



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

**“Caracterización de dos isoformas de CDPKs de  
*Solanum tuberosum* (papa). Análisis de sus  
expresiones en respuesta a estrés hídrico”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área QUÍMICA BIOLÓGICA

**Autor: Lic. Marcelo Daniel Sciorra**  
**Directora de tesis: Dra. Rita María Ulloa**  
**Consejera de estudios: Dra. Cecilia Varone**

**Lugar de trabajo:** Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
“Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI - CONICET)

**Fecha y lugar de defensa:** Julio de 2020; FCEyN – UBA, CABA



# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT: “CHARACTERIZATION OF TWO ISOFORMS OF CDPKS FROM <i>Solanum tuberosum</i> (potato). ANALYSIS OF THEIR EXPRESSIONS IN RESPONSE TO WATER STRESS”</b> .....	8
<b>HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	10
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1 - PAPA COMO MODELO DE ESTUDIO: <i>Solanum tuberosum</i> .....	11
1.1 - Descripción morfológica de la planta de papa.....	12
1.2 - Genoma de papa .....	13
1.3 - Efecto de la sal en la planta de papa .....	13
2 - TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN PLANTAS.....	15
2.1 - Calcio como segundo mensajero .....	16
2.3 - Proteínas sensores de $Ca^{2+}$ .....	18
2.4 - Quinasas de proteínas dependientes de $Ca^{2+}$ (CDPKs) .....	21
2.4.1 - Estructura y localización subcelular de CDPKs .....	22
2.4.2 - Modelos de activación de las CDPKs .....	24
2.5 - Procesos en los que están involucrados las CDPKs.....	25
2.6 - Antecedentes de CDPKs en papa .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	31
CAPÍTULO 1: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE StCDPKs DEL GRUPO III.....	31
1.1 - Identificación de CDPKs pertenecientes al grupo III en papa y tomate .....	31
1.2 - Análisis de los dominios presentes en las CDPKs del grupo III.....	32
1.3 - Predicción de consensos de miristoilación y palmitoilación.....	32
1.4 - Análisis de las secuencias genómicas de las CDPKs del grupo III.....	34
1.5 - Comparación con CDPKs del grupo III de otras especies .....	35
1.6 - Clonado de las CDS de StCDPK22 y StCDPK24.....	38
1.6.1 - Análisis in silico de las secuencias codificantes de StCDPK22 y StCDPK24 .....	39
1.7 - Modelado por homología .....	42
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis .....	47
2.1 - Expresión, purificación y actividad de StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis.....	47
2.2 - Determinación del sustrato aceptor óptimo in vitro .....	49
2.3 - Dependencia de $Ca^{2+}$ . Efecto de quelantes de $Ca^{2+}$ y antagonistas de CaM.....	50
2.4 - Cofactores del complejo ATP- $Me^{2+}$ . Preferencia de Magnesio y Manganeso .....	52
2.5 - Determinación de los parámetros cinéticos ( $V_{máx}$ y $K_M$ ) .....	53
2.6 - Autofosforilación de StCDPK22 y StCDPK24.....	56
2.7 - Predicción y determinación de sitios de fosforilación .....	58
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE StCDPK22/24 .....	65
3.1 - Entorno genómico de StCDPK22/24.....	65
3.2 - Secuencias promotoras.....	66
3.3 - Expresión de StCDPK22/24 por FPKM .....	69
3.4 - Expresión de StCDPK22/24 en tejidos de plantas de papa .....	70
3.5 - Expresión de StCDPK22/24 en tratamiento salino in vitro .....	71
3.5.1 - Ensayo de salinidad en tiempo corto (TC).....	71

3.5.2 - <i>Ensayo de salinidad en tiempo largo (TL)</i> .....	72
3.6 - <i>Expresión de StCDPK22/24 en tratamiento salino en invernadero</i> .....	73
<b>CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	78
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	79
1 - CEPAS BACTERIANAS DE <i>Escherichia coli</i> .....	79
1.1 - <i>Condiciones de cultivo</i> .....	79
1.2 - <i>Preparación de células electro-competentes de E. coli</i> .....	79
1.3 - <i>Transformación de células competentes de E. coli por electroporación</i> .....	79
2 - MATERIAL VEGETAL .....	79
2.1 - <i>Cultivo in vitro</i> .....	79
2.2 - <i>Cultivo en invernadero</i> .....	80
2.3 - <i>Ensayos de salinidad in vitro</i> .....	80
2.4 - <i>Ensayos de salinidad en invernadero</i> .....	80
3 - EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE PLANTAS .....	80
4 - OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO .....	81
5 - METODOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE .....	81
5.1 - <i>Clonados realizados en esta tesis</i> .....	81
5.1.1 - <i>Plásmidos</i> .....	81
6 - MINI PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREP) .....	83
6.1 - <i>Purificación de ADN plasmídico utilizando kits comerciales</i> .....	84
6.1.1 - <i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa</i> .....	84
6.2 - <i>Amplificación de insertos por PCR semicuantitativa</i> .....	84
6.3 - <i>Clonado de secuencias codificantes</i> .....	84
6.3.1 - <i>Digestión con enzimas de restricción</i> .....	84
6.3.2 - <i>Reacciones de ligación</i> .....	84
6.3.3 - <i>Cuantificación del ADN y ARN</i> .....	84
7 - ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR RT-qPCR EN TIEMPO REAL .....	85
7.1 - <i>Extracción de ARN</i> .....	85
7.1.1 - <i>Determinación de la calidad del ARN</i> .....	85
7.2 - <i>Tratamiento con DNAsa</i> .....	85
7.3 - <i>Síntesis de ADNc</i> .....	85
7.4 - <i>PCRs cuantitativas (qPCR)</i> .....	85
8 - METODOLOGÍA DE PROTEÍNAS.....	86
8.1 - <i>Extracción de proteínas para ensayos de actividad o western blot</i> .....	86
8.1.1 - <i>Cuantificación de proteínas totales</i> .....	86
8.2 - <i>Expresión y purificación de proteínas recombinantes</i> .....	86
8.2.1 - <i>Purificación de proteínas recombinantes de fusión a His</i> .....	86
8.3 - <i>Ensayo de western blot</i> .....	87
8.3.1 - <i>Anticuerpos utilizados:</i> .....	87
8.4 - <i>Ensayos de actividad CDPK</i> .....	87
8.5 - <i>Ensayos de Autofosforilación y de Fosforilación de sustratos en geles</i> .....	88
8.5.1 - <i>Ensayos de autofosforilación usando ATP frío</i> .....	88
8.6 - <i>Electroforesis 2D</i> .....	88
8.6.1 - <i>Electroforesis en geles bidimensionales</i> .....	88
8.6.2 - <i>Determinación de sitios de fosforilación</i> .....	89
9 - BIOINFORMÁTICA .....	89
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	91
<b>ANEXO 1</b> .....	105
<b>ANEXO 2</b> .....	106

**ANEXO 3** .....107  
**ANEXO 4** .....109

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi familia, por siempre acompañarme y apoyarme. Por darme la posibilidad y los medios de hacer la carrera que me gusta.

A Rita, por darme el lugar y los medios para realizar este trabajo, y por las productivas sesiones de escritura, corrección y revisión. Y a los compañeros que tuve en el transcurso (Franco, Ceci, Andrés), sobre todo Eli quien me tuvo la paciencia más grande al enseñarme las técnicas.

Al INGEBI, por los recursos y su gente, ya sean tanto los investigadores como los becarios a quienes les pedí ayuda muchas veces y siempre estuvieron muy bien predispuestos. Y a los técnicos y profesionales de apoyo (Rubén, Norma, Adrián, Graciela, Marina) que siempre nos tenían todo listo para poder realizar nuestro trabajo, sobre todo a Vero que me enseñó a trabajar con material radiactivo.

A CONICET, por otorgarme la beca con la cual realicé este trabajo.

A la UBA, en particular el Depto. de Química Biológica de la FCEyN por la carrera de doctorado y los cursos que ofrece.

A los miembros del jurado, por tomarse el tiempo y la dedicación para leer, analizar y corregir este trabajo, haciendo aún más productivo todo este proceso.

A todos ustedes,  
GRACIAS POR HACER ESTO POSIBLE

**Marcelo Daniel Sciorra**

## RESUMEN

---

El calcio es un segundo mensajero ubicuo en plantas que participa en la señalización de estímulos bióticos y abióticos. Las oscilaciones del catión son decodificadas por distintos sensores, entre ellos se destacan las quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs). Estas enzimas presentan un dominio catalítico de quinasa de serina/treonina (KD) fusionado a través de un dominio autoinhibitorio (AD) a un dominio regulador similar a calmodulina (CLD) con cuatro sitios *EF-hands* de unión al calcio. La familia CDPK en papa (*Solanum tuberosum*) está compuesta por 26 miembros divididos en cuatro grupos; cinco CDPKs pertenecen al grupo III y tres de ellas, StCDPK22/23/24, presentan sólo tres sitios *EF-hands* en su dominio regulatorio faltando el sitio más cercano al AD (Fantino *et al.* 2017). Una nueva búsqueda permitió encontrar un nuevo miembro de este grupo, StCDPK27, que también presenta tres sitios *EF-hand*, pero en este caso carece del segundo sitio. El análisis filogenético de los miembros del grupo III reveló que las isoformas que carecen del primer sitio *EF-hand* forman un clado aparte.

Se ha reportado que CDPKs con sólo 3 sitios presentan menor sensibilidad por el calcio (Boudsocq *et al.* 2012). Con el fin de analizar su dependencia por el catión, se amplificaron las secuencias codificantes de StCDPK22 y StCDPK24, y se generaron y purificaron las proteínas recombinantes, StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis (524 y 532 aa respectivamente). Ambas isoformas comparten 78% de identidad nucleotídica y 80% a nivel aminoacídico. A pesar de la gran identidad de secuencia de su KD presentan diferencias en su actividad quinasa y en la preferencia por el complejo ATP-Me<sup>2+</sup>. Se observa que StCDPK24 presenta mucha mayor actividad en todas las condiciones ensayadas y tiene una clara preferencia por el complejo ATP-Mg<sup>2+</sup>, presenta una dependencia parcial por Ca<sup>2+</sup> y antagonistas de calmodulina disminuyen su actividad. Se determinó que Syntide-2 fue el mejor sustrato aceptor y con éste se determinaron los parámetros cinéticos (V<sub>máx</sub> y K<sub>M</sub>). Por su parte, StCDPK22 tiene muy baja actividad (casi nula), no se observa una clara dependencia por calcio y su actividad mejora cuando se utiliza ATP-Mn<sup>2+</sup> como sustrato dador. Ambas isoformas presentan un patrón similar de autofosforilación en ausencia de calcio (Y<sup>39</sup> o S<sup>33</sup> del NTV, S<sup>321</sup> o S<sup>323</sup> y T<sup>325</sup> o T<sup>327</sup> del AD y S<sup>521</sup> o S<sup>523</sup> del CTV para StCDPK22 o StCDPK24 respectivamente). Además, StCDPK22 se fosforiló en dos residuos del KD (S<sup>83</sup> y S<sup>297</sup>) en ausencia de calcio; mientras que StCDPK24 se autofosforiló en dos residuos del CLD (S<sup>438</sup> y S<sup>445</sup>) sólo en presencia de calcio sugiriendo que esta isoforma es regulada por el catión. Es interesante que AtCPK8 de Arabidopsis también se autofosforila en los mismos residuos del AD y CTV sugiriendo que puede ser una forma de regulación de las CDPKs del clado. Se realizó un modelado *in silico* de la estructura secundaria y terciaria de ambas enzimas.

Los datos de RT-qPCR indican que StCDPK22 presenta una expresión más restringida a flor y estadios tempranos de tuberización mientras que la expresión de StCDPK24 es ubicua, aunque fue mayor en brotes jóvenes, tallo, flor, hoja y estadios de tuberización. El análisis *in silico* de sus promotores permitió identificar varios motivos de respuesta a ABA y a estrés abiótico, por lo que su expresión se analizó en respuesta a la salinidad utilizando plantas *in vitro* y de invernadero. StCDPK24 se induce tempranamente (6 h) en respuesta a la sal en plantas *in*

*in vitro* para luego decaer. Lo mismo ocurrió en tallo de plantas de invernadero tratadas con sal (8 h). Nuestros resultados indican que ambas CDPKs difieren tanto en su actividad como en sus perfiles de expresión y la expresión espacio-temporal de StCDPK24 en respuesta al estrés salino sugiere que podría participar en esta cascada de señalización.

**Palabras clave:**

Quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs) • fosforilación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  • vías de señalización • *Solanum tuberosum*



## **ABSTRACT: “Characterization of two isoforms of CDPKs from *Solanum tuberosum* (potato). Analysis of their expressions in response to water stress”**

---

Plants are exposed to a variety of external and endogenous stimuli that affect and modulate their development. Calcium is a ubiquitous messenger involved in signaling biotic and abiotic stimuli, whose oscillations are decoded by different sensors. Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are sensors/transducers that participate in various signaling pathways and mediate responses to different stimuli. These enzymes have a serine/threonine kinase (KD) catalytic domain fused through an auto-inhibitory domain (AD) to a calmodulin-like regulatory domain (CLD) with four EF-hands calcium binding sites. The CDPK potato family (*Solanum tuberosum*) is composed of 26 members divided into four groups; group III has five members and three of them StCDPK22/23/24, have only three EF-hands sites in their CLD (EF-hand1 is lost) (Fantino *et al.* 2017). A new search allowed us to identify another member of this group, StCDPK27, which also presents three EF-hands but in this case, EF-hand2 is missing. A phylogenetic analysis indicated that StCDPK22/23/24 are clustered in a different clade with other CDPKs from different species that lack the first EF-hand.

CDPKs with only three EF-hands were reported to display less calcium sensitivity (Boudsocq *et al.* 2012). In order to analyze their calcium dependence, the coding sequences of StCDPK22 and StCDPK24 genes were amplified, and recombinant proteins, StCDPK22:6xHis and StCDPK24:6xHis (524 and 532 aa respectively) were generated and purified. Both isoforms share 78% of nucleotide identity and 80% at the amino acid level. Despite the great sequence identity, they show differences in their kinase activity and in their preference for ATP-Me<sup>2+</sup> complex. StCDPK24 has much greater activity in all the conditions tested, it is partially dependent on calcium, calmodulin antagonists decrease its activity indicating that the CLD is required, and it prefers ATP-Mg<sup>2+</sup>; while StCDPK22 has scarce or null activity, does not depend on calcium for activity, and prefers ATP-Mn<sup>2+</sup>. Their kinetic parameters were determined. Both kinases present a similar autophosphorylation profile in the absence of calcium (Y<sup>39</sup> or S<sup>33</sup> in the NTV, S<sup>321</sup> or S<sup>323</sup> and T<sup>325</sup> or T<sup>327</sup> in the AD and S<sup>521</sup> or S<sup>523</sup> in the CTV for StCDPK22 or StCDPK24 respectively). StCDPK22 was also autophosphorylated in two residues of the KD (S<sup>83</sup> and S<sup>297</sup>) in the absence of calcium, while StCDPK24 was autophosphorylated in a calcium dependent manner in two residues in the CLD (S<sup>438</sup> and S<sup>445</sup>). Interestingly both kinases share with AtCPK8 the same autophosphorylation pattern in the KD and CTV, suggesting that it could be a way of regulating the activity of these CDPKs. *In silico* modeling of the secondary and tertiary structure of both enzymes was performed.

Analysis by RT-qPCR revealed that StCDPK22 expression is restricted to flower and early tuberization stages while StCDPK24 is more ubiquitous and its expression is higher in stems, leaves, shoots, flowers and tuberization stages. The *in silico* analysis of its promoters allowed to identify several ABA and abiotic stress responsive elements, so their expression was analyzed in response to salinity using *in vitro* and greenhouse plants. StCDPK24 expression was induced at 6 h and the declined in *in vitro* plants and a significant increase was observed at 8 h in stems of

salt-treated greenhouse plants. On the contrary, *StCDPK22* expression was not affected by salt. Our results indicate that both kinases display different activity and expression profiles, and the spatio-temporal expression of *StCDPK24* in response to salt suggests that it could play a role in this specific response.

**Keywords**

Calcium-dependent protein kinases • calcium-dependent phosphorylation • signaling pathways  
• *Solanum tuberosum*

## HIPÓTESIS

---

Las quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPKs) son reguladores centrales en los procesos mediados por  $\text{Ca}^{2+}$  que se desencadenan en respuesta a cambios internos y externos. Componen familias multigénicas y sus diferentes miembros pueden desempeñar funciones específicas o compartir una misma vía de señalización. En *Solanum tuberosum* se han caracterizado miembros de los grupos I, II y IV; sin embargo, no hay CDPKs del grupo III caracterizadas. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, cuatro miembros de este grupo, que contienen sólo tres sitios *EF-hand* en su CLD, participan modulando la respuesta a estrés salino y se ha reportado que su dependencia por el calcio difiere respecto de las CDPKs canónicas.

En este trabajo de tesis proponemos que las isoformas StCDPK22 y StCDPK24 del grupo III de papa podrían estar involucradas en la cascada de transducción en respuesta a estrés salino, pero con diferencia en sus actividades quinasa debido a sus particularidades estructurales.

