares a stress nutricional e outros tipos de stress (Jiang and Carlson, 1996) e a sua ativação requer a fosforilação de um resíduo treonina, situado no loop da subunidade catalítica α (Polge and Thomas, 2007). No entanto, a clara ligação que existe entre a fosforilação e a atividade da quinase, descrita em mamífero e levedura, não se encontra bem estabelecida em plantas, sugerindo a existência de mecanismos reguladores adicionais (Crozet et al., 2014a).

As SnRK1 consistem num complexo heterotrimérico, formado por uma subunidade catalítica α e duas unidades reguladoras, β e γ . Em *Arabidopsis*, estas têm duas isoformas da subunidade catalítica, (AKIN10 e AKIN11), três da subunidade β (AKIN β 1, AKIN β 2, e AKIN β 3) e uma da subunidade γ (AKIN γ) (Figura 1.2) (Polge and Thomas, 2007). A subunidade γ regula a atividade da subunidade catalítica α e que a subunidade β contem uma zona de ligação a carboidratos (CBM) e uma extensão no N-terminal, que possivelmente encontra-se envolvida na especificidade do complexo ao substrato e na determinação da localização celular (Avila et al., 2012; Crozet et al., 2014a). Existe ainda uma subunidade pouco usual, AKIN $\beta\gamma$, determinada como uma subunidade do tipo γ , mas que apresenta no N-terminal a sequência descrita como o domínio específico da subunidade β (Figura 1.2) (Gissot et al., 2006). Todas as subunidades que fazem parte do complexo estão muito bem conservadas em eucariotas.

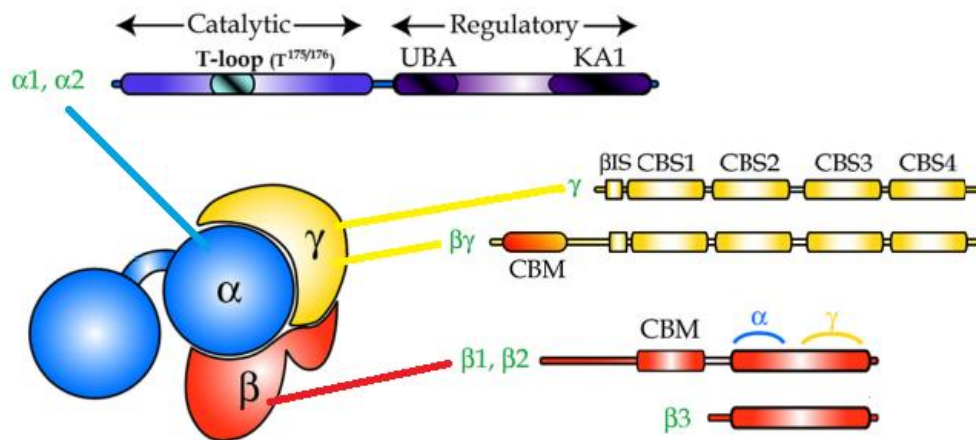


Figura 1.2- Representação das subunidades que compõem as proteínas SnRK1.

O complexo das SnRK1 é constituído por três tipos de subunidades: a subunidade α (azul) é composta por um domínio catalítico e um domínio regulador; a subunidade γ (amarelo) contém 4 domínios CBS; e a subunidade β (vermelho) é constituído por um domínio ASC α e β e um domínio CBM. Por fim a subunidade $\beta\gamma$ tem a mesma estrutura que as subunidades γ , mas com adição de um domínio CBM (Crozet et al., 2014a).

SnRK1, AMAPK e Snf1 não são apenas proteínas semelhantes estruturalmente mas também são análogos quanto a sua função. Todas elas mostram estar envolvidas na resposta ao défice de nutrientes. A AMAPK funciona como sensor do estado dos hidratos de carbono celular e dos níveis de AMP/ATP, de modo a controlar o crescimento em resposta a disponibilidade de energia (Halford et al., 2003; Hey et al., 2010; Ghillebert et al., 2011). Em condições de privação de glucose, Snf1 controla genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de carbono, na respiração, gliconeogênese, transporte de nutriente e meiose (Hedbacker and Carlson, 2008). Foi igualmente observado, que o aparecimento de mutações em Snf1 provoca defeitos pleiotrópico no crescimento em fontes de carbono alternativas, como a sacarose, galactose, maltose, glicerol e etanol. Estes mutantes geralmente apresentam um aspeto pouco saudável e deficiente controlo do crescimento celular. (Estruch et al., 1992). Snf1 também se encontra envolvido no controlo da biossíntese de carboidratos de reserva e na reciclagem de macromoléculas e organelos através da autofagia (Ghillebert et al., 2011).

Em células de mamíferos, a AMAPK demonstrou ser ativada por uma variedade de stresses metabólicos ou em resposta a determinados compostos xenobióticos, através de mecanismos que envolvem o aumento de AMP, ADP ou Ca²⁺ celular. A AMAPK foi inicialmente definida como a proteína quinase ativada de forma alostérica por AMP e com

capacidade de fosforilar e inativar enzimas da síntese lipídica. Esta é sensível a variação das concentrações de AMP e ATP celulares (relação AMP/ATP) e é ativada pelo stress metabólico que inibe a produção de ATP (hipoxia, privação de glucose, adição de inibidores metabólicos) ou pela estimulação do consumo de ATP (ativação de proteínas motoras, bombas ou canais iônicos ou de vias biossintéticas)(Hardie, 2007).

1.3 Envolvimentos de SnRK1 na regulação da disponibilidade de energia

Genes SnRK1, presentes em diversas plantas, foram identificadas e caracterizados como estando envolvidos na regulação do metabolismo global e do estado energético da planta. As SnRK1 têm uma função parcialmente redundante e a análise da funcionalidade de SnRK1.1/SnRK1.2 em *Arabidopsis*, providenciou evidências de que as SnRK1, tal com Snf1 e AMAPK, têm uma função chave na sinalização de energia (Kulik et al., 2011). Em *Arabidopsis thaliana*, as proteínas SnRK1.1 e SnRK1.2 foram identificadas como reguladores centrais do transcriptoma em resposta a escuridão e muitos outros tipos de stress. Estas duas quinases são responsáveis por uma reprogramação transcricional que altera a expressão de mais de 1000 genes, permitindo o restabelecimento da homeostase (Baena-Gonzalez et al., 2007a). SnRK1.1 promove, assim, a expressão de genes envolvidos em processos catalíticos, fornecendo fontes alternativas de energia e metabolitos, e reprime a expressão de genes envolvidos na biossíntese e outros processos de consumo de energia (Baena-Gonzalez et al., 2007a; Baena-Gonzalez, 2010). Quando a expressão dos dois genes, SnRK1.1 e SnRK1.2., é reduzida, a germinação das sementes em baixas condições de energia é comprometido, enquanto as plantas maduras são sujeito a limitações de crescimento, e florescência e senescência precoce (Baena-Gonzalez et al., 2007a). Algumas das enzimas envolvidas no metabolismo basal são fosforiladas e reguladas pelas SnRK1, como a nitrate reductase (NR), a HMG-CoA reductase, a sucrose phosphate synthase (SPS) e a trehalose phosphate synthase (Sugden et al., 1999; Harthill et al., 2006). As SnRK1 também parecem desempenhar um papel importante no controlo da expressão de um grande número genes que codificam fatores de transcrição, proteínas remodeladoras da cromatina e inúmeros componentes envolvidos na transdução de sinal (Kulik et al., 2011). Além das mudanças transcricionais e da fosforilação direta, foi recentemente observado que as SnRK1 são capazes de ativar a via de microRNAs (miRNA) (Confraria et al., 2013).

Mais alguns genes alvos de SnRK1 têm sido identificados. Na planta do arroz (*Oryza sativa*), a ativação do promotor da α -amilase por MYBS1, envolvida na sinalização de açúcares, é regulada por SnRK1 (Lu et al., 2007). Um estudo recente estabelece a existência de um complexo entre SnRK1 e Adenina Kinase (ADK), que tem a função de fosforilar adenosina de modo a gerar 5'-AMP. A SnRK1 parece estimular a ADK, *in vitro*, por um mecanismo não enzimático desconhecido. A formação deste complexo poderá desempenhar uma importante função no controlo da disponibilidade energética e na resposta celular ao stress (Mohannath et al., 2014). Os genes SnRK1 são expressos ao longo do desenvolvimento da planta, incluindo nos meristemas e primórdios foliares, no entanto muito pouca informação existe sobre a expressão destes genes (Williams et al., 2014).

As quinases SnAK1 e SnAK2 (SnRK1 activating kinase 1, 2) também denominadas de GRIK1 e GRIK2 (Geminivirus Rep-Interacting Kinase 1, -2), ativam as SnRK1 pela fosforilação da subunidade catalítica no aminoácido Thr¹⁷⁵. Foi também observado que, *in vitro*, as SnAK requerem autofosforilação para a sua própria ativação e poderem assim fosforilar e ativar SnRK1 (Crozet et al., 2010). No entanto, a relevância das SnAK como proteína reguladora de SnRK1 permanece por ser comprovada *in vivo*. Por outro lado existem evidências que uma outra proteína, a CIPK15 (calcineurin B-like interacting protein kinase) controla a atividade de SnRK1. A fosforilação de SnRK1 por esta proteína e a sua ativação, poderia permitir a ligação entre a sinalização de défice de O₂ e a cascata de sinalização de açúcares dependente de SnRK1, de modo a regular a produção de açúcares e energia e inibindo o crescimento da planta do arroz, em situação de cheias (Lee et al., 2009).

Apesar de o papel relevante que de SnRK1 na sinalização do défice de estar bem estabelecido e de se conhecerem já alguns dos genes regulados por estas quinases a forma como atuam e como elas próprias são reguladas ainda permanece por esclarecer.

1.4 Via de sinalização do ácido abscísico

A maioria dos processos fisiológicos, metabólicos e celulares que regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas é controlado por uma variedade de hormonas vegetais, como as auxinas, citoquininas, ácido abscísico e giberrelinas, entre outras (Wang et al., 2013b). O ácido abscísico (ABA) tem um papel chave na sobrevivência da planta, por ter a capacidade de regular a resposta a diferentes tipos de stresses abióticos

e bióticos (Antoni et al., 2012b). Funciona, deste modo, como um sinal químico, que induz alterações nos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas, como forma de adaptação a condições de stress (Lee and Luan, 2012). Esta fitohormona foi descoberta em 1960, e pouco depois a sua relação com stress osmótico foi evidenciada através da observação dum mutante de tomate *flacca* (*Lycopersicon esculentum*), deficiente em ABA, que apresentava um fenótipo murcho, mas tinha a capacidade de recuperar o seu estado saudável pelo tratamento com ABA exógeno de (Bradford, 1983). O fecho dos estomas, é uma das consequências da adição de ABA observado em *Xanthium* e foi igualmente demonstrado, que a sua concentração na planta aumenta significativamente, após um período de privação de água (Cornish and Zeevaart, 1985). A manutenção do crescimento da raiz durante um défice de água é igualmente a chave para a resposta adaptativa que mantém os níveis adequados de água. Este processo é controlado por diferentes vias de sinalização hormonal, incluído a via do ácido abscísico (Luo et al., 2014). Em sementes, ABA regula processos essenciais para a viabilidade da semente e germinação, incluído a acumulação de proteínas e reservas de lípidos, a indução da dormência e a tolerância a dissecação (Antoni et al., 2012b).