## OBJETIVO GENERAL

---

Caracterizar la actividad enzimática y la dependencia del calcio de las isoformas StCDPK22 y StCDPK24 del grupo III de papa (*Solanum tuberosum*) y analizar su expresión en la respuesta al estrés salino.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Analizar *in silico* las CDPKs pertenecientes al grupo III de papa, en particular las isoformas StCDPK22 y StCDPK24.
- Clonar las isoformas StCDPK22 y StCDPK24 y obtener las proteínas recombinantes para:
  - a) comparar su respuesta al calcio, actividad quinasa, preferencia de sustratos y cofactores y parámetros cinéticos;
  - b) analizar la autofosforilación de las enzimas y determinar los residuos fosforilados.
- Analizar sus niveles de expresión en tejidos y en plantas expuestas o no a estrés salino.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1 - Papa como modelo de estudio: *Solanum tuberosum*

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta anual tetraploide ( $2n=4x=48$ ). Pertenece a la familia Solanáceas, que agrupa alrededor de 100 géneros, incluyendo cultivos importantes como tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco, berenjena y pimiento. De las 2.500 especies, más de 150 pueden tuberizar (Huarte y Capezio, 2013). Se originó en los Andes (Sudamérica) y fue domesticada alrededor del lago Titicaca (Perú y Bolivia) (Huarte y Capezio, 2013; SINAVIMO, 2020). Hay más de 4.000 variedades de papas nativas; asimismo, hay 151 especies de papa silvestre. Aunque son amargas para su consumo, su biodiversidad incluye importantes características como resistencia natural a plagas, enfermedades y condiciones climáticas (Base de datos del CIP).

En términos de consumo humano, la papa es el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo (FAOSTAT, 2020), después del arroz (*Oryza sativa*) y del trigo (*Triticum spp.*) (Huarte y Capezio, 2013). Es hasta siete veces más eficiente que los cereales en el aprovechamiento del agua y genera más alimento por unidad de agua que ningún otro cultivo importante, produciendo una hectárea (ha) de papa de dos a cuatro veces la cantidad de alimentos respecto de los cereales. Este alimento tradicional de la dieta básica (alrededor de 60 kg per cápita/año en Argentina) provee carbohidratos (en forma de almidón), proteínas, vitamina C y minerales. Alrededor de 1.400 millones de personas consumen papa regularmente, con una producción mundial que sobrepasa los 300 millones de toneladas métricas (CIP). El crecimiento en la producción mundial de papa se estancó en 2018 y no pudo recuperarse en 2019, según el Congreso Mundial de la Papa en febrero de 2020 (FAOSTAT, 2020). Ucrania se convirtió en el segundo productor mundial (después de India), desplazando a Rusia en 2018. Y más de la mitad de las papas del mundo se cultivaron en Asia en ese año, mientras que Europa representó el 30% (FAOSTAT, 2020). El crecimiento promedio del rendimiento de la papa pasó de 14,3 ton/ha en 1968 a 20,9 ton/ha en 2018, lo que significó un incremento del 46,2% (FAOSTAT, 2020).

El rendimiento potencial de un cultivo se calcula asumiendo que no existen limitaciones al crecimiento de orden abiótico o factores bióticos que reduzcan el crecimiento. El rendimiento productivo de la papa en nuestro país es sólo un 40-76% o un 47-81% del rendimiento potencial, dependiendo del método utilizado para estimarlo, el año y la región considerada (Cantos de Ruiz *et al.* 1989; de la Casa *et al.* 2014). En Argentina, una de las regiones productoras por excelencia es el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Partido de Balcarce y alrededores), donde la plantación se concentra en suelos con alto contenido de materia orgánica durante la primavera (papa semitardía, comercialmente denominada “papa negra”) (SINAVIMO, 2020). En esta región el rendimiento potencial es de 88 toneladas de tubérculos por hectárea sembrada, pero el rendimiento real promedio no supera el 53% de este valor. La superficie destinada a la actividad semillera se distribuye entre las provincias de Mendoza, Catamarca y Tucumán (Mosciaro, 2011), donde también se produce la denominada “papa blanca” en suelos arenosos (SINAVIMO, 2020), como se muestra en la Fig. I.1. De 2012 a

2017 el número de hectáreas cosechadas pasó de 70.710 a 75.975, la producción en toneladas pasó de 2.149.000 a 2.454.000 y el rendimiento aumentó un 6 % (FAOSTAT, 2020).



Fig. I.1 Producción de papa en Argentina. A Tipo de producción a lo largo del año. Adaptado de Huarte e Inchausti (1994). B Áreas de producción. Fuente: SENASA.

### 1.1 - Descripción morfológica de la planta de papa

Los tubérculos tienen una doble función: como órgano de reserva y de propagación vegetativa. Las yemas axilares dormidas se reactivan luego del período de dormición y generan una planta genéticamente idéntica a la planta madre, por lo que los tubérculos también sirven como órganos de perennidad, pudiendo cada nueva planta producir hasta 20 nuevos tubérculos. Las plantas de papa también producen flores pentámeras y bayas que contienen entre 100 a 400 semillas que pueden sembrarse para producir nuevos tubérculos (Fig. I.2) (Huarte y Capezio, 2013).

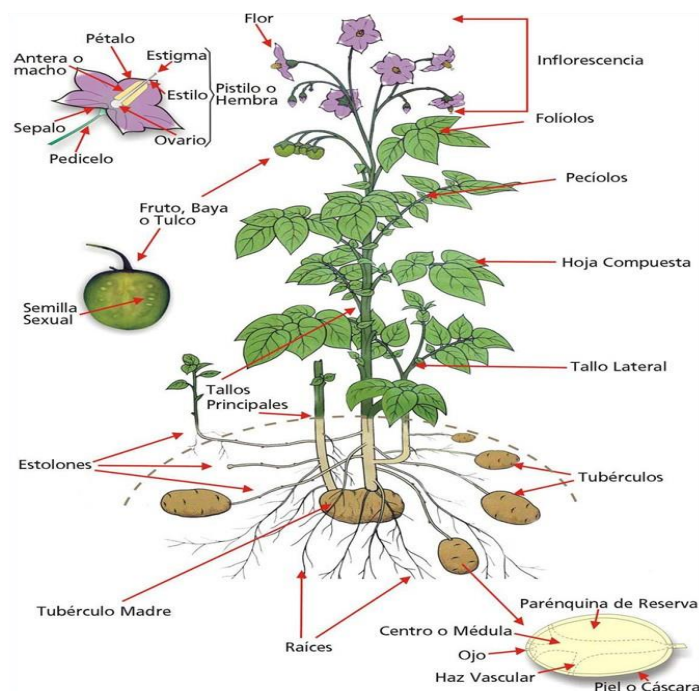


Fig.I.2 Morfología de la planta de papa. Figura obtenida de Huarte y Capezio (2013).

Los tubérculos de papa son tallos modificados con las características de un tejido caulinar. El extremo basal del tubérculo está unido al estolón (que lo conecta con la planta durante el crecimiento). El extremo distal o apical concentra la mayor cantidad de “ojos”, cada uno con tres yemas (tejido meristemático). En su corte transversal se puede distinguir, de afuera hacia adentro: piel o peridermis, corteza, haz vascular, parénquima de reserva y médula (Huarte y Capezio, 2013; Mosciaro, 2011; SINAVIMO, 2020).

Cuando las yemas comienzan a crecer se denominan “brotes”, cuyo color, forma y pilosidad permiten diferenciar las variedades. Las hojas son compuestas con diverso grado de segmentación. El sistema radicular se encuentra principalmente en los primeros 40 cm de profundidad, por ello el cultivo es sensible a sequía y requiere una concentración elevada de nutrientes en esa parte del suelo. Los tallos subterráneos producen estolones y tubérculos (Huarte y Capezio, 2013; SINAVIMO, 2020).

## 1.2 - Genoma de papa

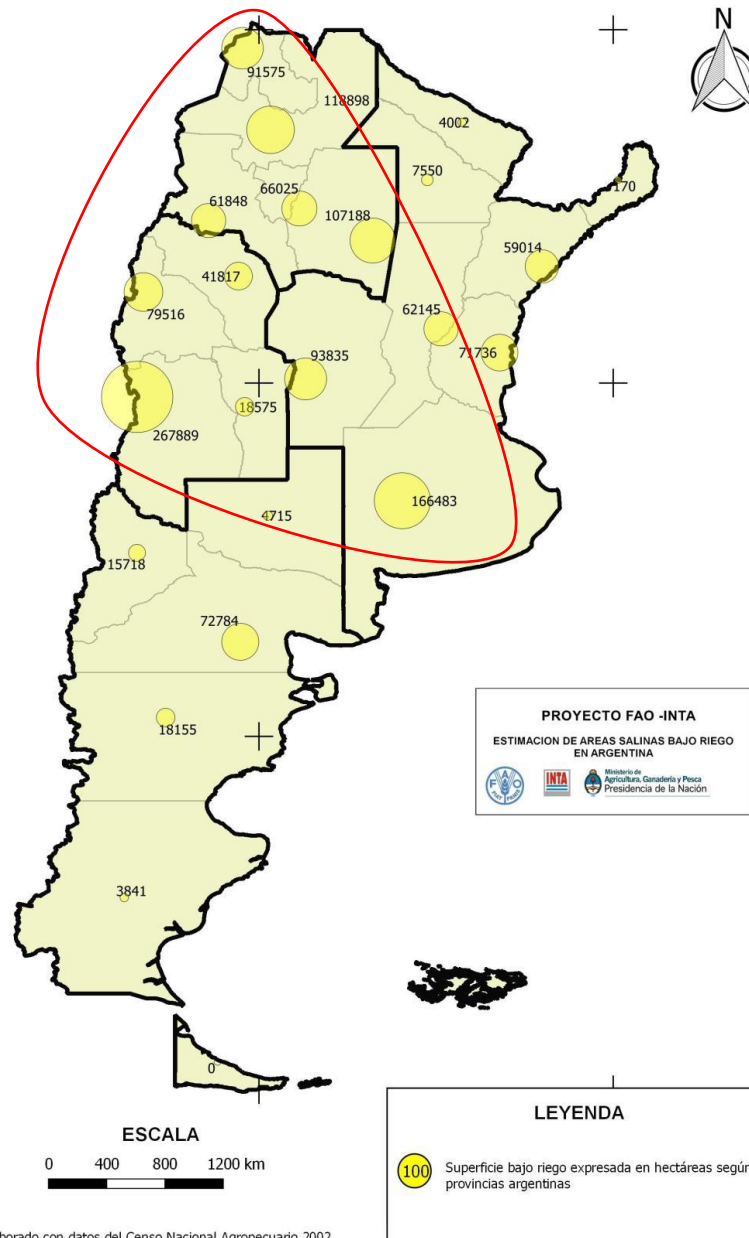
El genoma de papa se secuenció a partir del *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC), formado por grupos académicos y organizaciones de 16 países, y se publicó en 2011 en la revista *Nature* (Xu *et al.* 2011); luego se desarrolló la base de datos *Spud DB* de libre acceso a la secuencia del genoma y a las anotaciones y *set* de datos genotípicos y fenotípicos obtenidos a partir de 250 clones de papa.

El PGSC ensambló el genoma (726 MB) de la especie doble monoploide *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 (DM; AEWC00000000), estando el 86% anclado al mapa genético y conteniendo 39.031 genes anotados. Además, se liberaron las secuencias de un segundo clon diploide heterocigota, el *S. tuberosum* Group Tuberosum RH89-039-16 (RH; ERP000627). *Spud DB* contiene exploradores (*potato genome browsers*) para pseudomoléculas, transcritos, loci, información de loci del *International Tomato Annotation Group* (ITAG), de Arabidopsis, uva, álamo y tomate, y transcritos ensamblados para otras 12 especies de solanáceas (PlantGDB). A su vez, contiene datos de 56 bibliotecas de *RNASeq* de DM (SRA030516) y RH (ERP000527) e información de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de *SolCAP* (Felcher *et al.* 2012; Hamilton *et al.* 2011). Para cada transcrita anotado por los grupos PGSC e ITAG hay disponible un informe, la proteína predicha, las coincidencias obtenidas de UniRef, InterPro, Arabidopsis (base de datos TAIR), tomate y otras secuencias de papa e información de microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés), SNPs y valores de expresión en fragmentos por kilobase de la transcripción por millón de lecturas mapeadas (FPKM) en distintos tejidos y tratamientos/condiciones.

## 1.3 - Efecto de la sal en la planta de papa

La salinidad es uno de los factores de estrés ambiental más frecuentes que influye negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, las actividades enzimáticas (Mudgal *et al.* 2010) y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Vardhini, 2012). A nivel mundial, la salinización es causada predominantemente (50-80% según la región considerada) por la sal cloruro de sodio (NaCl) (Kaouther *et al.* 2012) y ocurre sobre todo en zonas áridas y semiáridas (FAOSTAT, 2020; Lavado *et al.* 2007). El aumento de la salinidad se debe en gran

parte al riego de los campos, 20 a 30 millones ha sobre el total de tierras de regadío son afectadas. En Rusia, Australia y Argentina (los países más afectados) la tasa de crecimiento de la salinización está en el orden de 0,25-0,5 millones de ha/año (Sánchez *et al.* 2015). En Argentina, la superficie en producción agrícola bajo riego alcanza un total de 2,08 millones ha (5% de la superficie total cultivada), y el 65% de esta superficie se riega a partir de fuentes superficiales y el resto con agua subterránea (Sánchez *et al.* 2015). Como se observa en la Fig. 1.3, las regiones con mayor riego de Argentina son Cuyo, Noroeste y Pampeana (Lavado *et al.* 2007).



**Fig. 1.3 Zonas bajo riego de Argentina.** Superficie expresada en hectáreas. La línea roja indica la región de mayor volumen de riego. Adaptado de Sánchez *et al.* (2015).

Los efectos de la salinidad en las plantas han sido ampliamente investigados (Duan *et al.* 2008; Rattan *et al.* 2012). El ion tóxico primario es el sodio ( $\text{Na}^+$ ) que compite y ocupa los sitios de unión de cationes al reducir la absorción y el transporte de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) (Faried *et al.* 2016), además interrumpe la regulación de los estomas, lo que eventualmente causa la

pérdida de agua. Contenidos altos en  $\text{Na}^+$  o bajos en  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el suelo como en el agua, reducen la velocidad de infiltración disminuyendo la disponibilidad de agua para los cultivos. Por otra parte, los iones  $\text{Na}^+$ , cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y boro ( $\text{B}^{3+}$ ) se acumulan en concentraciones suficientemente altas para causar toxicidad (Sánchez *et al.* 2015). El  $\text{Na}^+$  entra en el apoplasto foliar a través de la corriente del xilema y se deja atrás a medida que el agua se evapora.

Las respuestas adaptativas al estrés hídrico pueden clasificarse en: a) el control de la homeostasis, que incluye la homeostasis iónica y la osmótica; b) el control del daño y la reparación o detoxificación; y c) el control del crecimiento. Estos mecanismos actúan conjuntamente ya que la señal de homeostasis regula la respuesta de detoxificación; ambas respuestas inducen la tolerancia al estrés. El segundo mecanismo, repara la alteración del equilibrio entre las especies peroxidantes y los antioxidantes (Sies, 1991). Esta alteración incrementa la tasa de producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La planta requiere un sistema de protección contra las ROS generadas por el déficit de agua y el desbalance de solutos. El déficit hídrico prolongado en el tiempo ocasionará inevitablemente daño oxidativo debido a la sobreproducción de ROS. Los genes implicados aguas arriba en la vía de transducción de señales, como las quinasas y fosfatasa de proteínas (PKs y PPs), también se transcriben activamente en presencia de una alta concentración de NaCl. Las quinasas de proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y las quinasas relacionadas con la no fermentación de sacarosa (SnRK) son inducidas por la sequía, el frío y las altas concentraciones de sal y tienen un rol en la homeostasis de ROS regulando la expresión de genes vinculados con su generación. Además, se inducen factores de transcripción (FTs) tales como bZIP, HD-ZIP, NAC, MYB, GATA, CAMTA y B3 entre otros que regulan respuestas a estreses abióticos (Hernández, 2019; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

En el caso de la papa, las especies silvestres son relativamente tolerantes a la salinización, mientras que las variedades modernas son mucho menos tolerantes (Faried *et al.* 2016). La papa cultivada es moderadamente sensible a la sal, presentando un 50% de crecimiento y reducción del rendimiento bajo un estrés salino de  $5 \text{ dSm}^{-1}$  o 50 mM NaCl (Hmida-Sayari *et al.* 2005). En el laboratorio determinamos que, *in vitro*, la adición de 50 mM NaCl ya provoca un estrés significativo en la planta, aunque permite el desarrollo de raíces (Grossi *et al.* 2020). Además, la capacidad de enraizamiento de la papa es severamente inhibida por 150 mM NaCl y la saturación de sal resultante de los espacios intracelulares en las partes vegetativas puede causar necrosis y muerte celular (Hmida-Sayari *et al.* 2005). Sin embargo, el nivel de tolerancia varía de un cultivar a otro, en muchos casos relacionado a las variaciones en la expresión génica.

## 2 - Transducción de señales en plantas

Los mecanismos de transducción de señales permiten a las plantas percibir los cambios en el entorno y adaptar su fisiología para poder crecer y desarrollarse (Boudsocq y Sheen, 2013; Chinnusamy *et al.* 2004; Sheen, 1996). Las señales varían en calidad y cantidad, estando las respuestas a los estímulos moduladas por la edad, la historia ambiental previa y los ciclos circadianos y circanales. Para las células maduras, la respuesta puede ser fisiológica y



bioquímica, mientras que para las células en crecimiento ésta puede ser morfológica y de desarrollo.