Um avanço significativo na compreensão dos mecanismos moleculares da resposta a ABA ocorreu com a identificação de um novo tipo de recetores de ABA, os PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin resistance /PYR1-like/regulatory components of ABA receptor) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009), a perceção que após a ação destes recetores existia a formação de um complexo proteico fosfatase-quinase (PP2C-SnRK2) (Umezawa et al., 2010). A deteção de ABA pelos recetores PYR/PYL/RCAR induz uma mudança conformacional, em dois *loops* conservados (*Latch loop* e *Gate loop*), essencial para a transdução do sinal ABA. As alterações no *Latch loop* irão permitir a ligação de ABA aos recetores, enquanto o *Gate loop* vai aprisionar a região catalítica da fosfatase PP2C, inibindo a sua atividade. Observou-se que as PP2C regulam negativamente as SnRK2, inativando-as por desfosforilação, o que consequentemente silencia a sinalização ABA. Na presença de ABA os recetores PYL/PYR/RCAR, ligados ao ABA, interagem com PP2C e inibem a sua atividade de fosfatase. SnRK2 é então livre da regulação negativa de PP2C, ativando a sinalização ABA pela fosforilação de elementos alvos, responsáveis pela reprogramação transcriptacional, como alguns fatores de transcrição da família bZIP, chamados ABA-response-element-binding proteins (ABF/AREB) (Figura 1.3) (Hubbard et al., 2010; Klingler et al., 2010; Umezawa et al., 2010).

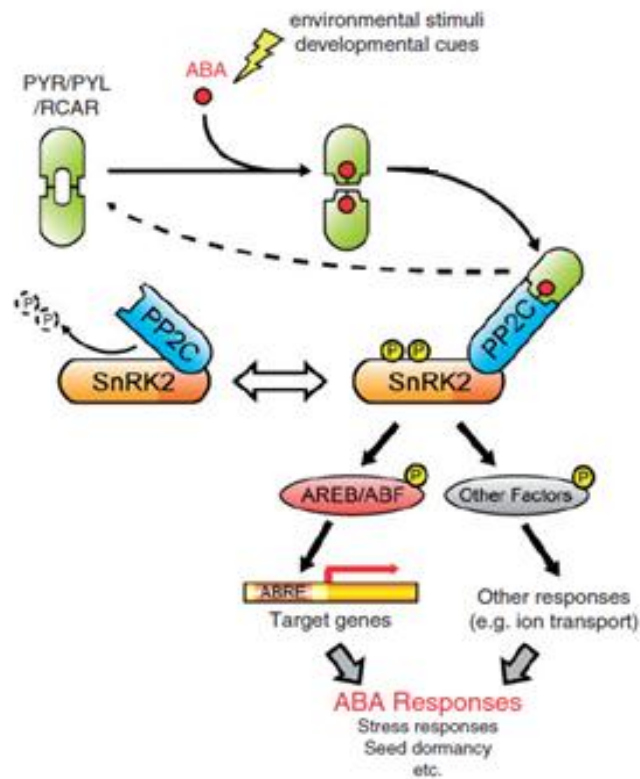


Figura 1.3- Modelo proposto da via de sinalização ABA.

Em condições normais, as PP2C regulam negativamente as SnRK2 pela interação direta e desfosforilação. Em situações de stress biótico ou abiótico que conduzam ao aumento da concentração endógena de ABA, os recetores PYL/PYR/RCAR ligam se a ABA e interagem com as PP2CA, inibindo a sua atividade de fosfatase, que liberta as SnRK2, podendo regular os fatores de transcrição alvos, como os AREB/ABF e outros envolvidos nos canais iónicos (Umezawa et al., 2010).

Verificou-se que três proteínas SnRK2 da subclasse III, SnRK2.2, SnRK2.3 e SnRK2.6/OST1, são fortemente ativadas por ABA e mutantes que não expressam estas proteínas não são capazes de desencadear a resposta ABA, incluído a dormência de sementes, inibição da germinação, crescimento pós-germinação, expressão de genes de resposta ABA e movimento estomacal. Quanto aos fatores de transcrição da família ABF/AREB, ABF1, ABF2 e ABF3 demonstraram serem os dominantes na sinalização ABA induzida por stress osmótico (Yoshida et al., 2014). Estes dados mostram que a sinalização de ABA é desencadeada por um sistema de regulação dupla negativa, onde as PP2C são inibidas pelos recetores e as SnRk2 podem ser inibidas pelas PP2C.

1.5 Possível relação entre a sinalização ABA e o controle energético

Apesar da cascata da sinalização de stress de várias plantas ter sido dissecado em detalhe, os pontos de interceção entre as diferentes vias de sinalização, bem como a identidade dos intermediários de sinalização e os reguladores chaves, permanecem desconhecidos (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008).

Várias evidências sugerem que existe uma interligação entre a resposta aos níveis de açúcares e a via de sinalização do ácido abscísico. Alguns mutantes afetados na síntese de ABA (*aba1*, *aba2*, *aba3*) e na sensibilidade a ABA (*abi3*, *abi4*, *abi5*, *abi8*) são também mutantes sensíveis a açúcares, o que indica que a sinalização de açúcares requer uma cadeia de sinalização de ABA intacta (Brocard-Gifford et al., 2003). Em *Arabidopsis*, durante a germinação, a adição exógena de açúcares pode modular a concentração interna de ABA, aumentando a sua síntese ou inibindo a sua degradação (Brocard-Gifford et al., 2003). Outra alternativa sugere que ABA poderá aumentar a capacidade de resposta aos níveis de açúcares. A indução de alguns genes da biossíntese de ABA (*ABA1*, *ABA3*, *NCED3* e *AAO3*) demonstraram um efeito sinérgico pela glucose e ABA (Cheng et al., 2002). Também foi observado que a sobreexpressão de *ABI5* e de alguns fatores de transcrição *bZIP*, *ABF2*, *ABF3* e *ABF4*, confere hipersensibilidade a açúcares (Brocard et al., 2002).

SnRK1 aparece como tendo um papel importante em processos fisiológicos controlados por ABA, como é o caso da germinação e maturação de sementes. A sobreexpressão de *SnRK1*, em *Arabidopsis*, provoca hipersensibilidade a ABA durante a germinação e desenvolvimento precoce da plântula (Radchuk et al., 2010). Existem evidências da regulação de *SnRK1.1* por ABA em outras espécies de plantas, como é o caso do trigo, onde a aplicação de ABA, em raízes, diminui a quantidade de *SnRK1.1* (Coello et al., 2012). *SnRK1.1* interage com *FUS3*, um fator de transcrição que controla a transição de fase e desenvolvimento dos órgãos laterais, pela regulação negativa de GA, enquanto regula positivamente a síntese de ABA (Tsai and Gazzarrini, 2012). Em *Arabidopsis*, sete das nove proteínas fosfatases do tipo 2C da classe A (PP2Cs) atuam como reguladores negativos da via ABA e foi recentemente observado que pelo menos duas delas, *PP2CA* e *ABI1*, e têm a capacidade de desfosforilar as *SnRK1*, levando a sua inativação. A interação entre estas proteínas e a desfosforilação de *SnRK1* foi observada tanto *in vitro* como *in vivo*. A deleção das PP2C no mutante quadruplo, *pp2c*, anula a inativação de *SnRK1* e, conseqüentemente, a repressão dos genes alvos posteriores, em condições de privação de energia derivado do stress. Foi também verificado, que ABA

tem a capacidade de induzir a sinalização de SnRK1 através da inibição das PP2CA (Rodrigues et al., 2013). Estas descobertas, permitiram supor que existe uma ligação entre a via de sinalização de ABA, em cuja regulação participam as PP2Cs e a resposta em condições de privação de energia, regulada por SnRK1. Desta forma, as PP2Cs poderão contribuir para redefinir a atividade de SnRK1 na restauração dos níveis de energia e permitir que ABA induza e potencie a sinalização por SnRK1 durante o stress (Crozet et al., 2014a). Foi igualmente demonstrado que os fatores de transcrição ABF/AREB podem funcionar como substrato não só para algumas SnRK2 mas igualmente para as SRNK1 (Tsai and Gazzarrini, 2014), o que poderá também sugerir um papel para SnRK1 na regulação da sinalização de ABA. SnRK1 poderá, assim, ser um elo de ligação entre as duas vias de sinalização.

2 Objetivos

A resposta ao stress biótico e abiótico em plantas tem sido intensivamente estudado, devido a elevada importância na produtividade do cultivo de muitas espécies. Uma grande rede de respostas simultâneas são ativadas, e algumas vias de sinalização são reguladas entre si.

Existe uma grande quantidade de informação, sobre as consequências da privação de energia, mas os mecanismos que regulam a energia disponível e permitem ao organismo ultrapassar o stress causado, ainda permanecem com muitas lacunas. As proteínas quinases SNRK1, foram evidenciadas como reguladoras centrais do stress energética, no entanto a sequência de acontecimentos desta via de sinalização ainda não foi elucidada. Tem sido feito um grande esforço no estudo do papel de SNRK1.1 na via de sinalização ABA, pois é evidenciado que a sua atividade regula proteínas envolvidas nesta via, no entanto a sua função permanece desconhecida. Neste sentido, o trabalho aqui apresentado teve dois principais objetivos.

- 1) Identificação, através de um rastreio de dois híbridos em levedura, de proteínas que interagem com SnRK1.1, que deste modo podem estar envolvidas na sinalização da resposta ao stress energético.
- 2) Estudo de interligação das vias de sinalização de SnRK1 e ABA, pela análise da regulação da atividade da PP2CA por adenosina, e através do papel de SnRK1 na regulação das SnRK2, proteínas chaves no desencadear da resposta ABA.

Materiais e métodos

2 Materiais e Métodos

2.1 Rastreo de dois híbridos em levedura

Para a identificação de proteínas codificadas pelo genoma de *Arabidopsis* que interagem com SnRK1.1, recorreu-se a um rastreo de dois híbridos (Y2H) utilizando uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis* normalizada, construída em pGADT7-RecAB, em células de levedura (estirpe Y187) (Clontech). A construção, em pGBK7, apresentando a sequência codificante (CDS) de SnRK1.1 ligada ao domínio de ligação (BD, *Biding Domain*) de GAL4 (BD-SnRK1.1) foi descrita anteriormente (Rodrigues et al., 2013). Esta construção foi utilizada para transformar células de levedura, estirpe Y2H GOLD (Clontech), utilizando o kit “Yeastmaker Yeast Transformation System 2” (Clontech), de acordo com as instruções do fabricante.

O rastreo da biblioteca de cDNA foi executado utilizando o kit “Matchmarker Gold Yeast Two-Hybrid System” (Clontech), de acordo com as instruções do fabricante. De uma forma breve, 45 ml de meio 2xYPDA líquido (com 50 mg/l canamicina) foram inoculados com 5ml da cultura das células Y2H GOLD/BD-SnRK1 (com uma densidade das células superior a 10^8 células/ml) e com uma alíquota (1 ml) da biblioteca, após o que se procedeu a incubação a 30 °C, durante 24h, de forma a permitir a reprodução sexual (*mating*) das duas estirpes. Após a incubação, as células foram centrifugadas (1000 g durante 10 min) e, depois de rejeitado o sobrenadante, ressuspendidas em 10 ml de água. As células foram espalhadas em placas de 15 cm de diâmetro (200 μ L por placa) contendo meio sólido SD sem leucina e triptofano (SD -L-W) (Clontech) suplementado com X- α -GAL (10 mg/L) e aureobasidina (200 μ g/L) que foram incubadas a 30 °C, durante 5 dias. Para controlo do número de diploides formado e da eficiência do *mating*, 100 μ L de diluições sucessivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram espalhados em placas com meio SD -L-W, SD -L e SD -W que foram incubadas a 30 °C durante 3 dias, após o que foram contadas o número de colónias formadas.

As colónias de cor azul formadas no meio SD -L-W suplementado com X- α -GAL e aureobasidina, foram repicadas para placas contendo meio SD sem leucina, triptofano, adenina e histidina (SD -L-W-A-H) (Clontech) suplementado com X- α -GAL e aureobasidina. As colónias que apresentavam crescimento e coloração azul neste novo meio foram analisadas posteriormente para identificação das proteínas que, potencialmente, interagem com SnRK1.1.

O isolamento dos plasmídeos contendo a CDS das proteínas que, potencialmente, interagem com SnRK1.1 foi efetuado utilizando o método *smash and grab* (Hoffman and Winston, 1987). A amplificação da cDNA inserido em cada dos plasmídeos isolados for efetuada por PCR com os *primers Matchmaker* 3' AD e 5' AD (Tabela 2.1) utilizando a polimerase One TAQ DNA polimerase (NEB - New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante, num volume final de reação de 40 µL, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, seguidos de 68 °C durante 4 min. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose (0.7%). A sequência de alguns dos fragmentos obtidos, selecionados com base na sua diversidade de tamanhos, foi obtida por sequenciação do produto da reação de PCR.

Nome do <i>primer</i>	Sequência de nucleótidos
Clonagem em pGADT7	
PPR EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGAGAATCTGACGACGGCGCAA
PPR BamHI Rev	TTTGGATCCCTAAGGTACAGTTTTCTGATTCTT
TLP EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGAGACCCTTCTCTCCCCTCGT
TLP BamHI Rev	TTTGGATCCTTACTTCTGAGACATAAGCAAA
PRR1 ClaI Fw	AAAATCGATACATGGGAGAGAGCAAACGCACCG
PRR1 XhoI Rev	TTTCTCGAGTCAGAGGAACATTCTTAAGTAAT
PRR2 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGAAAGAGACTAATTTTGGCGA
PRR2 XhoI Rev	TTTCTCGAGTTATACGAAAATTTTCAAATATT
At1g13640 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGCAATGGCGGTGTTTAAGGC
At1g13640 ClaI Ver	TTTATCGATTCAAACTTGCACGATGTACCAA
At1G26270 SmaI Fw	AAACCCGGGAATGTCACGTAAGCTTGACAGTCC
At1G26270 XhoI Rev	TTTCTCGAGTCAAACTGACAAGAAGTCCCCA
S15N1 ClaI Fw	AAATCGATAAATGGCGCTTCATCTCGCCAGAC
S15N1 XhoI Rev	TTTCTCGAGTTAGCACTTGTAAATCCGGGTTG
At1g80620 ClaI Fw	AAAATCGATACATGGCGCTTCATCTCGCCAGAC
At1g80620 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAAACTTGTAAATCCGGGTTGT
TRP1 SmaI Fw	AAACCCGGGAATGGTGTGCGCATAAGTGTGTAGA
TRP1 XhoI Rev	TTTCTCGAGTTAGAGAAGTAACAGACCCTCTG
TRP2 ClaI Fw	AAAATCGATACATGGTGTACATAAAGTCTTAG
TRP2 BamHI Rev	TTTGGATCCTTAGAGAGCCTCTACCTGAGTGG
PTF1 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGAATATCGTCTCTTGAAAGATG
PTF1 XhoI Rev	TTTCTCGAGTCACATATGGTGTCACTTCCTC
MARD1 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGCTTAGAAACAAACCTAGAGC
MARD1 BamHI Rev	TTTGGATCCCTAGGTCTCCATTTGATCAAGAA
DUF581 EcoRI Fw	AAAGAATTCGCCATGGAGACCAAGAGCACCGA
MARD1 dDUF BamHI Rev	TTTGGATCCTGGTTGGGGTAAAGGAACAGAGC
MAPK1 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGGCGACTTTGGTTGATCCT
MAPK1 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAGAGCTCAGTGTAAAGGT
MAPK2 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGGCGACTCCTGTTGATCCA
MAPK2 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAAACTCAGAGACCTCATTG

MAPK3 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGAACACCGGCGGTGGCCAATA
MAPK3 BamHI Rev	TTTGGATCCCTAACCGTATGTTGGATTGAGTG
MAPK4 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGTCTGGCGGAGAGTTGTTTC
MAPK4 BamHI Rev	TTTGGATCCTCACACTGAGTCTTGAGGATTG
MAPK6 BamHI Fw	TTTGGATCCATATGGACGGTGGTTCAGGTCA
MAPK6 Sall Rev	TTTGTTCGACCTATTGCTGATATTCTGGATTG
MAPK9 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGGATCCTCATAAAAAGGTTG
MAPK9 Sall Rev	TTTGTTCGACTCAAGTGTGGAGAGCCGCGA
MAPK12 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGTCTGGAGAATCAAGCTCT
MAPK12 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAGTGGTCAGGATTGAATTTG
MAPK18 EcoRI Fw	TTTGAATTCATGCAACAAAATCAAGTGAAGA
MAPK18 BamHI Rev	TTTGGATCCCTATGATGCTGCGCTGTAAC
RAPTOR1B EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGCATTAGGAGACTTAATGGT
RAPTOR1B Sall Rev	TTTGTTCGACTCATCTTGCTTGCAGTTGTTCG
NDF4 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGGAAGTGTACAGTTGAGTGGT
NDF4 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAAGTAGAAGTTTCGAGATCAT
GAI EcoRI Fw	AAAGAATTCATGAAGAGAGATCATCATCA
GAI BamHI Rev	TTTGGATCCCTAATTGGTGGAGAGTTTCCAAG
RGA1 NdeI Fw	AAACATATGAAGAGAGATCATCACCAAT
RGA1 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAGTACGCCGCGTTCGAGAGTT
RGL1 BamHI Fw	TTTGGATCCATATGAAGAGAGAGCACAACCAC
RGL1 Sall Rev	TTTGTTCGACTTATTCCACACGATTGATTTCG
SnRK2.2 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGATCCGCGACTAATTCAC
SnRK 2.2 Sall XhoI Rev	TTTCTCGAGTTCGACTCAGAGAGCATAAACTATCTCT
SnRK 2.3 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGATCGAGCTCCGGTGACCAC
SnRK 2.3 Sall XhoI Rev	TTTCTCGAGTTCGACTTAGAGAGCGTAACTATCT
abf2 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGGATGGTAGTATGAATTTGG
abf2 Sall XhoI Rev	TTTCTCGAGTTCGACTCACCAAGGTCCCGACTCTGTC
Clonagem em pGBKT7	
SnRK1.1 EcoRI Fw	AAAGAATTCATGTTCAAACGAGTAGATGAG
SnRK1.1 BamHI Rev	TTTGGATCCTCAGAGGACTCGGAGCTGAGC
Clonagem em pBRIDGE	
MARD1 NotI Fw	AAAGCGGCCGCAATGCTTAGAAACAAACCTAGAG
MARD1 BglII Rev	TTTAGATCTCTAGGTCTCCATTTGATCAAGAA
NDF4 NotI Fw	AAAGCGGCCGCAATGGGAAGTGTACAGTTGAGTG
NDF4 BglII Rev	TTTAGATCTTCAAGTAGAAGTTTCGAGATCAT
Amplificação do cDNA	
Matchmaker 5' AD	AAATATTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACCCA
Matchmaker 3' AD	TTTAGTGAACCTTGCAGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT

Tabela 2.1- Primers utilizados para a amplificação das sequências dos genes a serem clonados.

Encontram-se listados os primers *Forward* (FW) e *Reverse* (Rev) para cada gene amplificado. O nome do primer contém o nome do gene que permite amplificar, seguido da enzima de restrição que foi utilizada para a clonagem no respectivo plasmídeo.

2.2 Construção de plasmídeos

2.2.1 Interações binárias

Para analisar a possível interação entre SnRK1.1 e proteínas específicas foi utilizado o método de dois híbridos em levedura (Y2H, *Yeast two Hybrid*). A construção, em pGBKT7, apresentando a sequência codificante (CDS) de SnRK1.1 ligada ao BD de GAL4 foi a mesma que foi utilizada no rastreamento de Y2H.

As construções, com a CDS dos possíveis interatores de SnRK1.1 ligada ao domínio de ativação (AD, *Activation Domain*) de GAL4 foram obtidas por clonagem em pGADT7. Para tal, as diferentes CDS foram amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos (Tabela 2.1) e cDNA obtido por transcrição reversa de RNA extraído de folhas de *Arabidopsis*, como anteriormente descrito (Rodrigues et al., 2013). O PCR foi efetuado utilizando a DNA polimerase *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, num volume final de 50 µL, efetuando 35 ciclos, com uma temperatura de emparelhamento de 55 °C e um tempo de extensão de 30 segundos por cada mil pares de bases. Após confirmação da amplificação por análise de 5 µL do produto da reação por eletroforese em gel de agarose, o restante produto de reação foi purificado através de uma extração fenol/clorofórmio (Sambrook and Russell, 2001) e digerido com as respectivas enzimas de restrição. O plasmídeo, pGADT7 (1 µg) foi digerido com as mesmas enzimas. As reações de restrições foram efetuadas num volume final de 15 µL de acordo com as instruções do fabricante das enzimas de restrição utilizadas (NEB - New England Biolabs). Os produtos de digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) e a banda de interesse excisada do gel com uma lâmina de bisturi. A extração do DNA desses fragmentos de agarose foi realizada utilizando o kit "*QIAquick Gel Extraction*" (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante, exceto a eluição do DNA que foi efetuada com 10 µL de água no caso dos fragmentos de DNA a clonar e 20 µL de água para a eluição dos vetores digeridos. Procedeu-se à ligação dos fragmentos a clonar ao vetor pGADT7 digerido utilizando T4 DNA ligase (NEB) de acordo com as instruções do fabricante, num volume final de reação de 15 µL, utilizando 1 µL do produto de eluição dos fragmentos de DNA e de pGADT7 digeridos com as respectivas enzimas de restrição. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente durante 3 horas. Metade do produto da reação de ligação (7.5 µL) foi utilizada para transformar células de *E. coli* (estirpe TOP10 ou DH5α) por choque térmico (Sambrook and Russell, 2001).

Após a transformação, as células foram espalhadas em meio LB sólido com antibiótico (ampicilina 100 mg/L). Após incubação durante 12 a 16 horas a 37 °C algumas colônias foram transferidas para meio LB líquido com antibiótico e deixadas a incubar a 37°C, durante o mesmo período de tempo. Os plasmídeos foram extraídos com auxílio do kit “ZR Plasmid Miniprep-Classico” (ZYMO RESEARCH). A correta ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foi avaliada através da digestão dos plasmídeos, com as mesmas enzimas de restrição com as quais tinham sido digeridos antes da reação de ligação, seguida de análise dos fragmentos obtidos por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos em que o padrão de bandas obtido correspondia ao esperado foram guardados para posterior transformação das células de levedura.

2.2.2 Interações envolvendo complexos proteicos ternários

A possível interação de SnRK1.1 com proteínas DELLA e MAPKs dependente da presença de NDF4 e MARD1 respectivamente, foi efetuada utilizando um sistema de três híbridos. As proteínas DELLA e MAPKs foram clonadas em pGADT7 como descrito anteriormente. SnRK1.1 e/ou NDF4 e MARD1 foram clonadas no vetor pBRIDGE, que permite a expressão simultânea em levedura de duas proteínas. A CDS de NDF4 e MARD1 foram clonadas no MCSII de pBRIDGE de forma similar à descrita anteriormente. Os vetores assim obtidos foram utilizados para a clonagem de SnRK1.1 ligado ao BD de GAL4, obtendo-se um vetor que permitia a expressão simultânea em levedura de BD-SnRK1.1 e NDF4 ou MARD1.

2.3 Dois/três híbridos em levedura

A co-transformação das leveduras (estirpe AH109) foi efetuada pelo método do acetato de lítio (Gietz et al., 1997) com algumas alterações. A 50 µL de suspensão de leveduras competentes foi adicionado 1 µg de cada um dos plasmídeos (pGADT7 e pGBKT7 ou pBRIDGE) com as construções correspondentes às proteínas de que se pretendia testar a interação. De seguida, adicionou-se 750 µL de uma solução PEG-LI-TE (40% PEG 4000, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.1 M acetato de lítio). Depois de uma incubação a 30 °C, durante 30 minutos, foi aplicado um choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Após centrifugação, 5 minutos a 2000 g, eliminou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 100 µL de água, e espalhadas em placas contendo meio SD sem leucina e triptofano (SD -L-W) (Clontech). As placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias, e três colônias

escolhidas ao acaso foram utilizadas para inocular 2 ml de meio líquido SD -L-W e incubadas a 30°C até a cultura se encontrar saturada (2 dias).