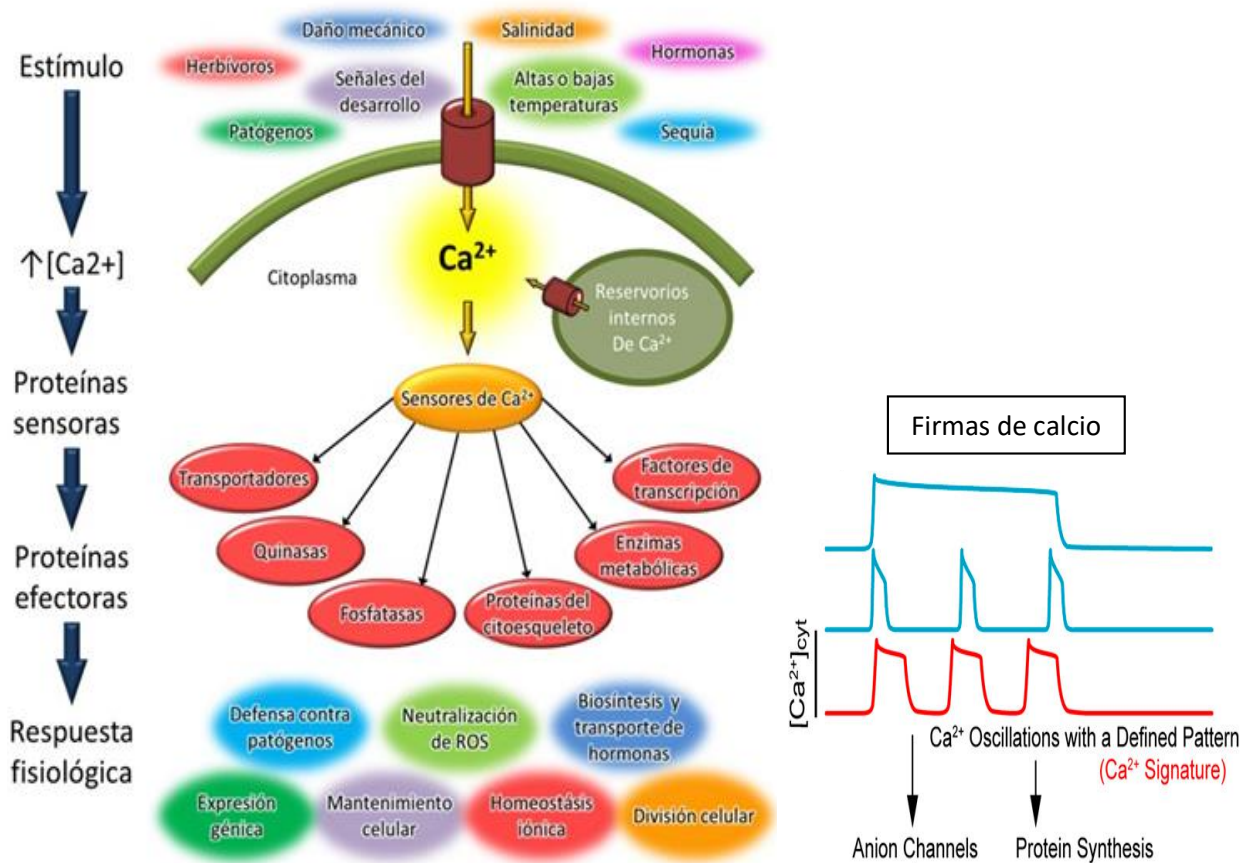
Las vías de transducción de señales transforman los estímulos ambientales externos en respuestas internas de la planta; van desde fluctuaciones reversibles de iones hasta cambios en la activación génica y eventos transcripcionales coordinados (Shi *et al.* 2018). Entre estas fluctuaciones de iones, el  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los más versátiles en las células vegetales.

## 2.1 - Calcio como segundo mensajero

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero ubicuo que posee un rol central en las vías de transducción de señales regulando varios procesos de adaptación, así como de desarrollo (Ludwig *et al.* 2004; Sheen, 1996; Shi *et al.* 2018). Está involucrado en varias respuestas a estímulos abióticos y bióticos, incluyendo luz, temperaturas altas o bajas, contacto, sal, sequía, estrés osmótico, hormonas vegetales, elicitores/efectores de patógenos y factores de nodulación (Knight y Knight, 2000; Kudla *et al.* 2010; Ludwig *et al.* 2004; Sanders *et al.* 1999; Sanders *et al.* 2002; Scrase-Field y Knight, 2003). Dichos estímulos inducen cambios espacio-temporales en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre que resultan de la acción concertada de transportadores, canales y bombas (Edel y Kudla, 2016; Miedema *et al.* 2001; Shi *et al.* 2018; Tanaka *et al.* 2010).

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  están definidas por su origen, localización, duración, frecuencia y amplitud, por lo que estos “flujos” de  $\text{Ca}^{2+}$  se denominan “firmas” (Fig. 1.4) (Boudsocq y Sheen, 2010; Webb *et al.* 1996). La cinética del  $\text{Ca}^{2+}$  depende de la fuerza del estímulo externo y es específica de célula, tejido u órgano (Allen *et al.* 1995; McAinsh *et al.* 1995; Stael *et al.* 2012). Es así que la información de una señal particular sería codificada por una firma de  $\text{Ca}^{2+}$  específica. Esto podría contribuir a una mayor diversidad en respuestas locales y sistémicas. Por lo tanto, la investigación sobre la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas ha utilizado sistemas modelo de una sola célula y, en paralelo, a nivel sistémico (White y Broadley, 2003). En este sentido, estudiar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular requiere la capacidad de controlar la dinámica de su concentración en las células vegetales con precisión tanto espacial como temporal. Una forma de hacerlo es mediante la obtención de imágenes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  *imaging*), técnica que muestra el estado del calcio de una célula, tejido o medio (Kanchiswamy *et al.* 2014; Russell, 2011). Las técnicas de imágenes de calcio aprovechan los llamados indicadores de calcio, moléculas fluorescentes que pueden responder a la unión de iones  $\text{Ca}^{2+}$  cambiando sus propiedades de fluorescencia. Existen dos clases principales de indicadores de calcio: indicadores químicos e indicadores genéticamente codificados (Kanchiswamy *et al.* 2014; Russell, 2011).

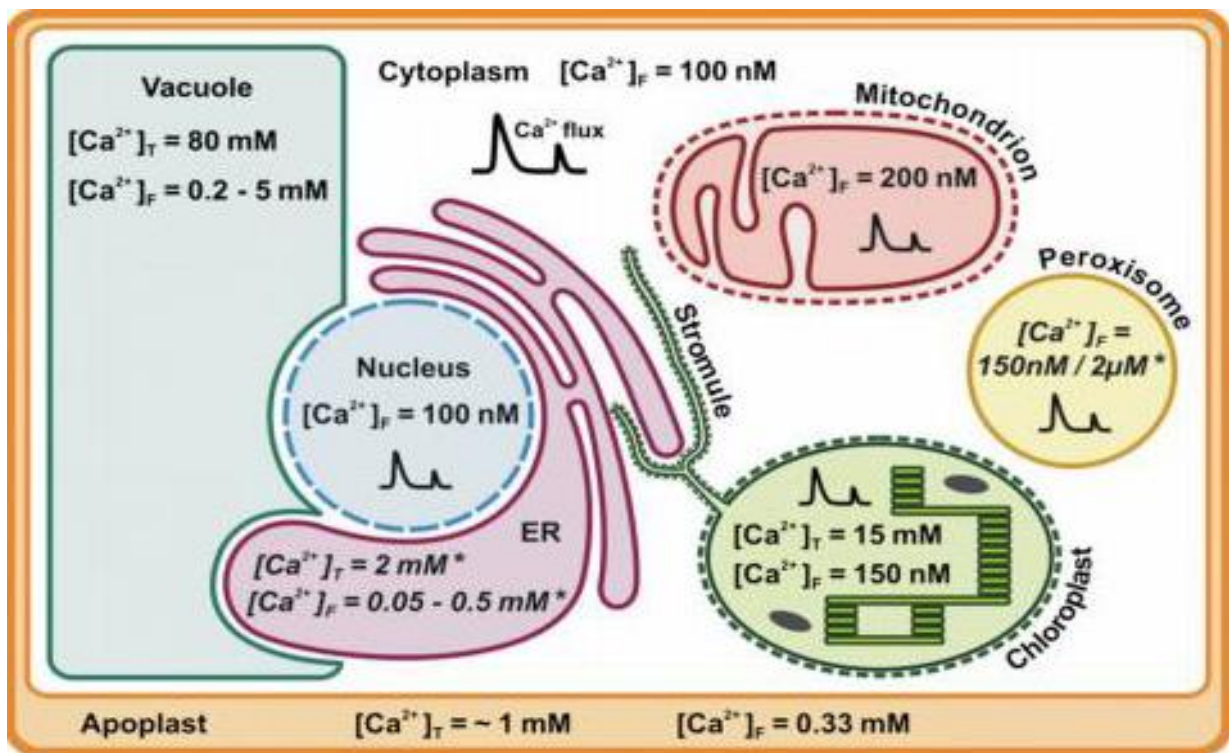
Las proteínas sensores interpretan las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y transmiten y amplifican esta información río abajo hacia las proteínas efectoras (Chinnusamy *et al.* 2004; Edel *et al.* 2017; Kudla *et al.* 2010; Shi *et al.* 2018), entre las cuales se encuentran enzimas, proteínas del citoesqueleto, FTs y transportadores que generan la respuesta fisiológica apropiada (Fig. 1.4).



**Fig. I.4 El paradigma del calcio.** Los estímulos ambientales y las seales de desarrollo son percibidos en la superficie celular o intracelularmente e inducen aumentos transitorios de  $Ca^{2+}$  (firmas de calcio, a la derecha) que son decodificados por proteínas sensoras que transmiten la señal río abajo a través de proteínas efectoras desencadenando la respuesta. Adaptado de *DeFalco et al. (2010); Kudla et al. (2010)*.

Se han reportado aumentos transitorios en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico en gran variedad de procesos fisiológicos, incluidas las respuestas a estreses abióticos, hormonas y patógenos. Algunos de estos cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico son provocados por segundos mensajeros celulares, tales como NAADP, IP<sub>3</sub>, IP<sub>6</sub>, esfingosina-1-fosfato, y cADPR (*Allen et al. 1995; Blatt et al. 1990; Drøbak y Ferguson, 1985; Gilroy et al. 1990; Lemtiri-Chlieh et al. 2003; Navazio et al. 2000; Schumaker y Sze, 1987*).

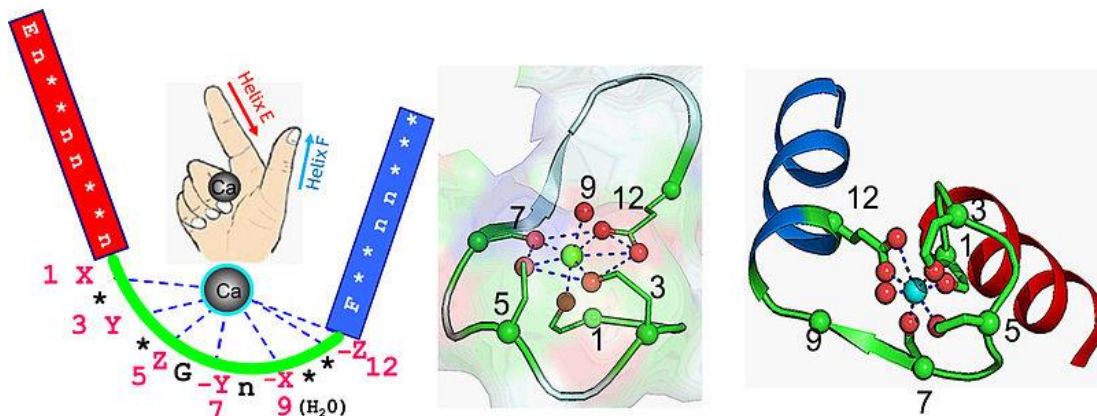
Debido a su flexibilidad al exhibir números de coordinación elevados y geometrías complejas, el  $Ca^{2+}$  puede formar complejos con proteínas, membranas y ácidos orgánicos (*Stael et al. 2012; Webb, 2013*). Pero esta misma característica convierte al  $Ca^{2+}$  en un compuesto tóxico a altas concentraciones al formar complejos insolubles con el fosfato que son inviables para la célula (*Stael et al. 2012*). Por este motivo, su concentración intracelular está sujeta a un estricto control espacio-temporal que contribuyó al surgimiento de diferentes depósitos intracelulares y de numerosas cascadas de señalización mediadas por este catión. Su concentración es elevada ( $10^{-3}$  M) en el medio extracelular, organelas y estructuras subcelulares y es baja en el citosol ( $10^{-7}$  M) (*Stael et al. 2012*) (Fig. I.5).



**Fig. 1.5 Resumen de las concentraciones orgánicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula vegetal.** Valores para las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  totales ( $[\text{Ca}^{2+}]_T$ ) y de reposo libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_F$ ) en los diferentes orgánulos (apoplasto, citoplasma, vacuola, núcleo, retículo endoplásmico ER, cloroplasto, mitocondria y peroxisoma). Los valores son aproximados y varían según el tejido o la especie de la planta; sin embargo, proporcionan una impresión general de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Para ER y peroxisomas no hay datos disponibles sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas. Los valores dados se toman del campo animal y se marcan con un (\*). Los flujos de calcio se ilustran con un símbolo doble en forma de pico. Tomado de [Stael et al. \(2012\)](#).

### 2.3 - Proteínas sensores de $\text{Ca}^{2+}$

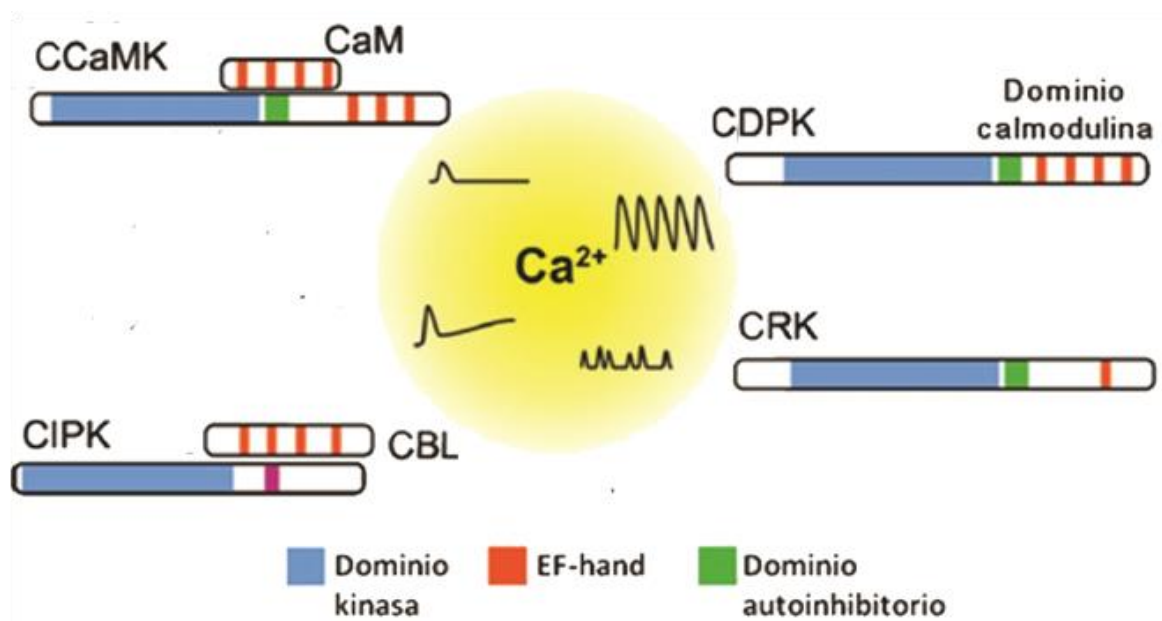
Los organismos eucariotas poseen proteínas sensores que detectan las firmas de  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales son decodificadas y transmiten la información a otros componentes río abajo, generando la respuesta adecuada ([Edel y Kudla, 2016](#)). La mayoría posee el motivo clásico *EF-hand*, que al coordinarse con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca cambios en la estructura proteica ([DeFalco et al. 2010](#); [Friedberg, 1988](#)). Este motivo, que consiste en 29 aminoácidos (aa) con una estructura hélice  $\alpha$  - *loop* - hélice  $\alpha$ , se asemeja a una mano derecha con los dedos índice y pulgar extendidos en ángulo recto y el resto de los dedos enroscados hacia la palma formando la curvatura o *loop* (Fig. 1.6), la cual consiste en 12 aa ácidos que coordinan el catión. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  genera cambios conformacionales que exponen bolsillos hidrofóbicos ([Chung et al. 2016](#); [Friedberg, 1988](#)), facilitando la interacción con otras proteínas. El ejemplo clásico de una proteína sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  es la calmodulina (CaM) ([Boudsocq y Sheen, 2013](#); [Chung et al. 2016](#); [DeFalco et al. 2010](#); [Friedberg, 1988](#); [Klimecka y Muszyńska, 2007](#)).



**Fig. 1.6 Estructura del motivo *EF-hand* presente en las proteínas sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ .** (izquierda) Ilustración del motivo canónico *EF-hand*- $\text{Ca}^{2+}$ , que contiene una topología de hélice-bucle-hélice de 29 residuos, muy similar al pulgar y el índice extendidos de la mano humana. El  $\text{Ca}^{2+}$  está coordinado por ligandos dentro del bucle de 12 residuos, incluidos siete átomos de oxígeno de los grupos carboxilo o hidroxilo de la cadena lateral (posiciones de secuencia del bucle 1, 3, 5, 12), un grupo carbonilo de la cadena principal (posición 7) y un agua (a través de la posición 9). El residuo en la posición 12 sirve como ligando bidentado. (centro) El bolsillo de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  adopta una geometría bipiramidal pentagonal. n significa residuo hidrofóbico. (derecha) Estructura 3D de un típico motivo canónico *EF-hand* de calmodulina (código PDB: 3cln). Adaptado de Zhou *et al.* (2009).