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sólido SD sem leucina, triptofano, adenina e histidina (SD -L-W-A-H) (Clontech). Foram utilizados 3 µL de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controlo, foi igualmente verificado o crescimento em meio SD -L-W.

2.4 Ensaios da atividade da PP2CA, *in vitro*

A produção de His-PP2CA e His-PYL4 foi efetuada como descrito anteriormente (Antoni et al., 2012a). A atividade fosfatase da PP2CA foi medida utilizando o péptido RRA(phosphoT)VA como substrato, como descrito anteriormente (Antoni et al., 2012a). De forma resumida, os ensaios foram efetuados num volume de 100 µL, contendo 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 25 mM péptido (substrato) e 0.5 mM PP2C. Quando indicado foi adicionado His-PYL4 (2 mM concentração final) e ABA e/ou AMP ou ADP nas concentrações finais indicadas. A reação foi incubada durante 1 hora a 30 °C.

2.5 Análise da expressão de genes

A análise da expressão dos genes marcadores da resposta a ABA foi efetuada como descrito anteriormente (Rodrigues et al, 2013). Foram utilizadas plantas WT e plantas gentilmente cedidas por Elena Baena Gonzalez, mutantes KO SnRK1.1 em que a expressão de SnRK1.2 é inibida pela expressão induzida por estradiol de um miRNA específico (por uma questão de simplicidade estas plantas serão designadas por duplos mutantes SnRK1.1/2)

Folhas completamente desenvolvidas de plantas WT e dos duplos mutantes SnRK1.1/2 com 5 semanas foram cortadas e em colocadas em placas de Petri contendo água estéril, contendo ou não ABA numa concentração de 100 µM e incubadas à luz (100 µE) durante 3 horas.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies), tratado com DNase, RNase-Free (Promega). A transcrição reversa (1.5 µg de RNA total) foi efetuada utilizando a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies), num volume final de 10µl. Após a reação foram adicionados 30 µl de

água MiliQ a cada reação, obtendo assim um volume final de 40µl, dos quais usados 1.5 µl em cada uma das reações de qRT-PCR.

A análise por qRT-PCR foi efetuada utilizando o marcador fluorescente Eva-Green (Biotium), num aparelho 7900HT fast real-time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão dos genes foi efetuada pelo método de comparação de CT (Livak and Schmittgen, 2001). A normalização dos níveis de expressão dos genes foi efetuada utilizando os valores de CT obtidos para o gene β -actina 8. A sequência dos primers utilizados foi a seguinte: para RAB18 - ATGGCGTCTTACCAGAACCGT e CCAGATCCGGAGCGGTGAAGC; para RD29A - GGAAGTGAAAGGAGGAGGAGGAA e CACCACCAAACCAGCCAGATG; para RD29B - ATGGAGTCACAGTTGACACGTCC e GAGATAGTCATCTTCACCACCAGG; e para β -actina 8 - AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT e GAGGATAGCATGTGGAAGTG AGAA.

Resultados

3 Resultados

3.1 Identificação de proteínas que interagem com SnRK1.1

Apesar da importância de SnRK1 na resposta a situação de stress, em particular stress energético, o conhecimento sobre as vias de sinalização envolvidos é bastante escasso. Para identificar algumas das proteínas que interagem com SnRK1.1, e assim contribuir para a identificação de alguns dos componentes moleculares envolvidos, foi efetuado um rastreio de dois híbridos em levedura. A eficiência de *mating* foi de 6.1%, valor aproximado ao referido pelo protocolo do fabricante do kit utilizado para efetuar o rastreio (2 a 5%). O número de clones diploides obtido foi igual a 8.5×10^6 , um valor superior ao mínimo geralmente recomendado neste tipo de rastreios (um milhão). Dos 917 clones que apresentavam crescimento e coloração azul em meio contendo X- α -Gal e sem adenina e histidina, foram selecionadas aleatoriamente 71 para posterior análise. Os restantes foram repicados para meio líquido e, após adição de glicerol (concentração final 20%), guardados a -80 °C.

A análise dos 71 clones selecionados permitiu a identificação de 32 proteínas diferentes, que potencialmente interagem com a subunidade catalítica de SnRK1. As proteínas identificadas e o número de clones que codificavam cada uma delas encontra-se referido na Tabela 3.1. Destas proteínas, 5 foram anteriormente descritas como interagindo com SnRK1.1: SnRK1 β 2 e 4 proteínas que apresentam um domínio DUF 581 (*Domain of Unknown Function 581*) (Ramon et al., 2013; Nietzsche et al., 2014), o que sugere que o rastreio efetuado teve a capacidade de identificar proteínas que interagem realmente com SnRK1.1.

A análise das categorias funcionais em que se incluem as proteínas identificadas, utilizando a base de dados FUNCAT (Ruepp et al., 2004), permite verificar que um número significativo destas está envolvido no metabolismo, principalmente de açúcares e ácidos gordos, em mecanismos de resposta a stress e em processos de regulação (Tabela 7.1, Anexo).

Como referido, 4 das proteínas identificadas como interagindo potencialmente com SnRK1 apresentam um domínio de função desconhecida (DUF581) em comum: DUF581-10 (AT3G22550), DUF581-12 (AT4G17670), DUF581-16 (AT5G47060) e MARD1/DUF581-19 (AT3G63210). Dado que MARD1 foi descrita anteriormente como

estando envolvida na via de sinalização de ABA (He and Gan, 2004a) e que não se conhece a função das restantes, a análise posterior destas proteínas foi efetuada utilizando MARD1 como modelo.

AGI	Descrição do gene	Nº Clones
At1g13640	Proteína da família Phosphatidylinositol 3- e 4-kinase	5
At1g15810	S15/NS1, Proteína de ligação ao RNA	1
At1g19900	Proteína relacionada com a Glyoxal oxidase	2
At1g22640	MYB3 - myb domain protein 3	1
At1g32100	PRR1 - Pinoresinol reductase	10
At1g54780	TLP18.3 - Thylakoid lumen 18.3 kDa protein	1
At1g73760	Proteína da superfamília RING/U-box	1
At2g12462	Desconhecida	1
At2g39000	Proteína da superfamília Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT)	1
At2g40640	Proteína da superfamília RING/U-box	1
At3g03980	Proteína da superfamília NAD(P)-binding Rossmann-fold	1
At3g09300	ORP3B - oxysterol binding protein related protein 3B	1
At3g16250	NDF4 - NDH-dependent cyclic electron flow 1	1
At3g16670	Proteína da família Pollen Ole e 1 allergen	1
At3g22550	Desconhecida (contem domínio DUF581)	1
At3g29160	SnRK1.2	1
At3g52960	Proteína da superfamília Thioredoxin	2
At3g63210	MARD1 (contem domínio DUF581)	1
At4g14190	Proteína da família PPR - Pentatricopeptide repeat	2
At4g16360	AKIN β 2- Subunidade beta-2 de SnRK1	2
At4g17670	Desconhecida (contem domínio DUF581)	8
At4g22740	Proteína rica em glicina	5
At4g23885	Desconhecida	1
At4g24510	CER2, VC2, VC-2, família HXXXD-type acyl-transferase	1
At4g25100	FSD1 - Fe superoxide dismutase 1	1
At5g05100	Proteína R3H de ligação a ácidos nucleicos de cadeia simples	1
At5g11460	Desconhecida (DUF581)	1
At5g25280	Relacionada com proteínas ricas em serina	1
At5g35620	EIF(ISO)4E - Eukaryotic initiation factor (iso)4E	2
At5g47060	Desconhecida (contem domínio DUF581)	11
At5g59430	TRP1 - telomeric repeat binding protein	1
At5g63130	Proteína da família Octicosapeptide/Phox/Bem1p	1

Tabela 3.1- Proteínas que potencialmente interagem com SnRK1.1.

Foram identificadas 32 proteínas que mostraram interação com SnRK1.1, pelo rastreio de dois híbridos em levedura.

Um estudo recente mostrou, igualmente por Y2H, que das 19 proteínas codificadas pelo genoma de *Arabidopsis* que apresentam este domínio, 15 interagem com SnRK1.1 (Nietzsche et al., 2014), incluindo as 4 proteínas que apresentam este domínio identificadas neste rastreio. Tem sido sugerido que o DUF581 pode estar envolvido no estabelecimento de relações proteína-proteína, nomeadamente entre SnRK1.1 e outras proteínas (Jamsheer and Laxmi, 2014a; Nietzsche et al., 2014). Através de um rastreio em larga escala (Arabidopsis Interactome Mapping, 2011) foi verificado recentemente que MARD1 interage com MAPK3 e RAPTOR1B e que DUF581-10 interage igualmente com RAPTOR1B. Assim, decidiu-se analisar a importância do domínio DUF581 na interação de MARD1 com SnRK1.1 e a possibilidade dessa proteína poder mediar a interação entre SnRK1.1 e as MAPKs e RAPTOR1B.

Os resultados dos ensaios de Y2H, utilizando versões truncadas de MARD1, MARD1- Δ DUF581 (aa 1-210) e DUF581 (aa 211-263), mostram que o domínio DUF581 não é essencial para que ocorra interação. No entanto, a interação com a proteína completa foi mais forte do que com qualquer das versões truncadas (Figura 3.1).

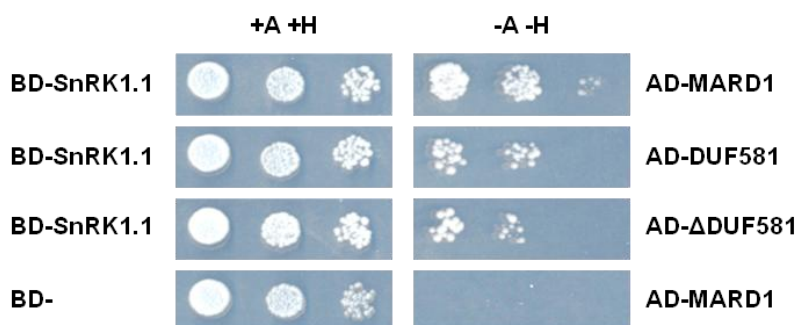


Figura 3.1- Interação entre SnRK1.1 e MARD1 e as deleções Δ DUF581 (aa 1-210) e DUF581 (aa 211-263).

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sem leucina, triptofano, adenina e histidina (-A-H). Foram utilizados 3 μ L de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controlo, foi igualmente verificado o crescimento em meio sem leucina e triptofano mas contendo adenina e histidina (+A+H).

O genoma de *Arabidopsis* codifica 20 MAPKs, classificadas em 4 grupos (A a D) (Ichimura et al., 2002). Para minimizar o número de interações a testar, decidiu-se testar a interação entre SnRK1.1/MARD1 e 2 das MAPKs de cada um dos grupos. Quando expressas simultaneamente com MARD1, as MAPK3 e MAPK6, pertencentes ao grupo A, as MAPK1 e MAPK2, pertencentes ao grupo C e a MAPK4, incluída no grupo B, interagem com SnRK1.1, o mesmo não se verificando com a MAPK12, igualmente incluída no grupo B, e com as MAPK9 e MAPK18, incluídas no grupo D (Figura 3.2). No entanto, na ausência de MARD1, não foi detetada qualquer interação por Y2H entre SnRK1.1 e qualquer uma das MAPKs testadas (Figura 3.2).