Debido a la similitud de la química de coordinación entre magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y  $\text{Ca}^{2+}$  y la alta concentración fisiológica de  $\text{Mg}^{2+}$ , a menudo se observa que éste se une a proteínas endógenas de unión a calcio. Por lo tanto, los motivos de unión a calcio tales como los *EF-hand* a menudo se clasifican como específicos de calcio, de magnesio o de tipo mixto (Tang y Yang, 2013). En estos motivos, los *EF-hand* suelen aparecer en pares denominados lóbulos EF, los cuales son una unidad de evolución y también una unidad estructural de dominios *EF-hand* (Kawasaki y Kretsinger, 2017). Se postula que pudieron surgir por duplicación y fusión génica, pero al tratarse de dominios tan cortos (unos 30 residuos) pudieron haber surgido *de novo* varias veces (Kawasaki y Kretsinger, 2017).

En plantas, las proteínas sensores pueden clasificarse en sensores-relé (*sensor-relay*) y en sensores-efectoras o sensores-transductoras. Las primeras, entre ellas CaM, *calcineurin-B-like* (CBL) o *calmodulin like proteins* (CML), no poseen actividad enzimática propia y deben interaccionar con proteínas efectoras (por ejemplo, PKs) para transducir la señal (Boudsocq y Sheen, 2012; Chung *et al.* 2016; Friedberg, 1988; Klimecka y Muszyńska, 2007). En Arabidopsis, el 4% de su genoma codifica para PKs (denominadas en conjunto como quinoma), que pueden clasificarse en diferentes familias y subfamilias de acuerdo con su función y filogenia (Champion *et al.* 2004; Zulawski *et al.* 2014). Para decodificar firmas de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a diversos estímulos, las plantas poseen cuatro familias de PKs: PKs dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs o CPKs), PKs relacionadas con CDPKs (CRKs), PKs activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM (CCaMKs) y PKs relacionadas con la no fermentación de sacarosa 3 (SnRK3s) (DeFalco *et al.* 2010; Harper *et al.* 2004; White y Broadley, 2003). Las SnRK3s también son conocidas como CIPKs, PKs que interactúan con CBL (Fig. 1.7).



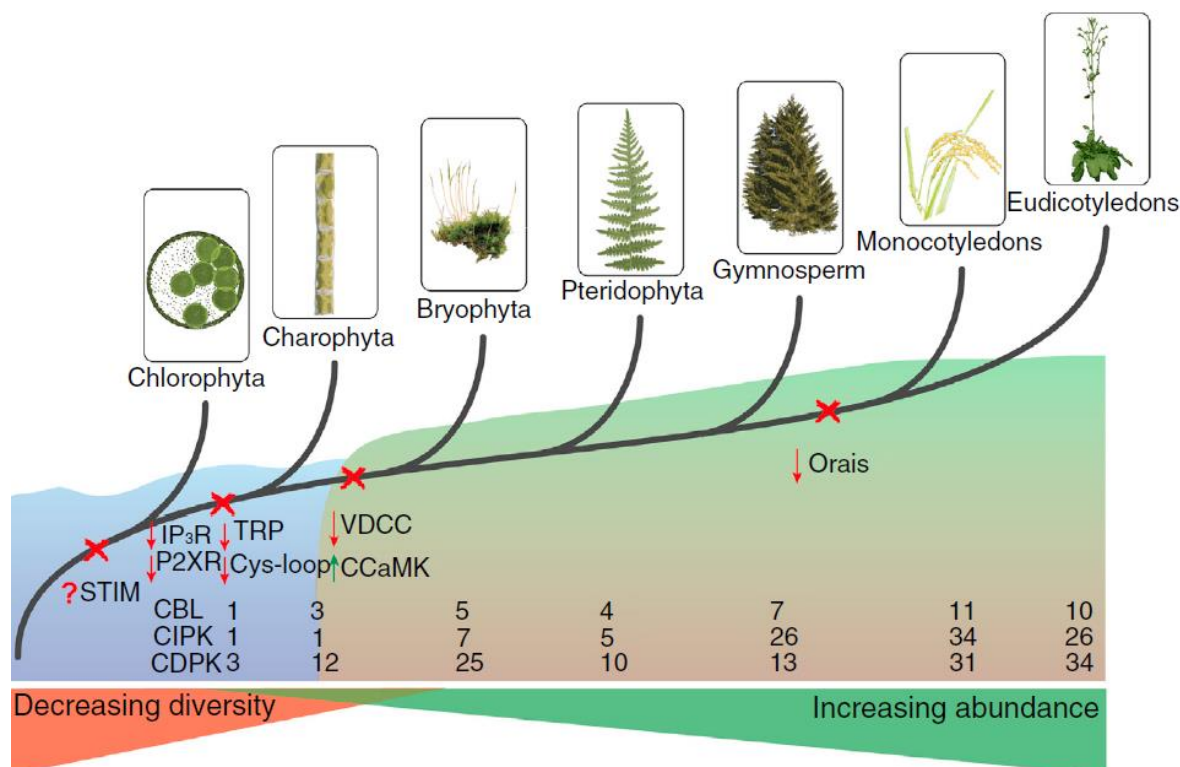
**Fig. I.7 Proteínas sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas.** CaMs, CMLs y CBLs contienen sitios *EF-hand* (rojo) y regulan proteínas blanco. No contienen dominios adicionales. CBLs interactúan y modulan la actividad de las CIPKs. CDPKs, CRKs, CCaMK y CIPKs son PKs de serina/treonina (dominio quinaza en azul). En verde se señala el dominio autoinhibitorio. Adaptado de [Batistič y Kudla \(2012\)](#).

Las CIPKs/SnRK3s y las CCaMKs son proteínas efectoras que requieren de la interacción con el sensor  $\text{Ca}^{2+}$ -CBL ([Batistič et al. 2010](#); [Edel y Kudla, 2015](#)) o con  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ([Wang et al. 2015](#)) para su activación. Las CCaMKs tienen un dominio de unión a CaM pero a su vez forman una quimera entre una PK y una proteína similar a visinina ([Patil et al. 1995](#)). La visinina es un miembro de la superfamilia de proteínas sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales, todas ellas con tres sitios *EF-hand* funcionales (2<sup>do</sup>, 3<sup>ero</sup> y 4<sup>to</sup>) con alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , el primer *EF-hand* ha degenerado y se estima que puede ser un sitio de interacción proteína-proteína por ser la parte más variable de la secuencia ([Braunewell y Klein-Szanto, 2009](#)). La estructura de la CCaMK de plantas sugiere que está regulada por múltiples controles y que podría desempeñar un papel único en la señalización del calcio. En efecto, se reportó que el gen *DMI3* de *Medicago truncatula* codifica una CCaMK que es esencial para que ocurra el proceso de nodulación en leguminosas ([Lévy et al. 2004](#)).

Las CDPKs comprenden la familia más grande de quinasas de proteínas y se consideran sensores-transductores, ya que en ellas el dominio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y el dominio catalítico se encuentran en el mismo péptido, es decir que el sensor está unido al efector y genera una respuesta. Las CDPKs se originaron por la fusión de genes de protistas que codificaban para CaMK y para calmodulina ([Harmon et al. 2000](#); [Harper et al. 2004](#); [Zhang y Choi, 2001](#)), pero se desconoce cómo este gen CDPK ancestral se diversificó en una familia multigénica en las plantas ([Valmonte et al. 2014](#)). [Mohanta et al. \(2019\)](#) proponen que, durante el curso de la evolución, las CMLs evolucionan en CaM y, posteriormente, las CaM parecen haberse fusionado con moléculas de PKs para dar lugar a CDPKs con nuevas funciones, distintas y múltiples.

La transición del hábitat acuático al terrestre trajo consigo nuevas condiciones físicas y desafíos para las plantas, como la desecación, el acceso reducido al agua y la nutrición, los cambios bruscos de temperatura y el contacto más cercano con los microorganismos

(Valmonte *et al.* 2014). En este sentido, estudios evolutivos de las plantas evidencian dos tendencias: (i) una pérdida de diversidad de los componentes del flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la evolución de las algas y (ii) un aumento en abundancia genética de componentes de decodificación durante la evolución de las plantas terrestres (Edel *et al.* 2017; Hamel *et al.* 2014) (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8 Evolución de las proteínas sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Pérdidas (flecha roja) y ganancias (flecha verde) de componentes de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  están asociados con su respectiva posición en el árbol evolutivo vegetal. Se indica el número de CBL, CIPK y CDPK de especies representativas para cada *phylum* (Clorofito: *Ostreococcus tauri*; Carofita: *Klebsormidium flaccidum*; Briofita: *Physcomitrella patens*; Pteridófito: *Selaginella moellendorffii*; Gimnosperma: *Pinus taeda*; Monocotiledóneas: *Oryza sativa*; Eudicotiledóneas: *Arabidopsis thaliana*). Tomado de Edel *et al.* (2017).

## 2.4 - Quinasas de proteínas dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ (CDPKs)

Las CDPKs están presentes en plantas, algas verdes y protistas (ciliados y apicomplexa difieren hasta en un 70% de la secuencia aminoacídica respecto de las plantas) (Hamel *et al.* 2014; Han *et al.* 2013; Hrabak *et al.* 2003; Valmonte *et al.* 2014). En angiospermas es una familia multigénica, comprendiendo 40 genes en maíz (Kong *et al.* 2013), 34 en *Arabidopsis* (Cheng *et al.* 2002; Harmon *et al.* 2001), 31 en arroz (Asano *et al.* 2005), 20 en trigo, 20 en álamo (Cai *et al.* 2015), 16 en sandía (Wei *et al.* 2019), 16 en frutilla (Llop-Tous *et al.* 2002) y 30 en gramilla (Wen *et al.* 2020). En un análisis filogenético los miembros se agrupan en 4 grupos (I a IV), estando los grupos II y III subdivididos y siendo el grupo IV el más divergente. Un análisis filogenético realizado en *Arabidopsis* usando sólo el KD sostiene la hipótesis de que CDPKs, CRKs y PEPRK tienen un origen evolutivo común (Hrabak, 2000; Hrabak *et al.* 2003). La presencia de *EF-hands* degenerados en las CRKs, sugiere que éstas pueden haber surgido hace

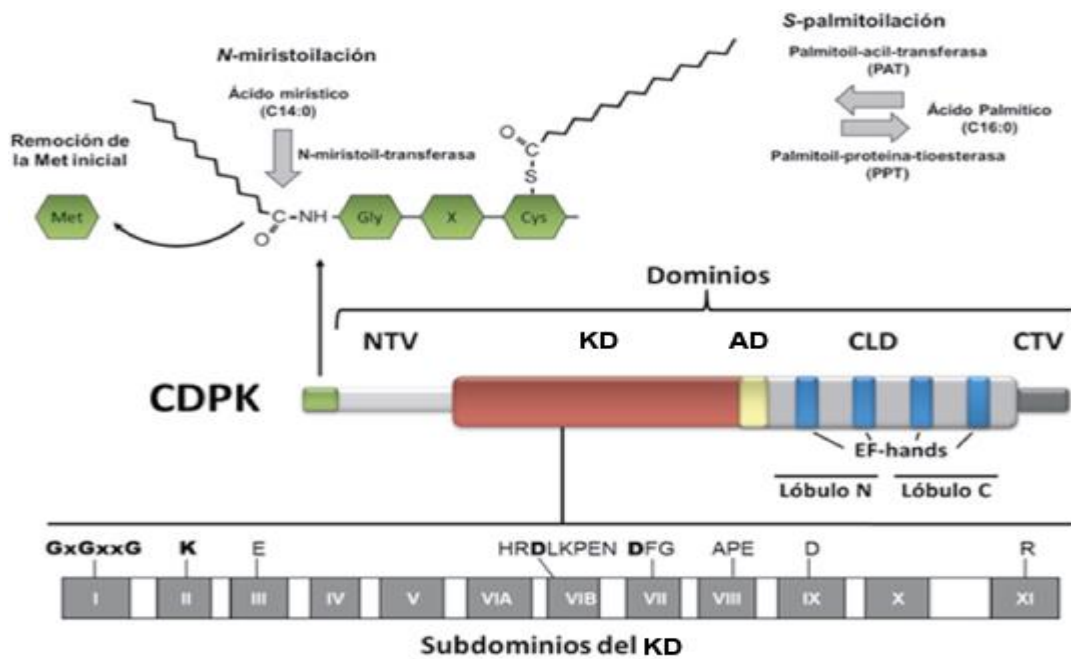
relativamente poco tiempo en la evolución de un grupo distinto de CDPKs (Valmonte *et al.* 2014). En apoyo de esta hipótesis, los miembros del grupo IV y las CRKs presentan una estructura génica distinta del resto de la CDPKs. Además, el grupo III forma un clado separado de los grupos I y II, mientras que la división entre éstos pareciera ser un evento evolutivo más reciente (Valmonte *et al.* 2014).

La comparación de la familia CDPK de angiospermas con la de gimnospermas, pteridofitas, briofitas y algas verdes sugiere que esta familia CDPK se modeló cuando las plantas colonizaron la tierra, ya que los grupos I-IV se conservan en briofitas y pteridofitas, mientras que las CDPKs de algas verdes son altamente divergentes entre sí, evolucionaron independientemente (Edel *et al.* 2017) con tres linajes separados de todas las CDPKs de plantas terrestres y un cuarto linaje que se agrupa con los grupos I a III pero en un clado distinto (Valmonte *et al.* 2014).

La identidad nucleotídica entre las CDPKs de las plantas terrestres es del 58%. Se reportó que la familia CDPK de angiospermas surgió de eventos más recientes de duplicación de genes (hace unos 268-340 millones de años) que son comunes a todas las embriofitas más que a la diversificación de candidatos linaje específicos, lo cual sugiere, a su vez, que la diversificación de las CDPKs (incremento en complejidad fisiológica y estructural por poliploidización) podría haber sido esencial en la transición o adaptación al medio terrestre (Valmonte *et al.* 2014). De hecho, hay ocho pares de genes de CDPK parálogos con un nivel de homología significativo, tanto en papa (Fantino *et al.* 2017) como en algodón (Liu *et al.* 2014), tomate (Hu *et al.* 2016) y pimiento (Cai *et al.* 2015). Además, el análisis de genes parálogos revela que la mayoría de los genes duplicados tuvieron una divergencia evolutiva antes de la separación de las especies del género *Solanum* (Aversano *et al.* 2015), aunque sus funciones no divergieron mucho (Liu *et al.* 2014; Hu *et al.* 2016). Cabe destacar que los mapas genéticos de tomate y papa son casi colineares (Tanksley *et al.* 1992), y al comparar ambas familias de CDPKs se observa que la distribución cromosómica es similar.

#### **2.4.1 - Estructura y localización subcelular de CDPKs**

Las CDPKs son proteínas monoméricas con un peso molecular (PM) que oscila entre 40-90 kDa y que presentan cinco dominios (Fig. 1.9): (i) un dominio amino terminal variable (NTV), (ii) un dominio quinasa de serina (S)/treonina (T) altamente conservado (KD), (iii) un dominio bisagra, autoinhibitorio o pseudosustrato (AD) que interacciona con el sitio activo, (iv) un dominio regulatorio similar a CaM (CLD) y (v) un dominio carboxilo terminal (C-terminal) de longitud variable (CTV) (Harmon, 2003). En el KD los responsables del anclaje y orientación del trifosfato de adenosina (ATP) son: el subdominio I (motivo GXGXXG), la lisina (K) del subdominio II, y el ácido aspártico (D) en el subdominio VII (motivo DFG), los cuales están estrictamente conservados al igual que el D del subdominio VIb (motivo DLK) involucrado en la reacción de transferencia del fosfato ( $PO_4^{3-}$ ). El CLD posee dos lóbulos *EF-hand* (N y C) cada uno conteniendo los motivos *EF-hand*, responsables de unir  $Ca^{2+}$ . La presión evolutiva para mantener una alta conservación de secuencia en las regiones KD, AD y CLD contribuye a varios ejemplos de similitud funcional, redundancia y superposición entre muchas CDPKs; pero no así en las regiones terminales variables (Valmonte *et al.* 2014).



**Fig. 1.9 Estructura de las CDPKs.** NTV: dominio amino terminal variable; KD: dominio quinasa de proteínas serina/treonina, se señalan los aminoácidos conservados en todas las PKs de eucariotes; AD: dominio autoinhibitorio, CLD: dominio similar a CaM, CTV: dominio C-terminal variable. En la figura se detallan las enzimas que participan en las N-acilaciones. Figura adaptada de [Hamel et al. \(2014\)](#).

La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la recoverina (otro miembro del grupo de proteínas neuronales de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ) induce un cambio conformacional que conduce a la exposición superficial de sus partes hidrofóbicas y a la exposición de la cadena lateral del miristoilo (mecanismo molecular denominado *Ca<sup>2+</sup>-myristoyl switch*), haciendo que estas estructuras estén disponibles para la interacción con las membranas celulares y/o las proteínas diana ([Braunewell y Klein-Szanto, 2009](#)). Por su parte, la localización subcelular de las CDPKs se regula por acilaciones en el dominio NTV de la proteína ([Lu y Hrabak, 2013](#)). La mayoría de las CDPKs contienen un sitio de N-miristoilación (glicina en la posición 2, G<sub>2</sub><sup>\*</sup>), así como secuencias consenso que permitirían su posterior palmitoilación en los residuos de cisteína C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> o C<sub>5</sub> ([Cheng et al. 2002](#)). Se encontraron isoformas asociadas a membrana plasmática (MP), núcleo, retículo endoplasmático (RE), cuerpos lipídicos, peroxisoma y aparato de Golgi ([Asai et al. 2013](#); [Boudsocq et al. 2012](#); [Brandt et al. 2012](#); [Coca y San Segundo, 2010](#); [Dammann et al. 2003](#); [Gutermuth et al. 2013](#); [Kawamoto et al. 2015](#); [Raíces et al. 2003](#)). Algunas están tanto en el citoplasma (solubles) como asociadas a membranas ([Berendzen et al. 2012](#); [Boudsocq et al. 2010](#); [Mehlmer et al. 2010](#)), mientras que unas pocas parecen ser solamente solubles ([Rodríguez Milla et al. 2006](#); [Zhu et al. 2007](#)).