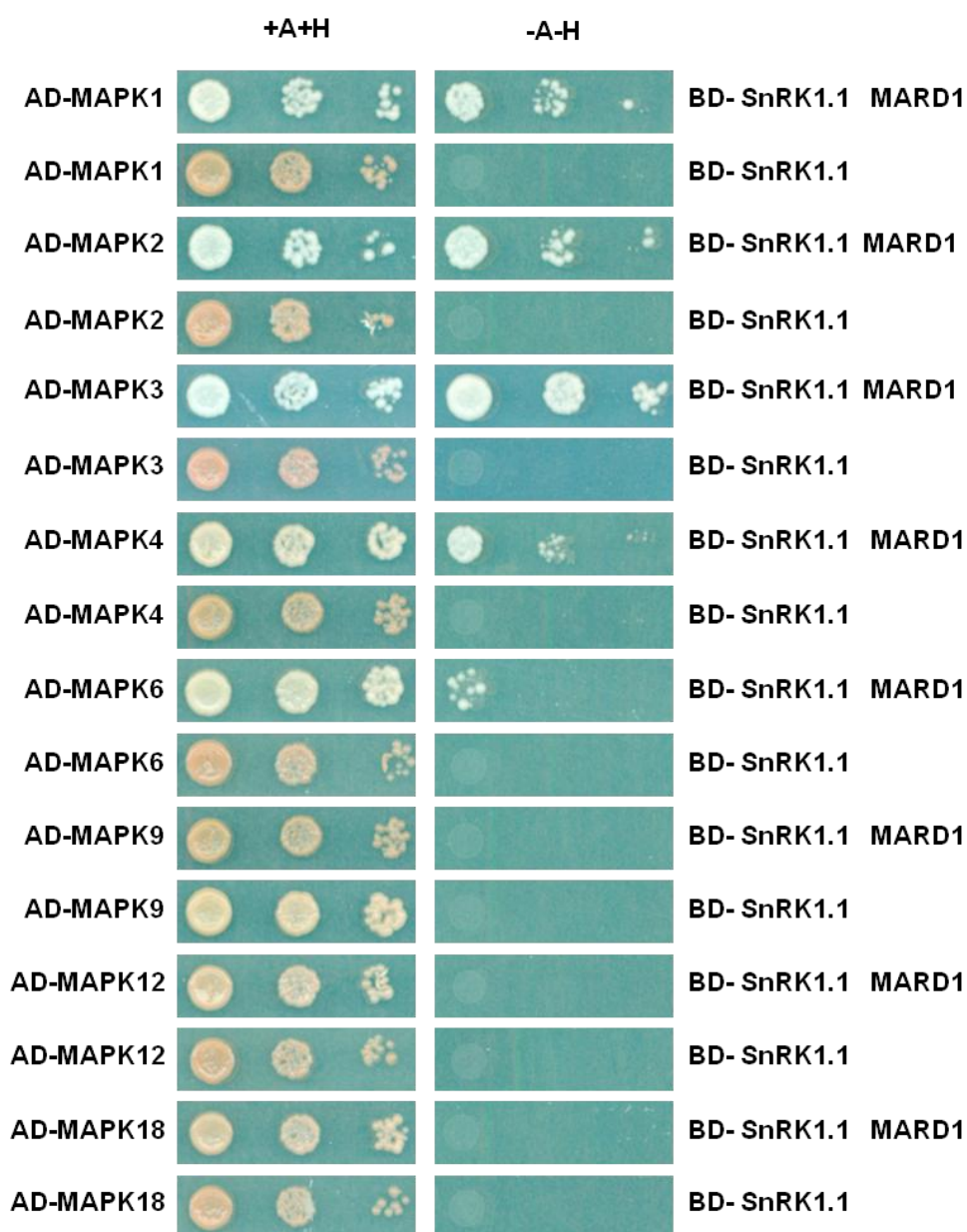


Figura 3.2- Interação entre as diferentes MAPKs e SnRK1.1 na presença e ausência de MARD1.

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sem leucina, triptofano, adenina e histidina (-A-H). Foram utilizados 3 μ L de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controle, foi igualmente verificado o crescimento em meio sem leucina e triptofano mas contendo adenina e histidina (+A+H).

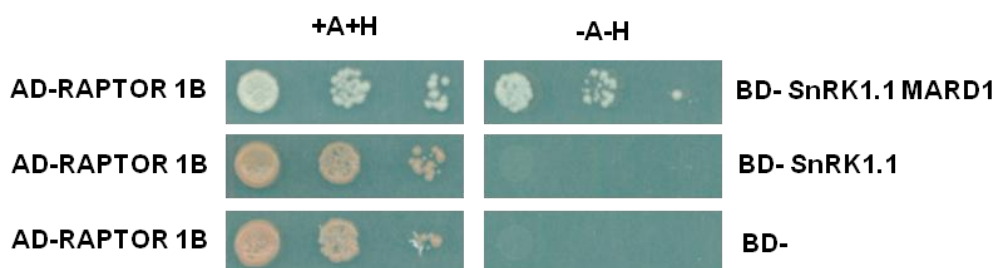


Figura 3.3- Interação entre RAPTOR 1B e SnRK1.1 na presença e ausência de MARD1.

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sem leucina, triptofano, adenina e histidina (-A-H). Foram utilizados 3 μ L de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controle, foi igualmente verificado o crescimento em meio sem leucina e triptofano mas contendo adenina e histidina (+A+H).

Os ensaios realizados mostram que MARD1 é igualmente essencial para a interação entre SnRK1.1 e RAPTOR1B, no sistema de Y2H (Figura 3.3).

Foram efetuados controlos dos ensaios de dois híbridos em levedura, sendo todos eles negativos, isto é nenhuma das construções AD-proteína ou BD-proteína utilizadas ativava os marcadores ADE e HIS (Figura 7.1 e Figura 7.2, Anexos).

Outra das proteínas identificada como potencialmente interagindo com SnRK1.1 foi NDF4 (NDH-dependent cyclic electron flow mutants), uma das subunidades do complexo NADPH desidrogenase, que está localizado na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (Takabayashi et al., 2009). No rastreio em larga escala, anteriormente referido (Arabidopsis Interactome Mapping, 2011), foi identificada a interação entre NDF4 e RGA1 (*Repressor of GA1-3*) e GAI/RGA2 (*Gibberellic Acid Insensitive*), duas proteínas DELLA, componentes essenciais da via de sinalização das giberelinas. Plantas que sobre-expressam SnRK1.1 apresentam o caule menos alongado e florescem mais tarde do que as plantas silvestres (Baena-Gonzalez et al., 2007b), o que pode sugerir insensibilidade a giberelinas e, portanto, a existência de interligação entre a via de sinalização dessa hormona vegetal e SnRK1. Neste contexto, foi analisada, pelo sistema de Y2H, a possível interação entre SnRK1.1 e as proteínas DELLA e se essa interação é ou não mediada por NDF4.

A interação, em Y2H, entre SnRK1.1 e RGA1 foi observada, independentemente de se expressar ou não simultaneamente NDF4. Contudo, na presença de NDF4 o crescimento das leveduras em meio seletivo é maior, sugerindo uma interação mais forte. Enquanto para GAI, a interação com NDF4 só foi observada na presença de NDF4 (Figura 3.4). O genoma de *Arabidopsis* codifica 3 outras proteínas DELLA RGL1/2/3 (RGA Like 1/2/3). Destas 3 proteínas a que apresenta menor semelhança com RGA e GAI em termos da sequência de aminoácidos é RGL1, pelo que foi também testada a interação entre esta proteína e SnRK1.1. Neste caso, foi observado a interação, tanto na presença como na ausência de NDF4, tal como RGA1 (Figura 3.4).

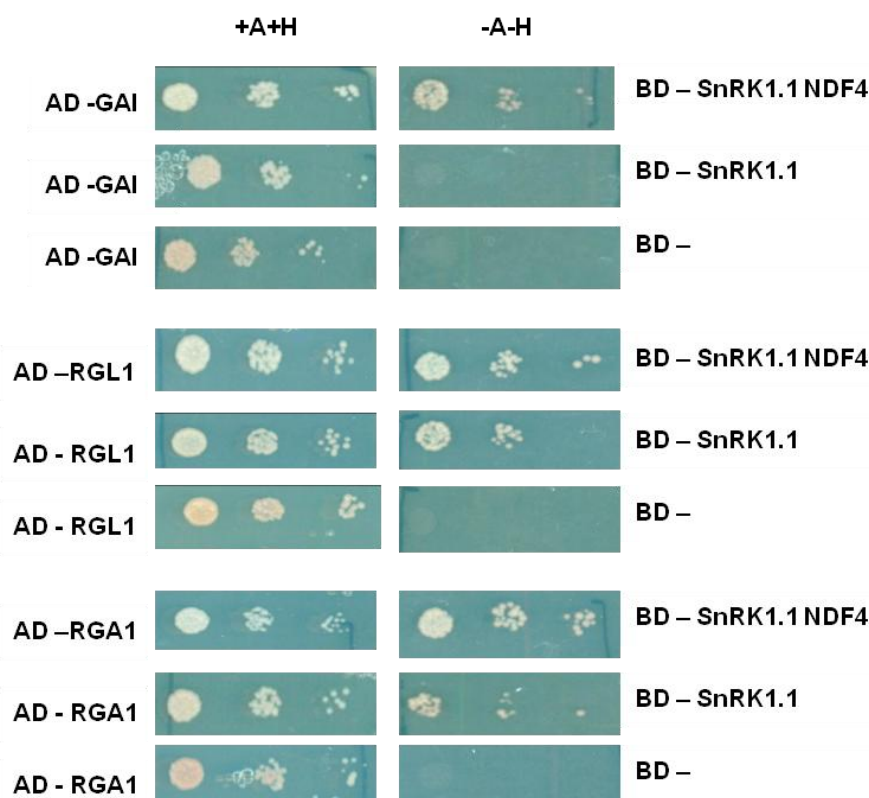


Figura 3.4- Interação entre as diferentes proteínas DELLA testadas e SnRK1.1 na presença e ausência de NDF4.

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sem leucina, triptofano, adenina e histidina (-A-H). Foram utilizados 3 μ L de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controle, foi igualmente verificado o crescimento em meio sem leucina e triptofano mas contendo adenina e histidina (+A+H).

3.2 Interligação entre a via de sinalização de energia e ácido abscísico

A inibição da atividade de SnRK1.1 por PP2CA e ABI1 foi evidenciada recentemente, sugerindo que as fosfatases do tipo 2C do grupo A podem ter um papel importante nas vias de sinalização de stress energético. Para analisar um possível efeito direto do estado energético da célula na atividade dessas fosfatases, foi avaliada a influência da presença de AMP e ADP na atividade de PP2CA. A análise do efeito do ATP e glucose-6-P não foi possível devido ao elevado *background* obtido na ausência da fosfatase. Os resultados obtidos indicam que tanto o AMP como o ADP inibem a atividade de PP2CA, sendo que o ADP tem um efeito inibitório ligeiramente maior (Figura 3.5) não sendo contudo a diferença estatisticamente significativa.