La N-miristoilación ocurre co-traduccionalmente y es irreversible ([Resh, 2006](#)) confiriendo una asociación a membrana débil, pudiendo prevenirse por mutaciones G2A (alanina, A) ([Benetka et al. 2008](#); [Lu y Hrabak, 2002](#); [Mehlmer et al. 2010](#); [Raíces et al. 2003](#)); mientras que la posterior palmitoilación (reversible) resulta en un anclaje de membrana más estable ([Resh, 2006](#)). La palmitoilación, al ser reversible, permite que las CDPKs se desvinculen de la membrana y se transloquen al citosol o al núcleo. En este sentido, se han reportado

\* En el caso de tratarse de residuos fosforilados, la posición se indica como superíndice.



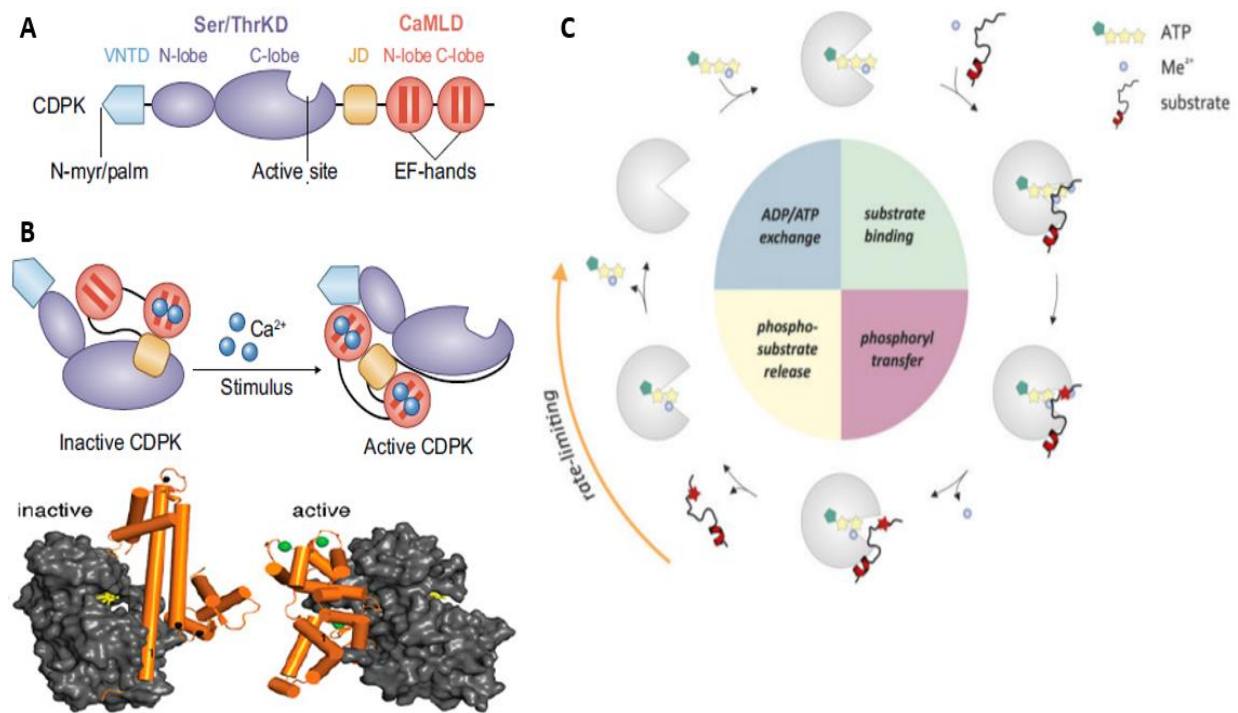
algunos cambios en la localización inducidos por estímulos; por ejemplo, McCPK1 de *Mesembryanthemum crystallinum* cambia su localización de membrana a núcleo, RE y filamentos de actina como respuesta a una reducción en la humedad (Chehab *et al.* 2004).

Los NTVs también se han asociado con el reconocimiento del sustrato (Ito *et al.* 2010; Itoh *et al.* 2011). Se ha reportado que NtCDPK1 y StCDPK3 (Grandellis *et al.* 2016; Ito *et al.* 2010) fosforilan a los FTs bZIP *Repressor of Shoot Growth* (RSG) de tabaco y papa, respectivamente. La quimera que contiene el NTV de NtCDPK1 (de *Nicotiana tabacum*) fusionado a AtCPK9 (de *Arabidopsis thaliana*) también puede fosforilar a RSG, aunque la AtCPK9 nativa no puede hacerlo (Ito *et al.* 2010). StCDPK5, localizada en la MP, reconoce la NADPH oxidasa *in vivo* usando el sistema de expresión heterólogo en *Nicotiana benthamiana*, llamada *respiratory burst oxidase homolog* (StRBOHB) (Asai *et al.* 2013). La sustitución del NTV de StCDPK5 con el de SICDPK2 de tomate abolió las capacidades de activación y fosforilación de StRBOHB *in vivo* y reubicó la CDPK quimérica en la red trans-Golgi, como se observó para SICDPK2. Por el contrario, SICDPK2 sustituido con el NTV de StCDPK5 se localizó en la MP y activó StRBOHB. La forma nativa de SICDPK2 fosforila a la oxidasa *in vitro* pero no *in vivo* (Asai *et al.* 2013).

La especificidad de la señalización de las CDPKs podría ser consecuencia de la co-expresión espacio-temporal de las isoformas y sus sustratos, ya sea por su abundancia en un tipo de célula particular (Harper *et al.* 2004; Leonhardt *et al.* 2004) o porque se expresan específicamente en respuesta a distintos estímulos (Ray *et al.* 2007; Wan *et al.* 2007). Otro factor de importancia es su localización subcelular; el confinamiento a un determinado compartimento aporta una gran especificidad ya que limita el número de proteínas blanco accesibles y determina qué señales de  $Ca^{2+}$  se pueden detectar. A esto se debe agregar que las CDPKs muestran diferentes dependencias a  $Ca^{2+}$  y afinidades, y son reguladas por autofosforilación (Boudsocq *et al.* 2012, Fantino *et al.* 2017). Todos estos factores en conjunto determinan cuándo, dónde y qué tipo de señal de  $Ca^{2+}$  activará a una CDPK específica y qué blanco tendrá (Itoh *et al.* 2011).

#### 2.4.2 - Modelos de activación de las CDPKs

Se postulan dos modelos (Flores-Vieyra *et al.* 2005; Harper y Harmon, 2005): el primero propone que, al unir el  $Ca^{2+}$ , el CLD se une al dominio bisagra desplazando el AD y activando la quinasa; el segundo (Fig. 1.10 A y B) postula que, cuando los niveles de  $Ca^{2+}$  en la célula son basales, el dominio bisagra se encuentra unido al CLD. El lóbulo C-terminal del dominio regulatorio posee dos iones  $Ca^{2+}$  unidos. Cuando el lóbulo N-terminal une otros dos iones  $Ca^{2+}$  se produce la activación. Se propone que la conformación del lóbulo N-terminal se modifica cuando une  $Ca^{2+}$  e induce un cambio conformacional en la interacción del AD con el KD (Christodoulou *et al.* 2004). Asimismo se ha reportado que las CDPKs pueden ser activadas por fosfolípidos, proteínas 14-3-3 y fosforilación (Camoni *et al.* 1998; Harper *et al.* 1993; Romeis *et al.* 2000; Szczegieliński *et al.* 2005). En la Fig. 1.10 C se muestra el ciclo catalítico de la quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Knape *et al.* 2015), común entre las quinasas de proteínas, entre ellas las CDPKs.



**Fig. 1.10 Modelos de activación de las CDPKs.** **A** Se propone una estructura flexible, pero de movimiento limitado (por analogía de tipo balero). **B** En condiciones de reposo, las CDPK se autoinhiben mediante la interacción intramolecular entre JD (o AD) y el sitio activo del KD. La estructura se estabiliza aún más por las interacciones entre JD y el lóbulo C del CaMLD (o CLD), mientras que el lóbulo N del CaMLD interactúa con el lóbulo N del KD. Cuando aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto el lóbulo N como el lóbulo C del CaMLD interactúan con JD, lo que induce un gran cambio conformacional que libera el sitio activo (representado en las estructuras tridimensionales). El lóbulo C del CaMLD ahora interactúa con VNTD (o NTV) y el lóbulo N del KD mientras que el lóbulo N del CaMLD está cerca del lóbulo C del KD. **C** Ciclo catalítico de la PKA. Adaptado de [Delormel y Boudsocq \(2019\)](#); [Flores-Vieyra et al. \(2005\)](#); [Knape et al. \(2015\)](#).

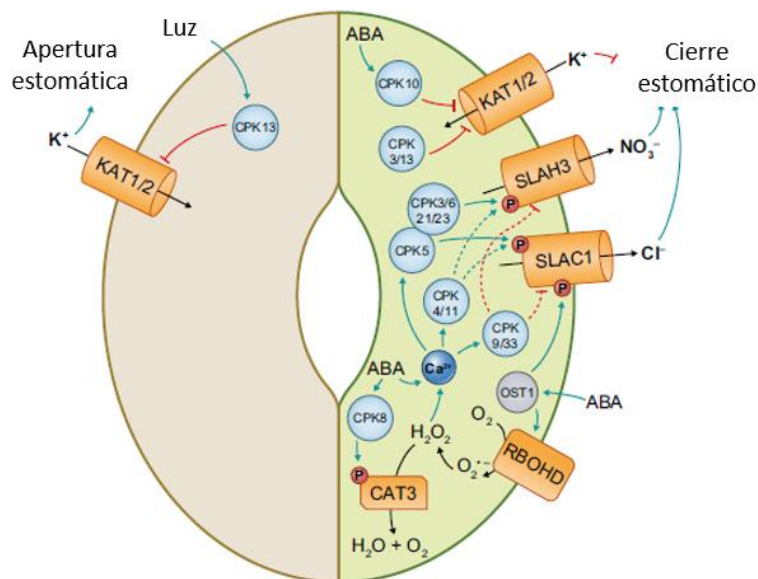
## 2.5 - Procesos en los que están involucrados las CDPKs

Los eventos de diversificación funcional de las CDPKs pueden ser ancestrales, ya que son compartidos por una amplia gama de taxones de monocotiledóneas y dicotiledóneas (como desarrollo y respuesta de presión osmótica), mientras que algunos pueden ser recientes, ya que son exclusivos de una especie o compartidos entre taxones estrechamente relacionados (tales como respuesta al frío, a hongos y a bacterias) ([Valmonte et al. 2014](#)). Estos eventos dependen de las limitaciones ambientales a las que las plantas han estado expuestas y pueden haber surgido en varias ocasiones; por ejemplo, los linajes ancestrales de las especies de plantas modernas pueden haber pasado por varias rondas de adaptación a la temperatura a lo largo de las sucesivas glaciaciones. Como las agrupaciones evolutivas pueden considerarse el resultado de duplicaciones entre genes antiguos, [Valmonte et al. \(2014\)](#) plantea la hipótesis de que los genes ancestrales de las CDPKs de las plantas tenían múltiples funciones, tanto en el desarrollo de estructuras reproductivas como en el mantenimiento de la homeostasis celular; pero, debido a múltiples eventos de duplicación, éstos se han subfuncionalizado en respuesta al estrés osmótico o del desarrollo y se han neofuncionalizado en respuesta a los desafíos de la vida terrestre y los entornos cambiantes como la temperatura, la sequía, las infecciones y la herbivoría.

Funcionalmente, las CDPKs de los 4 grupos están implicadas en: (i) procesos de

desarrollo y (ii) señalización del estrés biótico (principalmente frente a *Phytophthora infestans*) (Blanco *et al.* 2008) y abiótico (principalmente sequía y salinidad) (Boudsocq y Sheen, 2013; Chinnusamy *et al.* 2004; Hamel *et al.* 2014; Schulz *et al.* 2013; Valmonte *et al.* 2014). Entre las funciones más específicas se incluye la formación del tubo polínico, el movimiento del estoma regulado por hormonas, el desarrollo de semillas y las vías de defensa celular como la señalización del patrón molecular asociado a microbios (MAMP) y la activación de MAPKs (Boudsocq *et al.* 2010, Boudsocq y Sheen, 2012).

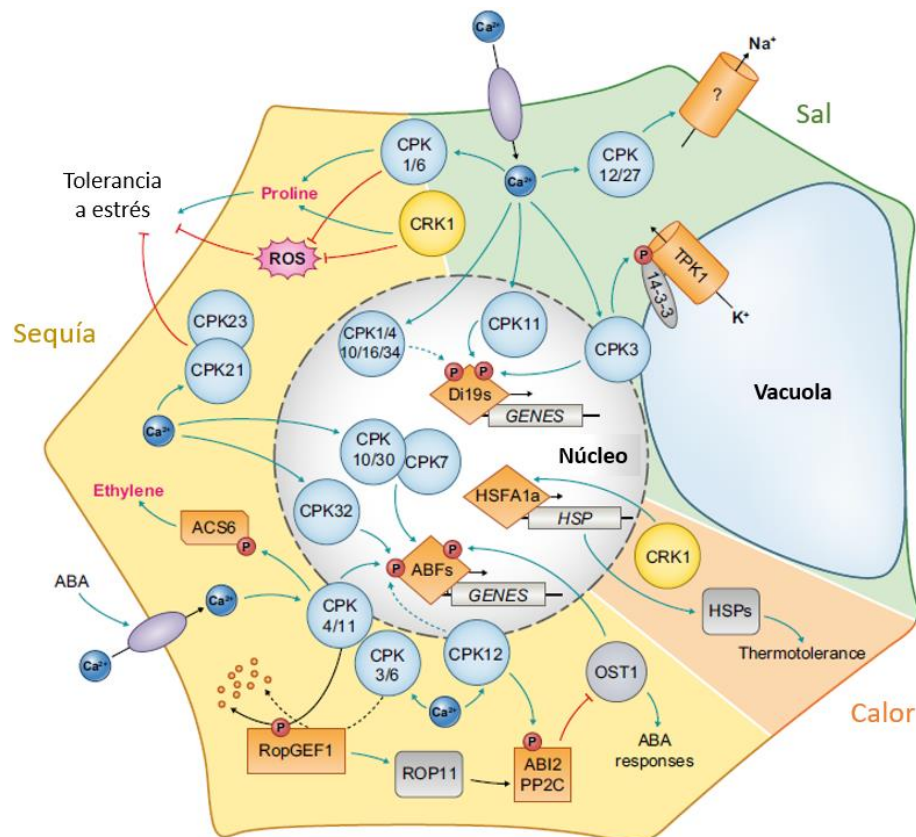
En cuanto al estrés salino y la sequía, una de las respuestas clave de las plantas es el cierre estomático, en particular mediado por la fitohormona ABA (ácido abscísico) para limitar la pérdida de agua, lo cual es el resultado de la activación de las corrientes externas de aniones y  $K^+$  para permitir el flujo de iones y la contracción celular. Varios trabajos vinculan las CDPKs con la señalización de ABA y la regulación de los estomas (Yu *et al.* 2007). Se han detectado veinte AtCPKs en células de la guarda con niveles variables de expresión, entre ellas AtCPK13 involucrada en la apertura estomática en respuesta a luz y AtCPK3/4/5/8/9/10/11/13/23/33 que regulan el cierre estomático (Fig. I.11) (Delormel y Boudsocq, 2019). También se reportó que la isoforma AtCPK2 fosforila al canal SLAH3 (Geiger *et al.* 2011) y que diversas CDPKs regulan canales aniónicos en respuesta a ABA (Scherzer *et al.* 2012).



**Fig. I.11 AtCPKs involucradas en la apertura y cierre estomático.** KAT1/2 son canales de  $K^+$ ; SLAH3 y SLAC1 son canales aniónicos; CAT3 es la catalasa 3; RBOHD *respiratory burst oxidase homolog*; OST1 *open stomata1*; P en círculo rojo indica fosforilación. Adaptado de Delormel y Boudsocq (2019).

Asimismo, diversas AtCPKs y AtCRK1 median la respuesta a sequía, salinidad y calor a través de la regulación de las corrientes de iones, producción de ROS y de prolina, biosíntesis de etileno, expresión de genes de respuesta a estrés y señalización PP2C de ABA (Delormel y Boudsocq, 2019) (Fig. I.12). La sequía y el estrés salino también desencadenan una gran reprogramación transcripcional que está parcialmente mediada por las AtCPKs, a través de la regulación de al menos dos tipos de factores de transcripción. Por ejemplo, los ABFs que unen al elemento sensible a ABA (ABRE), constituyen una familia de factores de transcripción bZIP implicados en ABA y señalización de estrés (Delormel y Boudsocq, 2019). AtCPK32 interactúa y

fosforila ABF4 *in vitro*, lo cual fue importante para la actividad de transactivación inducida por ABA de ABF4 (Choi *et al.* 2005). De manera similar, AtCPK4 fosforiló ABF2 *in vitro* y estimuló su actividad en un ensayo transitorio de protoplastos (Lu *et al.* 2013). También los factores de transcripción AtDi19 son fosforilados por CDPKs (Rodríguez Milla *et al.* 2006).



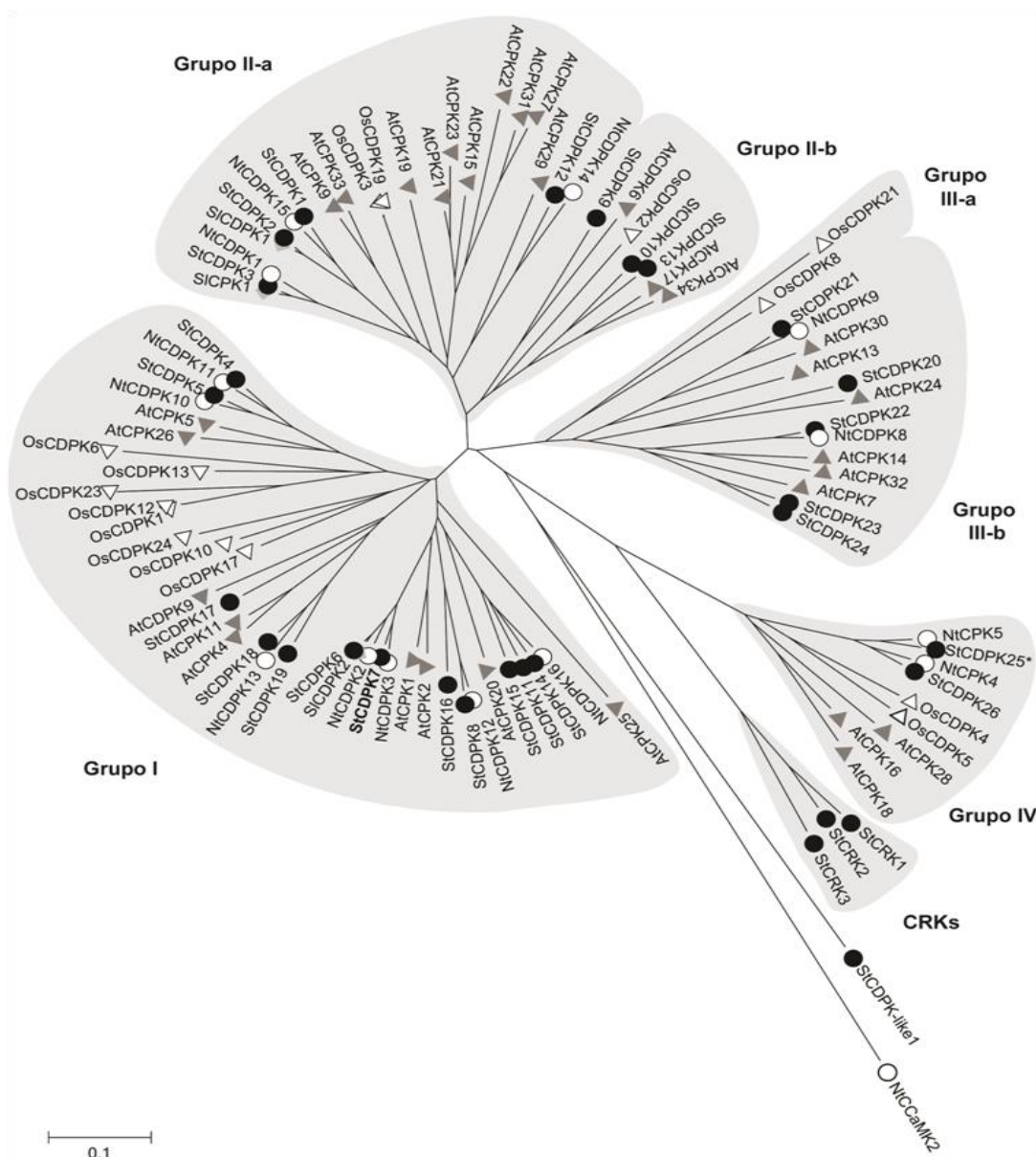
**Fig. I.12 AtCPKs y AtCRK1 involucradas en respuesta a sequía, salinidad y calor.** Estas proteínas median las respuestas de las plantas a la salinidad (panel verde), la sequía (panel amarillo) y el calor (panel naranja). Los sustratos directos de CPK se representan en naranja y la P en círculo rojo indica fosforilación. TPK1 bomba de K<sup>+</sup>; HSPs *heat shock proteins* (proteínas de choque térmico); ROP11 regulador negativo de ABA; Di19, HSF1a y ABF son FTs; ACS6 producción de etileno en respuesta a flagelina bacteriana; RopGEF1 regulador positivo del crecimiento del pelo radicular; ABI2 y PP2C reguladores negativos de OST1 (*open stomata*). Adaptado de Delormel y Boudsocq (2019).

En *Arabidopsis*, cuatro CPKs del grupo III (AtCPK8/10/13/32) con sólo tres sitios *EF-hand*, se relacionan con la respuesta a sal, sequía o cierre estomático (Delormel y Boudsocq, 2019). AtCPK32 que fosforila a ABF4 (Choi *et al.* 2005) es inducida en condiciones de salinidad y se expresa especialmente en raíz, estigma, anteras y zonas de abscisión. AtCPK13 inhibe los canales de potasio KAT1/2 y reduce la apertura estomática actuando de una manera independiente de ABA (Ronzier *et al.* 2014), mientras que AtCPK8/10 regulan positivamente la tolerancia a sequía y la señalización de ABA mediante la regulación de la apertura estomática; AtCPK10 regula las corrientes de ingreso de K<sup>+</sup> y la expresión génica de ABF (Zou *et al.* 2010), y AtCPK8 fosforila a la catalasa (CAT3) regulando así los niveles de ROS (Zou *et al.* 2015). A su vez, otra isoforma del grupo III, AtCPK7, es un regulador negativo de la conductividad hidráulica de la raíz que interfiere con la función de las acuaporinas (Li *et al.* 2015). Se ha reportado que la sobreexpresión de diferentes isoformas de CDPK confiere resistencia a la salinidad en arroz,

tabaco y Arabidopsis (Campo *et al.* 2014; Chen *et al.* 2011; Kang *et al.* 2013; Saijo *et al.* 2000; Zou *et al.* 2010).

## 2.6 - Antecedentes de CDPKs en papa

La familia CDPK de *papa* está compuesta por veintiséis miembros que se agrupan en cuatro grupos (I-IV) (Fantino *et al.* 2017) (Fig. I.13) al igual que las AtCPKs y las de arroz (OsCPKs) (Asano *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2002). El grupo I es el más grande con doce miembros, mientras que sólo dos isoformas pertenecen al grupo IV. Asimismo, se identificaron tres CRKs (CRK1/2/3) que se agrupan en una rama más relacionada con el grupo IV.



**Fig. I.13** Árbol filogenético de las CDPKs de papa, Arabidopsis, arroz, tabaco y tomate. Se incluyen las secuencias codificantes de 26 genes CDPK de papa (*St*, *S. tuberosum*, ●), 31 genes de Arabidopsis (*At*, *A. thaliana*, ▲), 14 genes de tabaco (*Nt*, *Nicotiana tabacum*, ○), 3 genes de tomate (*Sl*, *Solanum lycopersicum*, ◆) y 17 genes de arroz (*Os*, *Oryza sativa*, △). Secuencia de *NtCCaMK2* como grupo externo (*outgroup*). Los grupos dentro de la familia CDPK están indicados por números romanos. También se muestran tres CRKs y una CDPK-like de papa. Tomado de Fantino *et al.* 2017.

Mientras los miembros de los grupos I a III son proteínas ácidas (pI entre 5,02 y 6,59), las del grupo IV y las CRKs son básicas (pI entre 8,85 y 9,34). También se identificó una secuencia designada como CDPK-like 1 que no pertenece a la superfamilia CDPK/CRK cuyo homólogo más cercano en *Arabidopsis* es la quinasa relacionada con la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (PEPRK) (Fantino *et al.* 2017). El peso molecular de CDPKs/CRKs depende principalmente de la longitud de los NTVs altamente divergentes (31 a 134 aa); además, contienen un CTV relativamente corto (5 a 41 aa) y básico (pI: 8.59 a 12.30) que difiere entre los diferentes grupos, siendo sólo el CTV de StCDPK11 anormalmente largo y ligeramente ácido (70 aa, pI: 6,92) (Fantino *et al.* 2017). Según datos de *RNAseq* del *Spud DB*, la expresión de StCDPK8/11/14/15/19 se restringe a órganos florales, mientras que la expresión StCDPK4/5/6/7/17/18 es regulada en respuesta a estreses bióticos (Fantino *et al.* 2017).

Las secuencias nucleotídicas de CDPKs, CRKs y CDPK-like 1 de papa codifican proteínas monoméricas con un KD altamente conservado (48-88% de identidad), pero sólo las CDPKs contienen un AD y un CLD funcionales (Fantino *et al.* 2017). El AD presenta 42-91% de identidad entre las distintas isoformas (Harmon *et al.* 1994; Harper *et al.* 1994). Los CLDs comparten entre 35-91% de identidad y contienen cuatro sitios *EF-hand*, excepto en las isoformas StCDPK22/23/24 del grupo III que contienen tres sitios estando degenerado el más cercano al AD, como en las CCaMKs (DeFalco *et al.* 2010; Patil *et al.* 1995). De acuerdo a Boudsocq *et al.* (2012), la falta de un *EF-hand* o la alteración de dos de estos motivos son suficientes para comprometer la sensibilidad al calcio. AtCPK13, un miembro del grupo III de la familia de CDPK de *Arabidopsis* con tres sitios *EF-hand*, es independiente de Ca<sup>2+</sup> (Ronzier *et al.* 2014), mientras que la actividad de AtCPK10/32 es regulada por el catión cuando se usó histona como sustrato aceptor (Boudsocq *et al.* 2012). En el caso de CCaMK, que contiene un dominio similar a visinina (Patil *et al.* 1995), el uso de mutantes que carecen de uno, dos o tres sitios *EF-hand* confirmó que estos dominios son cruciales para la actividad de la proteína, observándose una reducción gradual de la actividad quinasa de 100 a 4% a medida que se fueron eliminando (Ramachandiran *et al.* 1997).

Hasta el momento se clonaron y caracterizaron en profundidad siete isoformas de la familia CDPK de papa: StCDPK1/2/3 del grupo II que están asociadas al proceso de tuberización y a respuestas frente a estrés abiótico (Gargantini *et al.* 2009; Giammaria *et al.* 2011; Grandellis *et al.* 2012; Grandellis *et al.* 2016; Muñiz García *et al.* 2012; Raíces *et al.* 2001; Raíces *et al.* 2003; Santin *et al.* 2016; Ulloa *et al.* 2002), StCDPK4/5/7 del grupo I vinculadas con respuesta frente a patógenos (Asai *et al.* 2013; Fantino *et al.* 2017; Kobayashi *et al.* 2007; Yoshioka *et al.* 2009) y StCPK1 (Lakatos *et al.* 1998) renombrada como StCDPK25 (Fantino *et al.*, 2017) del grupo IV que se describió originalmente como un nexo evolutivo entre CDPKs y CRKs. A pesar de la alta homología en sus KD, StCDPK1/2/3 difieren en sus dominios NTVs. En ensayos *in vitro* se demostró que StCDPK1:6xHis fosforila el *loop* hidrofílico del transportador del eflujo de auxina StPIN4 (Santin *et al.* 2016). En cambio, StCDPK2:6xHis y StCDPK3:6xHis fosforilan el FT tipo StABF1 que une elementos ABRE en el ADN (Grandellis *et al.* 2016; Muñiz García *et al.* 2012). Además, como se mencionó en la sección 2.4, StCDPK3:6xHis es capaz de fosforilar StRSG (Grandellis *et al.* 2016) que modula el contenido de la fitohormona giberelina (GA); mientras que StCDPK7 fosforila a las proteínas fenilalanina amonio liasa (PAL) (Fantino *et al.* 2017) y StCDPK5 reconoce a la NADPH oxidasa (RBOHB) *in vivo* y es capaz de fosforilarla en dos

residuos activando el *burst* oxidativo (Asai *et al.* 2013) en respuesta a patógenos. Sin embargo, no hay CDPKs del grupo III de papa caracterizadas y en particular es interesante analizar aquellas que contienen sólo tres sitios *EF-hands*.

El aumento del área salina por diversos factores ambientales y antropológicos, junto con la necesidad de incrementar la producción de papa para enfrentar futuros desafíos alimentarios, llevaron a que numerosos proyectos de investigación estén orientados a obtener cultivares más tolerantes a la sal para lograr una producción sostenible y un aumento del área destinada a su producción. Para ello, es necesario comprender los mecanismos de respuesta de la planta a la salinidad y el papel que desempeñan las proteínas responsables de transducir este estímulo ambiental. Como comentamos anteriormente, AtCPK8/10/13/32 del grupo III de Arabidopsis se relacionan con la respuesta a sal, sequía o cierre estomático, por lo que sería interesante evaluar cómo se comportan las CDPKs del grupo III de papa frente al estrés salino.

## RESULTADOS

### Capítulo 1: Análisis bioinformático de StCDPKs del grupo III

#### 1.1 - Identificación de CDPKs pertenecientes al grupo III en papa y tomate

Datos previos del laboratorio indicaban que el grupo III de la familia CDPK de la planta de papa está compuesto por cinco miembros cuyos genes, *StCDPK20/21/22/23/24*, se localizan en los cromosomas 6, 3, 10, 1 y 11 respectivamente (Tabla C1.1) (Fantino *et al.* 2017). *StCDPK23/24* son genes parálogos (Fantino *et al.* 2017) que codifican proteínas con alta identidad de secuencia (87% a nivel nucleotídico y 90% a nivel aminoacídico). Se procedió a identificar las CDPKs de tomate (*Solanum lycopersicum*, Sl) pertenecientes al grupo III usando la base de datos *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>) y se detectaron seis genes localizados en los cromosomas 1, 3, 6, 9, 10 y 11 (Tabla C1.1). Es conocida la conservación de las relaciones de sintenia entre ambas especies por lo que llamó la atención la isoforma faltante de papa y se realizó una nueva búsqueda en el genoma de *S. tuberosum* grupo Phureja DM1-3 utilizando el transcripto de *SICDPK9* de tomate como *query*.

Tabla C1.1 CDPKs de papa (St) y tomate (Sl) pertenecientes al grupo III.

CDPK	Accession (DMG y DMT)	Cromo- soma	Gen (kpb)	ARNm (pb)	Proteína		
					(aa)	MW (kDa)	pl
<i>StCDPK20</i>	PGSC0003DMG400026908 PGSC0003DMT400069175	6	4,9	2178	536	61	6
<i>StCDPK21</i>	PGSC0003DMG400013183 PGSC0003DMT400034291	3	6	2202	538	61	6,4
<b><i>StCDPK22</i></b>	<b>PGSC0003DMG400008149 PGSC0003DMT400021055</b>	<b>10</b>	<b>4,5</b>	<b>2417</b>	<b>524</b>	<b>59</b>	<b>5,9</b>
<i>StCDPK23</i>	PGSC0003DMG400010704 PGSC0003DMT400027809	1	6,9	2146	533	60	6,4
<b><i>StCDPK24</i></b>	<b>PGSC0003DMG400033335 PGSC0003DMT400083474</b>	<b>11</b>	<b>5,9</b>	<b>2178</b>	<b>532</b>	<b>60</b>	<b>6,1</b>
<i>StCDPK27*</i>	NW_006239715.1 XM_006367453.2	9	11,2	2183	529	60	6
<i>SICDPK1</i>	Solyc01g008440.2.1	1	5,8	1602	533	60	6,6
<i>SICDPK3</i>	Solyc03g113390.2.1	3	5,4	1617	538	61	6,4
<i>SICDPK6</i>	Solyc06g073350.2.1	6	3,9	1611	536	61	5,7
<i>SICDPK9*</i>	Solyc09g005550.2.1	9	8,1	1590	529	60	6
<i>SICDPK10</i>	Solyc10g079130.1.1	10	3,6	1578	525	60	5,9
<i>SICDPK11</i>	Solyc11g065660.1.1	11	4,8	1602	533	60	6

Se nombraron las CDPKs de tomate de acuerdo al cromosoma en que se encuentran. Datos obtenidos de las bases *Spud DB*, *Sol Genomics Network* y *blastn* de NCBI. (\*) Indica el nuevo gen de papa identificado y su homólogo en tomate.



Se encontró una secuencia parcial (PGSC0003DMT400077747) que codifica para 103 aminoácidos del C-terminal de la proteína en el cromosoma 9 de papa y que presenta 99% de homología con *SICDPK9* (23% cobertura). Con esta secuencia se realizó una búsqueda en la aplicación *blastn* de la base de datos del NCBI y se encontró la secuencia XM\_006367453.2 que comparte 95,77% de identidad nucleotídica (99% de cobertura) con la secuencia de tomate y que corresponde a una CDPK de *S. tuberosum* predicha a partir de una secuencia genómica (NW\_006239715.1, *gene ID*: 102590767), por lo que se la incluyó como nuevo miembro del grupo III de papa.

## 1.2 - Análisis de los dominios presentes en las CDPKs del grupo III

Los genes *StCDPK* del grupo III codifican para proteínas ácidas de entre 59 a 61 kDa (Tabla C1.1). Las secuencias aminoacídicas, calculadas a partir de la aplicación *Expasy – Translate tool*, presentan los dominios característicos de una CDPK. El análisis bioinformático usando los programas *SMART*, *Pfam* y *PROSITE* indica que el KD abarca 260 aminoácidos e incluye los subdominios característicos. En la Tabla C1.2 se indica el inicio y el fin del dominio KD y la ubicación del sitio activo, así como la ubicación de los sitios *EF-hand* del dominio CLD.

Tabla C1.2 Predicción de motivos conservados en las secuencias de *StCDPK22* y *StCDPK24*.