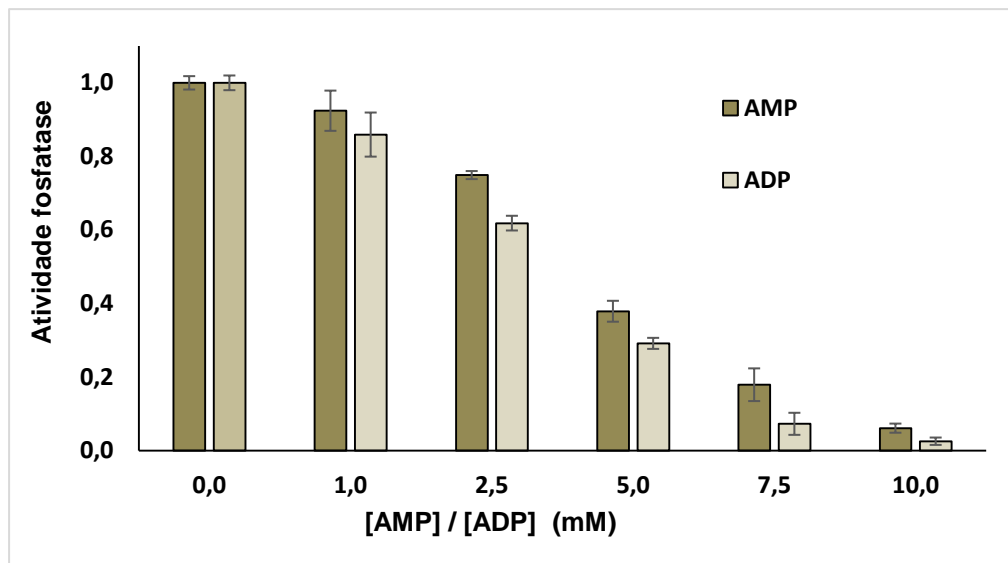


Figura 3.5- Atividade da PP2CA na presença de AMP e ADP.

A atividade relativa da PP2CA (atividade na ausência de AMP e ADP =1) na presença de concentrações crescentes de AMP e ADP. A atividade foi medida usando como substrato o péptido RRA(phosphoT)VA. Os valores representam a média \pm Desvio Padrão (n=3).

Para analisar, mais em detalhe, a possível interligação entre as vias de sinalização de energia e ácido abscísico analisou-se a possível interação, utilizando o sistema de Y2H, entre SnRK1.1 e as SnRK2, componentes chave da via de sinalização de ABA. Em levedura SnRK1.1 interage com SnRK2.3, mas não com SnRK2.2 ou com OST1 (Figura 3.6).

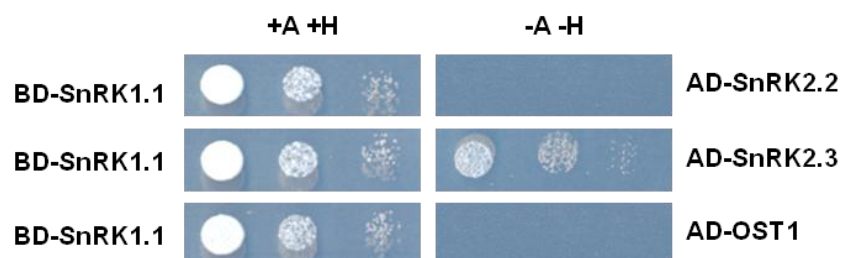


Figura 3.6- Interação entre SnRK1.1 e as diferentes SnRK2.

A interação foi determinada pelo crescimento em meio sem leucina, triptofano, adenina e histidina (-A-H). Foram utilizados 3 μ L de diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada uma das culturas saturadas. Como controlo, foi igualmente verificado o crescimento em meio sem leucina e triptofano mas contendo adenina e histidina (+A+H).

Dado que em levedura SnRK1.1 interage com SnRK2.3, pode especular-se que SnRK1 tem um papel relevante na fosforilação e ativação das SnRK2. Para analisar este aspeto foi avaliado a expressão de três genes marcadores da resposta a ABA (RD29A, RD29B e RD22), em plantas silvestres comparativamente a plantas em que a expressão SnRK1.1 e SnRK1.2 tinha sido silenciada por estradiol. Como esperado, a expressão dos genes referidos é fortemente induzida por ABA, mas curiosamente essa indução é maior nas plantas silvestres (Figura 3.7) sugerindo que SnRK1 pode ter um papel na ativação por fosforilação das SnRK2.

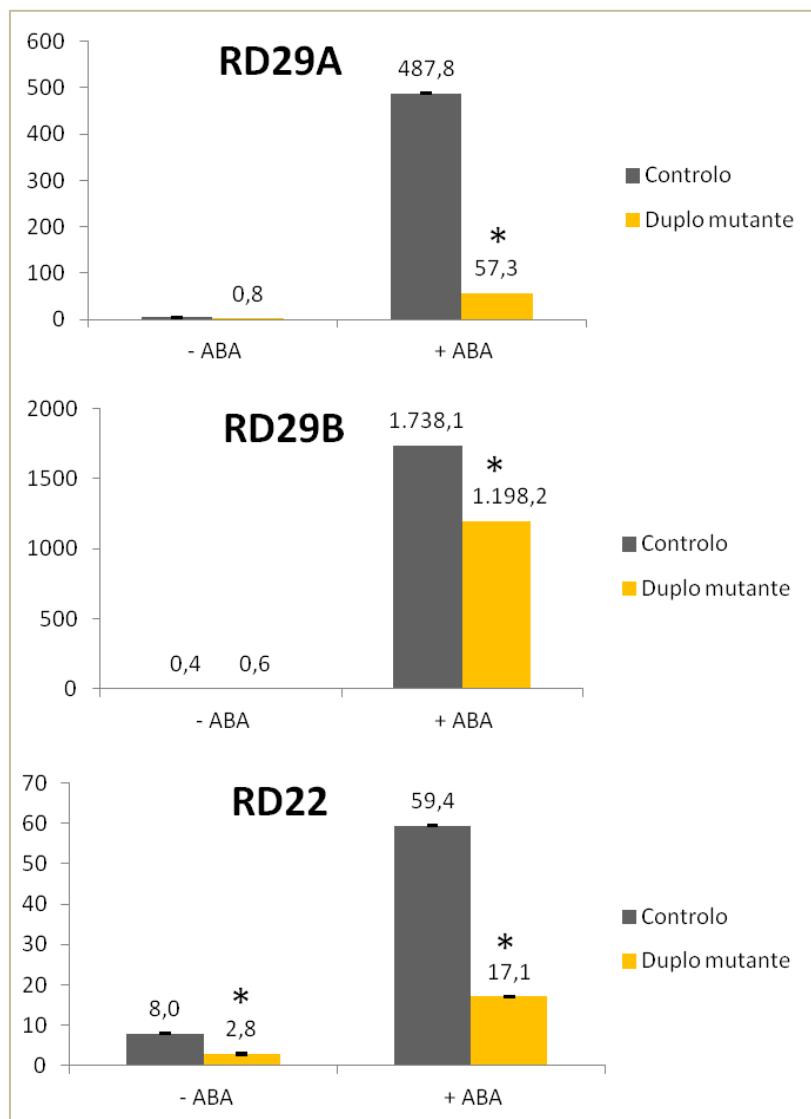


Figura 3.7- Expressão Relativa de RD29A, RD29B e RD22 na presença e ausência de ABA. Foi testado uma situação controlo, onde todos os genes estão expressos normalmente (cinzento) e num duplo mutante em que a expressão de SNRK1.1 e SNRK1.2 é bloqueada através da presença de um micro-RNA induzido por estradiol. A expressão relativa foi obtida através da fórmula $2^{-\Delta CT}$ e o gráfico representa estes valores \pm desvio padrão (n=3). * P<0,05 representam diferenças estatisticamente significativas, em relação ao controlo, P<0,05 (Teste T de student).

Discussão e Conclusão

4 Discussão e conclusão

4.1 Identificação de proteínas que interagem com SnRK1.1

As proteínas quinase SnRK1 são sensores metabólicos que são ativados em resposta a situações de stress e, em particular, em situações de déficit energético. A sua ativação desencadeia uma reprogramação transcriptômica e metabólica globais, através nomeadamente da regulação negativa de processos biossintéticos e da ativação de reações catabólicas, que reestabelecem a homeostase energética permitindo, assim, a tolerância a essas situações de stress. Apesar da importância das SnRK1 na resposta ao stress em plantas, os mecanismos e os componentes moleculares envolvidos são pouco conhecidos.

Neste estudo, através de um rastreio em Y2H, foram identificadas 32 proteínas que potencialmente interagem com SnRK1.1. De salientar que, por limitações de tempo, neste trabalho apenas foram analisados cerca de 10% dos clones obtidos e que, portanto, uma análise de um número mais elevados de clones poderá permitir a identificação de um número bastante maior de potenciais interatores de SnRK1.1, evidenciando assim a importância de abordagens deste tipo para um melhor conhecimento das vias de sinalização de SnRK1.

A análise das categorias funcionais em que essas proteínas são incluídas mostrou que um número significativo das proteínas identificadas estão envolvidas em processos metabólicos, principalmente de açúcares e ácidos gordos, refletindo provavelmente o importante papel de SnRK1 na ativação de processos metabólicos para o referido restabelecimento da homeostasia energética em situações de stress (Crozet et al., 2014b).

Uma das proteínas identificadas neste rastreio como potencialmente interagindo com SnRK1.1 foi MARD1 (MEDIATOR OF ABA-REGULATED DORMANCY 1). MARD1 está incluída numa família de 19 proteínas que contêm um domínio de função desconhecida DUF581, das quais outras 3 foram igualmente identificadas neste rastreio como potenciais interatores de SnRK1.1 (AT3G22550, AT4G17670, AT5G47060), o que coincide com observações anteriores em que essa interação foi igualmente observada (Jamsheer and Laxmi, 2014b; Nietzsche et al., 2014). Curiosamente, no caso de MARD1, os resultados dos ensaios de Y2H utilizando versões truncadas, MARD1- Δ DUF581 (aa 1-210) e DUF581 (aa 211-263), mostram que, apesar de a interação ser mais forte com a proteína completa, o domínio DUF581 não é essencial para que ocorra interação, o que não está de acordo com

resultados anteriormente descritos com outras proteínas da família DUF581 em que esse domínio era essencial para a interação (Jamsheer and Laxmi, 2014b), o que pode indicar que os mecanismos de interação de SnRK1 com as proteínas dessa família podem ser mais diversos do que inicialmente sugerido.

Foi sugerido que as proteínas que contêm um domínio DUF581 podem mediar a interação entre SnRK1.1 e outras proteínas (Jamsheer and Laxmi, 2014b; Nietzsche et al., 2014). Os resultados obtidos neste estudo mostram que MARD1 não só interage com SnRK1.1 como medeia a interação entre SnRK1.1 e RAPTOR1B e algumas das MAPKs.

RAPTOR1B é um dos componentes putativos do complexo TOR de *Arabidopsis* (Anderson et al., 2005). Este complexo que está presente em leveduras, animais e plantas, integra a sinalização de nutrientes e energia para promover a proliferação celular e o crescimento (Xiong and Sheen, 2014). Em animais, MAPK interage e fosforila diretamente RAPTOR1B em dois resíduos conservados de serina e esta fosforilação é essencial para inibição de mTORC1 e para o bloqueio do ciclo celular induzido por stress energético (Gwinn et al., 2008). A interação, mediada por MARD1, entre SnRK1 e RAPTOR1B sugere que este pode ser um dos mecanismos que, também em plantas, permite a integração entre estes dois sistemas de percepção e sinalização de energia.

MARD1 foi anteriormente identificada como um dos componentes envolvidos na resposta a ABA, e mutantes knockout deste gene apresentam insensibilidade a ABA (He and Gan, 2004b). Um número crescente de estudos sugere uma interligação entre a resposta a ABA e a resposta ao déficit de energia regulada por SnRK1 (Bradford et al., 2003; Jossier et al., 2009; Radchuk et al., 2010; Coello et al., 2012), mas os mecanismos moleculares envolvidos são ainda pouco conhecidos. Recentemente, foi identificado o papel de ABI1 e PP2CA, na regulação de SnRK1.1. Estas PP2Cs, componentes essenciais da sinalização de ABA, interagem e inativam SnRK1.1, evidenciando assim uma ligação direta a nível molecular entre as duas vias de sinalização (Rodrigues et al., 2013). O papel de MARD1 na resposta a ABA e sua interação com SnRK1.1 sugerem que esta proteína poderá representar uma nova interligação entre as estas duas vias de sinalização.

As MAPKs estão envolvidas na ativação de mecanismos intracelulares de resposta a múltiplos estímulos externos e internos e, em particular, na resposta a stress biótico e abiótico e na regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento (Rodriguez et al., 2010). Na presença de MARD1, SnRK1.1 interage

com MAPK3 e MAPK6, pertencentes ao grupo A, MAPK1 e MAPK2, pertencentes ao grupo C e MAPK4, incluída no grupo B, o mesmo não se verifica com MAPK12, igualmente incluída no grupo B, e com as MAPK9 e MAPK18, incluídas no grupo D. Esta diversidade de resultados e em particular o facto de, na presença de MARD1, SnRK1.1 interagir com MAPK4 mas não com uma das MAPKs com maior semelhança em termos da sequência de aminoácidos e filogeneticamente mais próxima, MAPK12, sugere que a interação entre SnRK1.1 e algumas MAPKs apresenta elevada especificidade.

A interação de SnRK1 com algumas das MAPKs sugere que pode haver interligação entre as estas duas vias de sinalização, podendo eventualmente constituir um dos processos pelos quais SnRK1 modula a resposta a vários estímulos externos e internos não diretamente relacionados com o estado energético da célula. Por exemplo, um número crescente de estudos sugere que algumas MAPKs têm um papel importante na resposta a ABA (Liu, 2012), nomeadamente na inibição da abertura dos estomas dependente de ABA (Gudesblat et al., 2007) e na regulação da transcrição de genes induzíveis por ABA (Li et al., 2014). Assim, pode especular-se que a interação entre SnRK1.1 e as MAPKs pode constituir uma outra via pela qual SnRK1.1 modula a resposta a ABA.

Este trabalho mostrou também que SnRK1.1 pode interagir com as proteínas DELLA, diretamente ou de uma forma dependente de NDF4. As proteínas DELLA são componentes essenciais da via de sinalização de giberelinas que têm um papel crucial como promotoras do crescimento e desenvolvimento em plantas (Daviere and Achard, 2013). Na presença de giberelinas, estas ligam-se ao recetor GID1, promovendo a sua ligação às proteínas DELLA, e a sua posterior degradação. Um número crescente de observações sugere que a fosforilação das proteínas DELLA contribui para prevenir a sua degradação (Hussain et al., 2007; Dai and Xue, 2010; Hauvermale et al., 2012) A interação observada neste trabalho entre SnRK1.1 e as proteínas DELLA sugere que as proteínas DELLA poderão ser fosforiladas por SnRK1, o que impediria ou diminuiria a sua degradação, interligando assim as vias de sinalização de energia e o controlo do crescimento e desenvolvimentos vegetais, e fornecendo uma explicação molecular para os possíveis processos envolvidos na diminuição do crescimento das plantas em situações de stress, nomeadamente stress energético.

4.2 Interligação entre a via de sinalização de energia e ácido abscísico

Ao contrário do que acontece em mamíferos em que a regulação de AMAPK por AMP e outros adenilatos está bastante bem estabelecida (Oakhill et al., 2012), em plantas o possível papel destes metabolitos na regulação de SnRK1 é praticamente desconhecido (Crozet et al., 2014b). Tendo em conta o papel das PP2Cs na regulação de SnRK1.1, os resultados obtidos neste trabalho, mostrando que AMP e ADP inibem a atividade de PP2CA, poderiam sugerir que esta inibição poderia desempenhar um papel importante na possível regulação de SnRK1 por adenilatos, estabelecendo dessa forma uma outra interligação entre as vias de sinalização de energia e ABA. Contudo, não foi possível determinar qual o efeito da presença de ATP na atividade de PP2CA e o efeito inibitório de AMP apenas assume relevância a concentrações superiores a 1mM, bastante superiores às que se supõe existirem no interior das células vegetais, 150 μ M (Sugden et al., 1999), sugerindo portanto que a inibição observada, não tem relevância biológica.

Os resultados dos ensaios de Y2H mostram que, neste sistema, SnRK1.1 interage com SnRK2.3, mas não com SnRK2.2 ou OST1, indicando que ou essa interação é específica para SnRK2.3 ou que a interação com SnRK2.2 e OST1 é demasiado débil para poder ser detetada nas condições utilizadas no ensaio.

As SnRK2 são outro dos componentes essenciais da via de sinalização de ABA, sendo responsáveis pela ativação da resposta a esta hormona. Ensaios *in vitro* mostraram que pelo menos algumas das SnRK2 envolvidas na sinalização de ABA podem ser ativadas por auto-fosforilação (Cutler et al., 2010). No entanto, a observação de que as SnRK2 são inibidas por staurosporina, mas que esta não bloqueia a ativação por ABA das SnRK2 em protoplastos tratados com este inibidor, levou que fosse sugerida a necessidade de outras quinases para a ativação *in vivo* das SnRK2 (Boudsocq et al., 2004). Neste contexto, os resultados obtidos podem sugerir um papel importante de SnRK1 na regulação da resposta a ABA, através da ativação das SnRK2 e subsequente ativação de fatores de transcrições essenciais à expressão dos genes induzidos por ABA.

Um papel de SnRK1.1 na regulação da resposta a ABA, eventualmente através da ativação das SnRK2, é igualmente sugeridos pelos resultados da análise da expressão de genes de resposta a ABA em plantas em que a expressão de SnRK1 está diminuída. Nestas plantas, a expressão de RD22, RD29A e RD29B, genes marcadores da resposta a ABA é bastante reduzida quando comparada com plantas WT, o que sugere que a expressão destes genes depende de SnRK1.

Os resultados obtidos neste trabalho, ainda que bastante preliminares e necessitando de confirmação, revelam alguns dos componentes moleculares que podem estar envolvidos na via de sinalização de SnRK1. Particularmente interessante é a observação da interação de SnRK1 com RAPTOR1B, que sugere que, tal como em animais, em plantas o complexo TOR pode ser regulado diretamente por SnRK1. Igualmente importante, é a observação de que SnRK1 interage com proteínas chave da via de sinalização de giberelinas e ABA, sugerindo que SnRK1 poderá constituir um interface, ligando a sinalização de giberelinas e ABA, atuando como um sensor molecular responsável pelo papel antagônico destas duas hormonas vegetais.

Perspetivas futura

5 Perspetivas futuras

A forma como as plantas respondem a stress bióticos e/ou abióticos tem sido o foco de muitos estudos, devido às limitações de crescimento que o ambiente externo pode causar. Estas respostas apresentam uma grande complexidade e a interligação entre as várias vias de sinalização envolvidas dificulta a análise dos componentes moleculares envolvidos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a interligação entre a via de sinalização do ácido abscísico e a resposta ao défice de açúcares poderá envolver a ativação das SnRK2 por SnRK1. Os resultados obtidos sugerem também uma interligação entre SnRK1 e a via de sinalização de giberelinas e a via de sinalização das MAPKs. SnRK1 parece, assim, ser o ponto de ligação entre diferentes vias de sinalização.

Será muito interessante confirmar essas interações por outras técnicas *in vitro*, como por exemplo *pull down*, e *in vivo*, por exemplo por co-imunoprecipitação ou complementação de fluorescência biomolecular (BiFC). Será também particularmente importante o estudo da importância fisiológica das interações identificadas, nomeadamente estudando a resposta de mutantes de uma das vias de sinalização aos diferentes tipos de stress e fito-hormonas – por exemplo analisando a resposta a giberelinas de mutantes knockout ou que sobre-expressam SnRK1, e estudando a resposta a condições de stress energético de mutantes afetados na via de sinalização das giberelinas.

Interessante será também estudar estas interações de um ponto de vista bioquímico, analisando nomeadamente se as proteínas identificadas como interagindo com SnRK1.1 são fosforiladas por SnRK1.1, ou alternativamente se SnRK1.1 é regulada por essas proteínas.

Sendo esta proteína, ainda relativamente pouco estudada, muito mais a para se observar e perceber sobre o seu funcionamento e a sua função na regulação do stress abiótico e também biótico nas plantas.

Bibliografia

6 Bibliografía

- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R., and Halford, N.G.** (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8602-8605.
- Anderson, G.H., Veit, B., and Hanson, M.R.** (2005). The Arabidopsis *AtRaptor* genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* **3**.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L.** (2012a). Selective Inhibition of Clade A Phosphatases Type 2C by PYR/PYL/RCAR Abscisic Acid Receptors. *Plant Physiology* **158**, 970-980.
- Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L.** (2012b). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant physiology* **158**, 970-980.
- Arabidopsis Interactome Mapping, C.** (2011). Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science (New York, N.Y.)* **333**, 601-607.
- Avila, J., Gregory, O.G., Su, D., Deeter, T.A., Chen, S., Silva-Sanchez, C., Xu, S., Martin, G.B., and Devarenne, T.P.** (2012). The beta-subunit of the SnRK1 complex is phosphorylated by the plant cell death suppressor *Adi3*. *Plant physiology* **159**, 1277-1290.
- Baena-Gonzalez, E.** (2010). Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular plant* **3**, 300-313.
- Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J.** (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in plant science* **13**, 474-482.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J.** (2007a). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J.** (2007b). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-U910.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C.** (2004). Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 41758-41766.

- Boudsocq, M., Droillard, M.J., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C.** (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant molecular biology* **63**, 491-503.
- Bradford, K.J.** (1983). Water Relations and Growth of the flacca Tomato Mutant in Relation to Abscisic Acid. *Plant physiology* **72**, 251-255.
- Bradford, K.J., Downie, A.B., Gee, O.H., Alvarado, V., Yang, H., and Dahal, P.** (2003). Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiology* **132**, 1560-1576.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2003). Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant physiology* **131**, 78-92.
- Brocard, I.M., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2002). Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant physiology* **129**, 1533-1543.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J.** (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant cell* **14**, 2723-2743.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumaru, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M.A., and Halford, N.G.** (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *Journal of experimental botany* **63**, 913-924.
- Colcombet, J., and Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical journal* **413**, 217-226.
- Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rubio-Somoza, I., and Baena-Gonzalez, E.** (2013). miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in Arabidopsis. *Frontiers in plant science* **4**, 197.
- Cornish, K., and Zeevaart, J.A.** (1985). Movement of Abscisic Acid into the Apoplast in Response to Water Stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant physiology* **78**, 623-626.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., and Thomas, M.** (2010). Cross-phosphorylation between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12071-12077.

- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C.A., and Baena-Gonzalez, E.** (2014a). Mechanisms of regulation of SNF1/AMAPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in plant science* **5**, 190.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C.A., and Baena-Gonzalez, E.** (2014b). Mechanisms of regulation of SNF1/AMAPK/SnRK1 protein kinases. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology* **61**, 651-679.
- Dai, C., and Xue, H.W.** (2010). Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *Embo J.* **29**, 1916-1927.
- Daviere, J.M., and Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**, 1147-1151.
- Estruch, F., Treitel, M.A., Yang, X., and Carlson, M.** (1992). N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* **132**, 639-650.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology* **9**, 436-442.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., and Winderickx, J.** (2011). The AMAPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *The FEBS journal* **278**, 3978-3990.
- Gietz, R.D., TriggsRaine, B., Robbins, A., Graham, K.C., and Woods, R.A.** (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Mol. Cell. Biochem.* **172**, 67-79.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M., and Thomas, M.** (2006). AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant physiology* **142**, 931-944.
- Gudesblat, G.E., Iusem, N.D., and Morris, P.C.** (2007). Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MAPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *The New phytologist* **173**, 713-721.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J.** (2008). AMAPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214-226.