	StCDPK20/21		StCDPK22		StCDPK23/24		StCDPK27	
Dominio	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin
<b>KD</b>	56	314	53	311	55	313	56	314
<b>Sitio activo</b>	176	188	173	185	175	187	176	188
<b>EF-hand 1</b>	370	382	-	-	-	-	370	382
<b>EF-hand 2</b>	406	418	403	415	405	417	-	-
<b>EF-hand 3</b>	442	454	439	451	441	453	441	453
<b>EF-hand 4</b>	478	490	475	487	477	498	477	789

Predicciones realizadas a partir de los programas *SMART*, *Pfam* y *PROSITE*.

El análisis en InterProScan (Zdobnov y Apweiler, 2001) confirma la presencia de cuatro sitios *EF-hands* funcionales de unión al  $Ca^{2+}$  en *StCDPK20/21* y tres en *StCDPK22/23/24/27*. De acuerdo a Shi *et al.* (2018), los sitios de unión de los cuatro *EF-hands* son: D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-S<sub>5</sub>-E<sub>12</sub>, D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-S<sub>5</sub>-E<sub>12</sub>, D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-S<sub>5</sub>-E<sub>12</sub> y D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-I<sub>5</sub>-E<sub>12</sub>, respectivamente (los subíndices indican la posición de residuos correspondientes a una sola secuencia de bucle de unión). En el caso de *StCDPK22/23/24* las secuencias codificantes (CDS) presentan un primer sitio degenerado (D<sub>3</sub> es reemplazado por G) como en las *visinin-like proteins* (VSNLs) (Braunewell y Klein-Szanto, 2009), y tanto en la nueva isoforma identificada (*StCDPK27*) como en su homólogo de tomate (*SICDPK9*) el sitio faltante es el segundo (D<sub>3</sub> es reemplazado por N).

## 1.3 - Predicción de consensos de miristoilación y palmitoilación

El dominio NTV de las CDPK del grupo III de papa es el que mayor variabilidad presenta como en el resto de las CDPKs de diferentes especies; suele contener los consensos de miristoilación

y palmitoilación, acilaciones que modulan la localización subcelular de estas proteínas. Muchas CDPKs son miristoiladas en la glicina en posición 2 (G<sub>2</sub>) cuando son traducidas (Hrabak, 2000). Aunque todas las isoformas del grupo III tienen una G<sub>2</sub>, sólo cuatro podrían miristoilarse de acuerdo a las predicciones de las aplicaciones *NMT - The MYR Predictor* (Podell y Gribskov, 2004) y *Myristoylator* (Bologna et al. 2004) (Tabla C1.3). StCDPK21/27 no se miristoilarían. La predicción tiene una confianza alta sólo para StCDPK20; las otras isoformas presentan una asparagina en la posición 3 (N<sub>3</sub>) que, según Yamauchi et al. (2010), afecta negativamente a la miristoilación y los programas mencionados le dan una probabilidad baja o mediana.

Tabla C1.3 Sitios de miristoilación de las StCDPKs del grupo III.

Isoforma	Secuencia NTV	Predicción <sup>b</sup> /Respuesta media de 25 redes neuronales	NMT-MYR predictor <sup>a</sup> Score	Myristoylator <sup>c</sup> Score
St20	MGTCMSVQNASFLK	RELIABLE / Confianza alta	0,857	0,985466
St21	MGNCNACIRPEEASK	RELIABLE / Non-myristoylated	0,424	-0,272388
St22	MGNCCAVPKTSETEE	RELIABLE / Confianza media	<b>1,852</b>	<b>0,735412</b>
St23	MGNCCVKPGKSAEKK	RELIABLE / Confianza baja	0,636	0,336324
St24	MGNCCGTPGNSSSENK	RELIABLE / Confianza media	<b>1,355</b>	<b>0,681893</b>
St27	MGNCCRSPAAVARED	RELIABLE / Non-myristoylated	ND	-0,9730105

Secuencias N-terminales. Los residuos glicina (G) o cisteína (C) en negrita indican sitios putativos de miristoilación o palmitoilación. En gris se destacan los residuos de asparagina (N) que afectan negativamente la miristoilación (Yamauchi et al. 2010). Sitios predichos por <sup>a</sup>*NMT-The MYR Predictor* o <sup>b</sup>*Myristoylator*. En *Myristoylator*, el score (S) se basa en las respuestas promedio de 25 redes neuronales. S = Positivo – Negativo. Resultados positivos: 0,0<S<0,4 -> baja confianza; 0,4<S<0,85 -> confianza media; 0,85<S<1,0 -> alta confianza. Puntuaciones negativas y ND, no miristoilado. Adaptado de Fantino et al. (2017).

Si bien la miristoilación por sí sola no es suficiente, esta modificación junto con la palmitoilación, permite su asociación específica a membranas celulares (Martín y Busconi, 2000; Rutschmann et al. 2002; Raíces et al. 2003; Benetka et al. 2008; Mehlmer et al. 2010; Witte et al. 2010). A partir de la aplicación *CSS-Palm - Palmitoylation Site Prediction* (Ren et al. 2008), se predijo que todos los miembros del grupo III podrían palmitoilarse en las cisteínas en posición 4, 5 o 7 (Tabla C1.4). Valores similares se obtuvieron para StCDPK1, que efectivamente se palmitoila y está asociada a membrana plasmática (Raíces et al. 2003, Gargantini et al. 2009).

En ensayos de fraccionamiento subcelular, todos los miembros del grupo III de CDPKs de *Arabidopsis* (AtCPKs) se encontraron asociados a la fracción microsomal (Boudsoq et al. 2012). Asimismo, experimentos de expresión de fusiones AtCPK:GFP mostraron que AtCPK7/8/10/13 se localizan en la membrana plasmática (Dammann et al. 2003, Zou et al. 2010, Benetka et al. 2008, Kanchiswamy et al. 2010) y que AtCPK32 se localiza en membranas y en núcleo (Choi et al. 2005). Se utilizaron los programas de predicción para analizar las isoformas de *Arabidopsis* y estos arrojaron valores similares a los de papa; de hecho, tres isoformas AtCPK10/13/30 no se miristoilarían al igual que StCDPK21/27 (Anexo 1) sugiriendo que la palmitoilación sería suficiente para la asociación a membranas. De acuerdo con las predicciones de miristoilación y palmitoilación, las isoformas de papa podrían estar asociadas a membranas; sin embargo, su localización se debe confirmar experimentalmente.

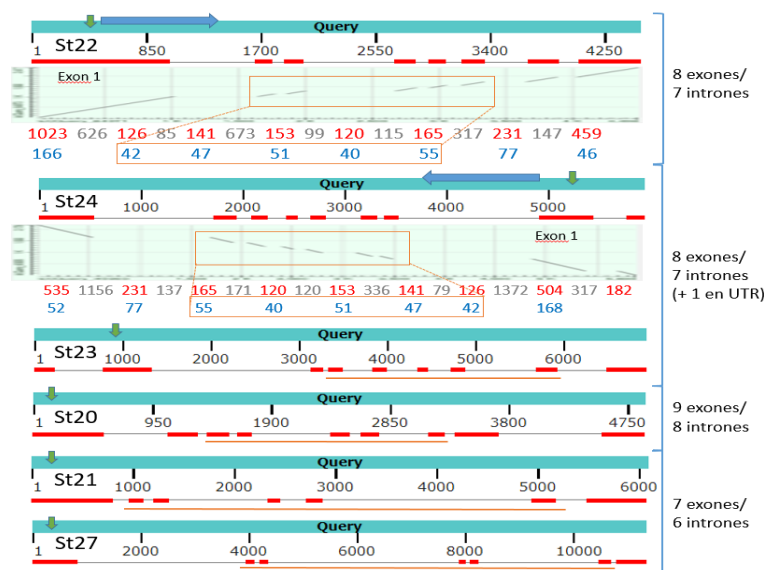
Tabla C1.4 Predicción de palmitoilación de las CDPKs del grupo III.

Isoforma	Posición	Péptido	Score	Cutoff
St20	4	***MGT <b>C</b> MSVQNAS	<b>41,427</b>	3,717
	257	VILYILL <b>C</b> GVPPFWA	3,771	3,717
St21	4	***MG <b>N</b> CNACIRPE	<b>39,793</b>	3,717
	7	*MG <b>N</b> CN <b>A</b> CIRPEEAS	<b>39,828</b>	3,717
St22	4	***MG <b>N</b> CCAVPKTS	17,257	2,412
	5	***MG <b>N</b> CCAVPKTSE	<b>45,234</b>	3,717
St23	4	***MG <b>N</b> CCVKPGKS	23,449	2,412
	5	***MG <b>N</b> CCVKPGKSA	<b>43,193</b>	3,717
St24	4	***MG <b>N</b> CCGTPGNS	16,917	2,412
	5	***MG <b>N</b> CCGTPGNSS	<b>42,979</b>	3,717
St27	4	***MG <b>N</b> CCRSPA AV	13,679	2,412
	5	***MG <b>N</b> CCRSPA AVA	<b>44,277</b>	3,717

En rojo se resaltan las cisteínas posibles de ser palmitoiladas. El score en negrita son las de mayor probabilidad para cada isoforma.

## 1.4 - Análisis de las secuencias genómicas de las CDPKs del grupo III

Una comparación previa de la secuencia de cada gen con la secuencia codificante de la proteína (a partir del ATG) indicó que los genes *StCDPK22/23/24* del grupo III comparten la estructura de 8 exones/7 intrones, mientras que *StCDPK21* contiene 7 exones/6 intrones y *StCDPK20* 9 exones/8 intrones (Fantino *et al.* 2017). Se realizó un análisis similar pero esta vez comparamos el transcripto de cada gen (incluyendo las regiones UTRs) contra su correspondiente secuencia genómica con la herramienta *blast* de NCBI (Fig. C1.1).

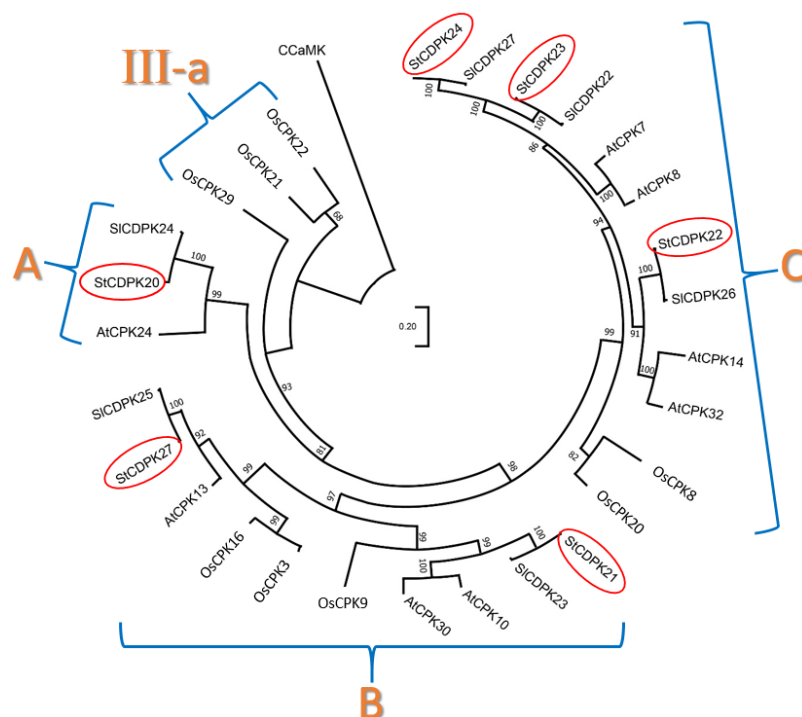


**Fig. C1.1 Alineamiento de secuencias nucleotídicas.** Se observa la cobertura de secuencia respecto de las obtenidas del PGSC, donde en líneas rojas se resaltan los exones. La flecha verde indica el inicio de la transcripción, mientras que la azul indica su sentido, siendo hacia la derecha el de St20/21/23/27. Los números en rojo indican el tamaño (pb) de los exones, los grises el de los intrones y los azules el número de aminoácidos correspondiente a cada exón. Los recuadros y líneas naranjas indican los cinco exones conservados entre las isoformas del grupo.

Se confirmó la estructura de exones/intrones para *StCDPK20/21/22* pero en los genes *StCDPK23/24* se identificó un intrón adicional ( $I_0$ ) en la región 5'UTR de 557 y 316 pb respectivamente. Por su parte, el gen *StCDPK27* contiene 7 exones/ 6 intrones al igual que *StCDPK21*. Los seis genes del grupo comparten seis sitios de *splicing* manteniendo cinco exones cuyo tamaño se conserva (Fig. C1.1). El tamaño variable de los intrones abarca hasta un 80% de la secuencia genómica en el caso de *StCDPK27* y sólo el 47% en el caso de *StCDPK22*.

### 1.5 - Comparación con CDPKs del grupo III de otras especies

Se alinearon las seis isoformas de papa pertenecientes al grupo III con sus homólogos en tomate y con los miembros del grupo III de *Arabidopsis* (Cheng *et al.* 2002) y de arroz (Asano *et al.* 2005). El árbol filogenético (Fig. C1.2) se realizó con el programa MEGA X (Kumar *et al.* 2018), utilizándose como *outgroup* una CCaMK de papa (número de acceso PGSC0003DMP400047866) que posee un dominio similar a visinina con tres sitios *EF-hand* al igual que la de lirio (Patil *et al.* 1995). Las CDPKs de papa se agrupan en tres ramas que forman parte del grupo III-b (Asano *et al.* 2005; Fantino *et al.* 2017); por su parte, tres CDPKs de arroz (OsCPK21/22/29) son filogenéticamente más distantes y de acuerdo a Asano *et al.* (2005) pertenecen al grupo III-a.



**Fig. C1.2** Árbol filogenético de CDPKs de papa, tomate, arroz y *Arabidopsis* pertenecientes al grupo III. St: papa; Sl: tomate; Os: arroz; At: *Arabidopsis*. A, B y C indican las ramas del grupo III-b. Asimismo se señalan las isoformas de arroz pertenecientes al grupo III-a. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo basado en matriz JTT (Jones *et al.* 1992). Árbol con la mayor probabilidad de registro (-14253,45). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de *Neighbor-Join* y *BioNJ* a una matriz de distancias por pares estimadas usando un modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis incluyó 29 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 691 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.* 2018), con *bootstrap* 1000 repeticiones. Se utilizó CCaMK como *outgroup*. Se señalan las CDPKs de papa.

En la rama A se encuentra StCDPK20 agrupada con CDPKs de Arabidopsis y tomate que conservan los cuatro sitios *EF-hand* y presentan una serina (S) o treonina (T) en posición tres a diferencia de la N<sub>3</sub> conservada en las otras CDPKs del grupo III-b (Tabla C1.5). Los genes de la rama A conservan una estructura de intrones/exones (Fig. C1.3) similar a la de los genes de arroz del grupo III-a, pero en las tres dicotiledóneas hay un sitio de *splicing* al final del NTV que no está presente en los genes de arroz (Asano *et al.* 2005). Por su parte, AtCPK24 carece de dos sitios de *splicing* conservados en todas las CDPKs del grupo III (Harmon *et al.* 2001).

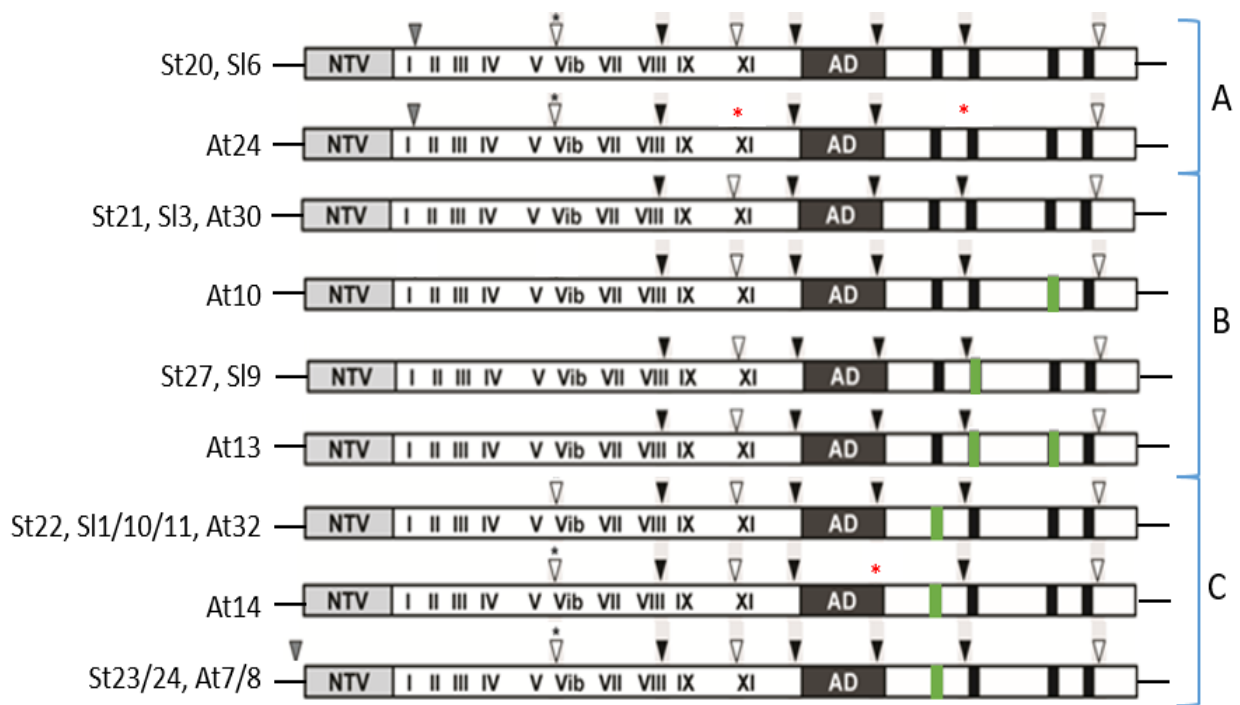
Tabla C1.5 NTV de las isoformas del grupo III-b.