- Halford, N.G., and Hey, S.J.** (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *The Biochemical journal* **419**, 247-259.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurrea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M., and Zhang, Y.** (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of experimental botany* **54**, 467-475.
- Hamel, L.P., Nicole, M.C., Sritubtim, S., Morency, M.J., Ellis, M., Ehling, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen, J., Xing, T., Zhang, S., Seguin, A., and Ellis, B.E.** (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in plant science* **11**, 192-198.
- Hardie, D.G.** (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 774-785.
- Harthill, J.E., Meek, S.E., Morrice, N., Pegg, M.W., Borch, J., Wong, B.H., and Mackintosh, C.** (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **47**, 211-223.
- Hauvermale, A.L., Ariizumi, T., and Steber, C.M.** (2012). Gibberellin Signaling: A Theme and Variations on DELLA Repression. *Plant Physiology* **160**, 83-92.
- He, Y., and Gan, S.** (2004a). A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in Arabidopsis. *Plant molecular biology* **54**, 1-9.
- He, Y.H., and Gan, S.S.** (2004b). A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Mol.Biol.* **54**, 1-9.
- Hedbacker, K., and Carlson, M.** (2008). SNF1/AMAPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 2408-2420.
- Hey, S.J., Byrne, E., and Halford, N.G.** (2010). The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany* **105**, 197-203.
- Hoffman, C.S., and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* **57**, 267-272.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., and Harmon, A.C.** (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology* **132**, 666-680.

- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D., and Schroeder, J.I.** (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & development* **24**, 1695-1708.
- Hussain, A., Cao, D.N., and Peng, J.R.** (2007). Identification of conserved tyrosine residues important for gibberellin sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein. *Planta* **226**, 475-483.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S.Q., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C., and Grp, M.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301-308.
- Jamsheer, K.M., and Laxmi, A.** (2014a). DUF581 Is Plant Specific FCS-Like Zinc Finger Involved in Protein-Protein Interaction. *PloS one* **9**.
- Jamsheer, M., and Laxmi, A.** (2014b). DUF581 is plant specific FCS-like zinc finger involved in protein-protein interaction. *PloS one* **9**, e99074.
- Jiang, R., and Carlson, M.** (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes & development* **10**, 3105-3115.
- Jossier, M., Bouly, J.P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., and Thomas, M.** (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **59**, 316-328.
- Kenyon, C.** (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* **120**, 449-460.
- Kirchler, T., Briesemeister, S., Singer, M., Schutze, K., Keinath, M., Kohlbacher, O., Vicente-Carbajosa, J., Teige, M., Harter, K., and Chaban, C.** (2010). The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of Arabidopsis bZIP transcription factors. *European journal of cell biology* **89**, 175-183.
- Klingler, J.P., Batelli, G., and Zhu, J.K.** (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of experimental botany* **61**, 3199-3210.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywinska, E., Bucholc, M., and Dobrowolska, G.** (2011). SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics : a journal of integrative biology* **15**, 859-872.
- Lee, K.W., Chen, P.W., Lu, C.A., Chen, S., Ho, T.H., and Yu, S.M.** (2009). Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Science signaling* **2**, ra61.

- Lee, S.C., and Luan, S.** (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, cell & environment* **35**, 53-60.
- Li, C., Chang, P.P., Ghebremariam, K.M., Qin, L., and Liang, Y.** (2014). Overexpression of tomato SpMAPK3 gene in *Arabidopsis* enhances the osmotic tolerance. *Biochemical and biophysical research communications* **443**, 357-362.
- Liu, Y.** (2012). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant cell reports* **31**, 1-12.
- Lu, C.A., Lin, C.C., Lee, K.W., Chen, J.L., Huang, L.F., Ho, S.L., Liu, H.J., Hsing, Y.I., and Yu, S.M.** (2007). The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *The Plant cell* **19**, 2484-2499.
- Luo, X., Chen, Z., Gao, J., and Gong, Z.** (2014). Abscisic acid inhibits root growth in *Arabidopsis* through ethylene biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **79**, 44-55.
- Mohannath, G., Jackel, J.N., Lee, Y.H., Buchmann, R.C., Wang, H., Patil, V., Adams, A.K., and Bisaro, D.M.** (2014). A complex containing SNF1-related kinase (SnRK1) and adenosine kinase in *Arabidopsis*. *PloS one* **9**, e87592.
- Nietzsche, M., Schiessi, I., and Bornke, F.** (2014). The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Oakhill, J.S., Scott, J.W., and Kemp, B.E.** (2012). AMAPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 125-132.
- Polge, C., and Thomas, M.** (2007). SNF1/AMAPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in plant science* **12**, 20-28.
- Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & development* **23**, 80-92.
- Radchuk, R., Emery, R.J., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J.E., Feil, R., Weschke, W., and Weber, H.** (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**, 324-338.
- Ramon, M., Ruelens, P., Li, Y., Sheen, J., Geuten, K., and Rolland, F.** (2013). The hybrid Four-CBS-Domain KIN subunit functions as the canonical subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant Journal* **75**, 11-25.

- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberras, V., Gonzalez-Guzman, M., Antoni, R., Rodriguez, P.L., and Baena-Gonzalez, E.** (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* **25**, 3871-3884.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., and Mundy, J.** (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology* **61**, 621-649.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M., and Mewes, H.W.** (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5539-5545.
- Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). (Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., and Hardie, D.G.** (1999). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant physiology* **120**, 257-274.
- Takabayashi, A., Ishikawa, N., Obayashi, T., Ishida, S., Obokata, J., Endo, T., and Sato, F.** (2009). Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **57**, 207-219.
- Tominaga, M., Harada, A., Kinoshita, T., and Shimazaki, K.** (2010). Biochemical characterization of calcineurin B-like-interacting protein kinase in Vicia guard cells. *Plant & cell physiology* **51**, 408-421.
- Tsai, A.Y., and Gazzarrini, S.** (2012). AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **69**, 809-821.
- Tsai, A.Y., and Gazzarrini, S.** (2014). Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Frontiers in plant science* **5**, 119.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant & cell physiology* **51**, 1821-1839.
- Wang, X., Bian, Y., Cheng, K., Gu, L.F., Ye, M., Zou, H., Sun, S.S., and He, J.X.** (2013a). A large-scale protein phosphorylation analysis reveals novel

- phosphorylation motifs and phosphoregulatory networks in Arabidopsis. *Journal of proteomics* **78**, 486-498.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X., and Wu, Y.** (2013b). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **64**, 675-684.
- Williams, S.P., Rangarajan, P., Donahue, J.L., Hess, J.E., and Gillasp, G.E.** (2014). Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science* **5**, 324.
- Xiong, Y., and Sheen, J.** (2014). The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* **164**, 499-512.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2014). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, cell & environment*.
- Zheng, Z., Xu, X., Crosley, R.A., Greenwalt, S.A., Sun, Y., Blakeslee, B., Wang, L., Ni, W., Sopko, M.S., Yao, C., Yau, K., Burton, S., Zhuang, M., McCaskill, D.G., Gachotte, D., Thompson, M., and Greene, T.W.** (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. *Plant physiology* **153**, 99-113.

Anexos

7 Anexos

Categoria funcional	Nº genes	p-Value
01.04 Metabolismo do fosfato	6	0.014922
01.05 Metabolismo de carboidratos e compostos C	8	0.040376
01.06 Metabolismo de isoprenoides, ácidos gordos e lípidos	6	0.026907
02.25 Oxidação de ácidos gordos	3	0.000161
18.01 Regulação por	5	0.006732
18.01.01 regulação por modificação	5	0.000391
18.02 regulação da atividade da proteína	5	0.047252
18.02.09 regulação dos fatores de transcrição	3	0.010239
30.01.05 Transdução de sinal mediado por enzimas	5	0.00634
30.01.09 Transdução de sinal mediado por mensageiros secundários	5	7.63x10 ⁻⁰⁵
30.01.09.07 transdução de sinal mediado por cAMP/cGMP	3	1.00x10 ⁻⁰⁶
32.01 Resposta ao stress	10	0.000703
32.01.01 resposta ao stress oxidativo	5	1.83x10 ⁻⁰⁵
32.01.11 resposta a privação de nutrientes	3	3.07x10 ⁻⁰⁵
32.07 detoxificação	5	0.003656

Tabela 7.1 (Anexo) - Categorias funcionais (níveis 2 e 3) sobre-representadas, no conjunto de proteínas identificadas através do rastreio de Y2H efetuado.

As categorias funcionais foram obtidas através da base de dados FUNCAT.

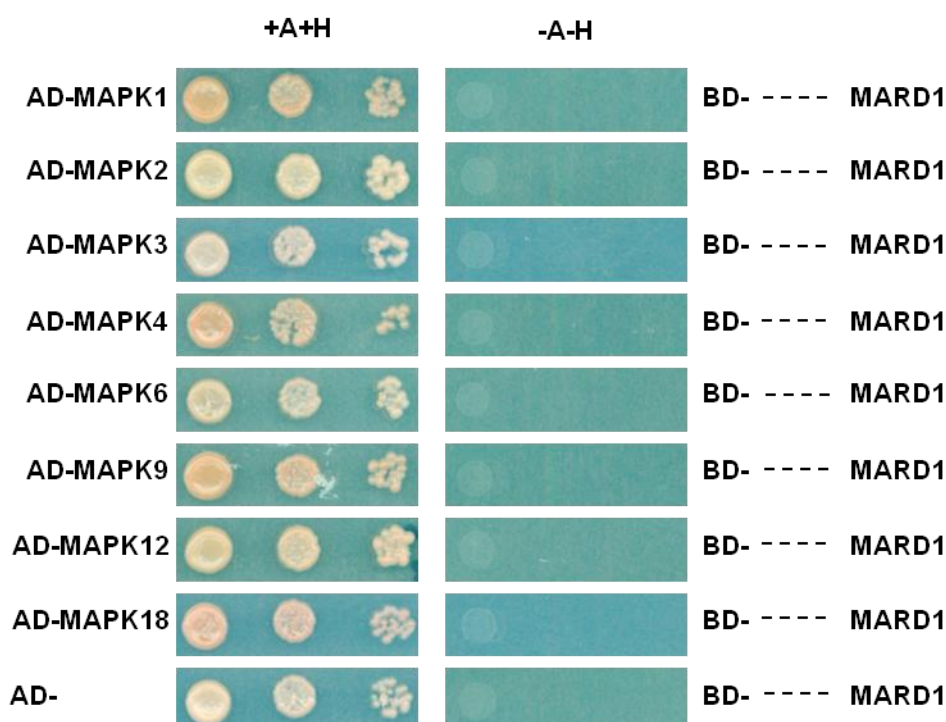


Figura 7.1 (Anexo) - Controlos da interação das MAPKs com SnRK1.1, na presença de MARD1.

O teste de interação de dois híbridos entre as MAPKs e um *Binding Domain* que não se encontra ligado a nenhuma proteína e onde MARD1 é igualmente expresso. Para isso foi utilizado o plasmídeo pBRIDGE, onde não é inserido nenhuma proteína no MCSI e MARD1 é clonado no MCSII.

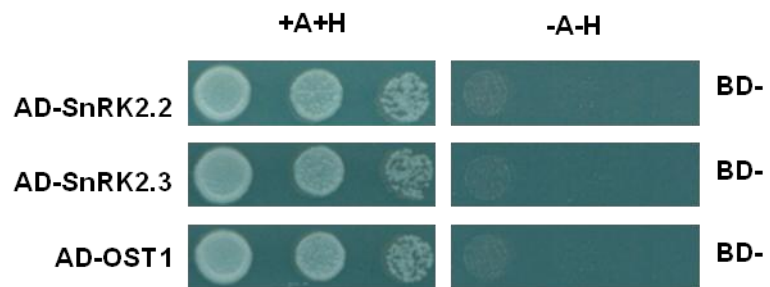


Figura 7.2 (Anexo) - Controlos da interação das SnRK2.2, -2.3 e OST1 com SnRK1.1.
O teste de interação de dois híbridos entre as SnRK2 em estudo e um *Binding Domain* que não se encontra ligado a nenhuma proteína.