Rama	Isoforma CDPK	NTV	EF-hand faltante	Rama	Isoforma CDPK	NTV	EF-hand faltante
A	At24	MGSCVS		C	At32	MGNCCG	
	St20	MGTCMS			St22	MGNCCA	
	Sl6	MGTCMS			Sl10	MGNCCA	
B	Os3	MGNCCR			St23	MGNCCG	
	Os16	MGNCCR			Sl1	MGNCCV	
	At13	MGNCCR	2, 3		St24	MGNCCV	
	St27	MGNCCR	2		Sl11	MGNCCG	
	Sl9	MGNCCR			At7	MGNCCG	
	Os9	MGNCC			At8	MGNCCA	
	St21	MGNCA					
	Sl3	MGNCA					
	At10	MGNCA	3				
	At30	MGNCA					

Se muestran los primeros seis aminoácidos del NTV de cada CDPK y se resalta en negrita la N<sub>3</sub>.

En la rama B se encuentran StCDPK27 que se agrupa con SICDPK9 y con AtCPK13, y StCDPK21 que se agrupa con SICDPK3, AtCPK30 y AtCPK10. Los siete genes comparten la misma estructura de exones/intrones (Fig. C1.3); sin embargo, se diferencian en que StCDPK21, SICDPK3 y AtCPK30 conservan los cuatro sitios *EF-hand* mientras que StCDPK27 y SICDPK9 carecen del segundo sitio *EF-hand* y AtCPK13 carece de dos sitios, el segundo y el tercero (Boudsocq *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2002). Por su parte, AtCPK10 carece del tercer *EF-hand* (Boudsocq *et al.* 2012).

Por último, en la rama C se agrupan las diez isoformas que carecen del primer sitio *EF-hand*. StCDPK22 se agrupa con las isoformas AtCPK14/32 y con SICDPK10, mientras que StCDPK23 y 24 lo hacen con SICDPK1/11 y AtCPK7/8. En el caso de arroz no hay isoformas con sólo tres sitios *EF-hand* (Asano *et al.* 2005) y lo mismo ocurre en trigo, otra monocotiledónea (Li *et al.* 2014). Sin embargo, en sorgo se detectó una CDPK y en maíz se identificaron tres CDPKs (Mittal *et al.* 2017) pertenecientes al grupo III con sólo tres sitios *EF-hand*.

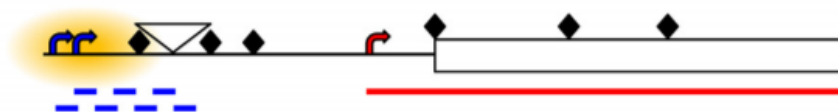


**Fig. C1.3 Estructura de intrones/exones de las CDPKs del grupo III-b de dicotiledóneas.** NTV: N-terminal variable; I a XI: subdominios de KD; AD: dominio autoinhibitorio; Rectángulos negros: *EF-hands* (el faltante se señala en verde). Las posiciones de los sitios de *splicing* se muestran mediante triángulos. (▼) posiciones conservadas en todos los genes de la familia CDPK de papa (*StCDPK*); (▽) posiciones compartidas por genes *CDPK* del grupo I, II, y III de papa; (▽) sitio de *splicing* adicional en genes del grupo III. (\*) encima de los triángulos indican los sitios de *splicing* exclusivos de las *StCDPK20/22/23/24*; (\*) sitios de *splicing* faltantes en los genes *CDPK* de *Arabidopsis*. Las líneas negras horizontales en ambos extremos de las estructuras son los UTR. Adaptado de [Fantino et al. \(2017\)](#); [Harmon et al. \(2001\)](#); [Hu et al. \(2016\)](#).

SICDPK1/11 y AtCPK7/8 al igual que StCDPK23/24 son genes parálogos, indicando que la duplicación segmental que dio origen a los mismos ocurrió antes de la separación de las especies. Pudimos comprobar la presencia del intrón adicional en la 5'UTR de AtCPK7/8. Los diez genes de la rama C presentan una estructura similar de intrones/exones (Fig. C1.3) a excepción de AtCPK14 que carece de un sitio conservado de *splicing* (indicado con \*) entre el AD y el CLD que está presente en casi todas las CDPKs de diferentes especies. Desde su descubrimiento en 1977 ([Sambrook, 1977](#)), los intrones tienen un papel importante en la regulación génica, ya que impulsan la evolución mediante la combinación aleatoria de exones ([Long et al. 1995](#)) y permiten la traducción de múltiples proteínas a partir de un solo gen mediante el proceso de empalme alternativo ([Maniatis y Tasic, 2002](#)). El patrón similar de intrones es consistente con la hipótesis de intrones tempranos ([Gilbert, 1978](#)) que establece que los intrones descienden de espaciadores entre minigenes ancestrales. El intrón que separa el dominio AD con el CLD apoya la idea de que las CDPKs surgieron de la fusión de genes que codifican para una quinasa de proteínas y una proteína similar a calmodulina. Sin embargo, otras evidencias: i) el largo variable de los intrones, ii) la presencia de intrones adicionales en varios genes *CDPKs*, y iii) el hecho de que los intrones interrumpen subdominios catalíticos y *EF-hands*, apoyan la hipótesis de intrones tardíos ([Cavalier-Smith, 1991](#)) que establece que los intrones se agregaron después de que se formó el gen ancestral.

Los intrones inician y mejoran la expresión génica mediante un mecanismo denominado

IME (por sus siglas en inglés, *intron-mediated enhancement*). Aunque el IME se mostró en plantas en 1987 (Callis *et al.* 1987) y en otros organismos, su mecanismo es en gran parte desconocido. Gallegos y Rose (2015) han propuesto un modelo en el que el intrón mejora la (re)iniciación de la transcripción dentro de una región aguas arriba distinta (Fig. C1.4). En este modelo, el inicio de la transcripción está vinculado a secuencias específicas dentro de intrones en lugar de factores de empalme, lo que es consistente con la necesidad de ubicar intrones en la proximidad del sitio de inicio de la transcripción (TIS, por sus siglas en inglés). En particular se han asociado los intrones en la región 5'UTR con el aumento de expresión. En *Arabidopsis* se demostró que el intrón en las 5'UTR del gen *GGT1 Aminotransferasa* aumenta la actividad del promotor al reclutar la ARN Polimerasa II (Laxa, 2017).



**Fig. C1.4 Modelo de IME.** Cuando el intrón está corriente arriba en la región intergénica, el primer ATG en las transcripciones que se inician en la zona de influencia no es el codón de inicio del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) principal. Estas transcripciones son inestables porque el primer ATG en estos ARNm inicia un breve marco de lectura abierto cuyo codón de parada (*stop*) puede reconocerse como prematuro y, por lo tanto, desencadena la descomposición del ARNm. Rectángulo, secuencias de codificación del gen. Diamantes, ATG. Triángulo, intrón "estimulante". Nube amarilla, zona de influencia intrónica con una estructura de cromatina local favorable. Flechas, sitios de iniciación de la transcripción. Línea roja, transcripción del promotor normal. Líneas azules discontinuas, transcripciones inestables. Adaptado de Gallegos y Rose (2015).

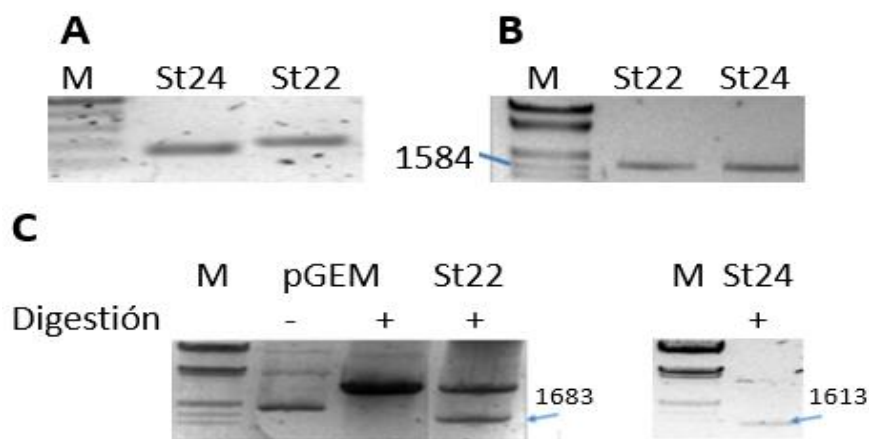
La herramienta IMEter v2.1 (Parra *et al.* 2011) otorga un *score* cuyo valor se relaciona con el efecto positivo que tienen los intrones sobre la expresión de los genes. Por ejemplo, la presencia del primer intrón del gen de *ubiquitina* de *Arabidopsis* (*UBQ10*, AT4G05320.1, *score*: 47,7) aumenta hasta 13 veces la expresión del gen relativo a su expresión en ausencia de dicho intrón. De acuerdo a IMEter v2.1 los genes *AtCPK7/8*, que al igual que *StCDPK23/24* presentan un intrón en la 5'UTR, tienen un *score* de 13,5 y 18,31 respectivamente, y su expresión es ubicua y elevada de acuerdo a la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Sin embargo, la enorme mayoría de los intrones de papa y tomate tienen un IMEter *score* de cero (0,00), aún genes con altos niveles de expresión como *ubiquitina* o *elongation factor*. La predicción de IMEter v2.1 para *StCDPK20/21/22/27* que carecen de un intrón en la región 5'UTR es 0,00 mientras que el *score* obtenido para *StCDPK23* y *StCDPK24* es de 0,21 y 0,12 respectivamente. En ausencia de evidencia experimental, no se puede inferir el efecto del intrón ( $I_0$ ) sobre la expresión de estos genes.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las CDPKs de papa que presentan sólo tres sitios *EF-hand* se decidió proceder al clonado y caracterización de dos de ellas, *StCDPK22* y *StCDPK24*.

## 1.6 - Clonado de las CDS de *StCDPK22* y *StCDPK24*

Se confirmó la presencia de los genes *StCDPK22* y *24* utilizando como templado ADN genómico de *S. tuberosum* L. var. Spunta y pares de oligonucleótidos Fw1 y Rv1 (Tabla MyM1) que

amplifican fragmentos del primer exón de ambos genes (Fig. C1.5 A). Luego se realizaron PCR semicuantitativas con oligonucleótidos diseñados sobre las regiones no traducidas 5' y 3'UTR de ambas isoformas (Tabla MyM1) utilizando como templado una biblioteca de ADNc de *S. tuberosum* L var. Desiree de hoja, y ADNc obtenidos a partir de hoja, tallo y raíz de plantas de invernadero. A partir de la biblioteca de hoja se amplificó un fragmento de 1683 pb correspondiente a *StCDPK22* y otro de 1613 pb correspondiente a *StCDPK24* únicamente a partir de ADNc de tallo (Fig. C1.5 B). Ambos amplicones fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy y se transformaron bacterias *Escherichia coli* que fueron plaqueadas en medio LB (Bertani 1951) con X-gal. Se confirmaron las colonias positivas por digestión (Fig. C1.5 C) y secuenciación. Se procedió entonces al análisis de las secuencias obtenidas.



**Fig. C1.5 Clonado de las isoformas *StCDPK22/24*.** **A** Fragmentos amplificados a partir de ADN genómico (*StCDPK22*, 225 pb y *StCDPK24*, 199 pb). M: *marker* 100 pb. **B** Fragmentos amplificados a partir de ADNc de hoja (*StCDPK22*, 1683 pb) y de tallo (*StCDPK24*, 1613 pb). Se indica el PM de una banda como referencia. **C** Digestión de pGEM-T Easy conteniendo o no los fragmentos correspondientes a ambas isoformas, indicados con flechas celestes y su correspondiente tamaño. M: *marker*  $\lambda$  EcoRI-Hind III. Como control negativo se corrió el plásmido pGEM-T Easy sin inserto sin digerir o digerido.

### 1.6.1 - Análisis *in silico* de las secuencias codificantes de *StCDPK22* y *StCDPK24*

A partir de un alineamiento local de las secuencias a través de las herramientas *blastn* y *blastp*, podemos concluir que ambas isoformas comparten 78,12% de identidad nucleotídica y 80,11% a nivel de aminoácidos. Alineamos ambas secuencias obtenidas con las de los otros miembros del grupo III (Fig. C1.6). Las seis isoformas conservan en su KD los residuos aminoacídicos que se han conservado a lo largo de la evolución en todas las PKs (ver recuadro sobre el alineamiento) de eucariotas (Taylor *et al.* 2019). Como se puede observar en la Fig. C1.6, el *EF-hand1* es el que mayor variabilidad presenta en las isoformas *StCDPK22/23/24*, encontrándose degenerado como en las VSNLs (Braunewell y Klein-Szanto, 2009). Sin embargo, los orígenes evolutivos de ambos dominios difieren, por lo que la pérdida de estos sitios fueron eventos independientes.





**Fig. C1.6 Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las CDPKs de papa del grupo III.** Los subdominios conservados del KD se indican en azul, el dominio autoinhibitorio (AD) en verde y los EF-hands en rojo. Los residuos subrayados intervienen en el anclaje y orientación del ATP. (\*) aminoácidos idénticos totalmente conservados, (:) posiciones con conservación entre grupos de aminoácidos de propiedades similares; (.) posiciones con conservación entre grupos de aminoácidos de propiedades débilmente similares. Se resaltan en gris los residuos aminoacídicos donde comienzan los exones (a excepción del primero) y en amarillo los que difieren entre las isoformas en los subdominios del KD y el AD. Realizado con *Clustal Omega*. Se muestra el árbol obtenido.

Detectamos algunos residuos aminoacídicos en regiones conservadas que difieren entre las isoformas (resaltados en la Fig. C1.6). En la Tabla C1.6 se indica el aminoácido más frecuentemente hallado en dichas posiciones en las CDPKs del grupo III de papa, tomate y Arabidopsis, así como en StCDPK1/2/3 del grupo II y StCDPK6/7 del grupo I de papa. El primer cambio se observó en el subdominio IV del KD; la isoforma StCDPK22 al igual que StCDPK27 y sus homólogos en Arabidopsis y tomate presentan una S que es un aminoácido polar, en lugar del residuo prolina (P) apolar característico en las otras CDPKs analizadas. El segundo cambio se identificó en el subdominio VIb; StCDPK22 y su homólogo en tomate presentan un aminoácido polar, grande y cargado negativamente (ácido glutámico, E), mientras que las otras isoformas del grupo presentan aminoácidos pequeños y apolares (G o A) en esa posición. A su vez, las isoformas del grupo I presentan residuos apolares (valina, V), mientras que en el caso del grupo II las tres isoformas presentan aminoácidos polares (S o T) al igual que AtCPK24 (S). El tercer cambio se observó en el AD, ya que StCDPK24 y sus homólogos en tomate (StCDPK1/11) presentan una T y StCDPK23 presenta una A; sin embargo, tanto en StCDPK22 como en el resto de las CDPKs analizadas se encuentran aminoácidos con carga positiva (arginina, R o lisina, K) en esta posición.

**Tabla C1.6 Cambios aminoacídicos puntuales que podrían afectar la estructura/actividad de StCDPK22/24.**

G	CDPK	KD IV	KD VIb	AD	
II	St1/2	P	S	K	
	St3	P	T	R	
I	St6/7	P	V	R	
III	St20 Sl6	P	A	R	A
	At24	P	S	R	
	St21, Sl3, At10/30	P	A	R	B
	St27 Sl9 At13	<b>S</b>	A	R	
	<b>St22</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	R	C
	Sl10	P	<b>E</b>	R	
	At7/8/14	P	A	R	
	At32	P	G	R	
	St23	P	G	<b>A</b>	
<b>St24</b> Sl1/11	P	G	<b>T</b>		

Se detallan los residuos encontrados en las diferentes isoformas en las posiciones indicadas; se resaltan en verde los aminoácidos que difieren en cuanto a polaridad, carga, tamaño y/o posibilidad de ser fosforilado. A, B y C de la última columna se refieren a las ramas del árbol filogenético (Fig. C1.2). G: grupo.

Cabe considerar que los residuos S y T pueden ser fosforilados y adquirir carga negativa en el caso de encontrarse en el entorno adecuado.

Los aminoácidos mencionados podrían afectar la estructura terciaria y/o la actividad de la proteína ya que difieren en polaridad, carga y tamaño (Tabla C1.7).

Tabla C1.7 Clasificación de aminoácidos.

Polaridad	Aminoácido			Masa molar	Radio de Van der Waals	Carga
	Nombre	Abr.	Símb.			
apolares	Alanina	Ala	A	89.094	67	
	Glicina	Gly	G	75.067	48	
	Prolina	Pro	P	115.132	90	
	Valina	Val	V	117.148	105	
polares	Arginina	Arg	R	174.203	148	+
	Ácido glutámico	Glu	E	147.131	109	-
	Lisina	Lys	K	146.189	135	+
	Serina	Ser	S	105.093	73	
	Treonina	Thr	T	119.119	93	

Masa molar expresada en g/mol; radio de Van der Waals en pm. Abr abreviatura de tres letras; Símb símbolo de una letra.

## 1.7 - Modelado por homología

A través de la aplicación *Phyre2* (Kelley *et al.* 2015) se estimó con 100% de confianza las estructuras secundarias para StCDPK22/24 utilizando como templado la CpCDPK3 del parásito *Cryptosporidium parvum*, *phylum* Apicomplexa (PDB ID: c3lijA). Ambas enzimas comparten 87% de cobertura y 36% de identidad de secuencia con CpCDPK3 que presenta cuatro sitios *EF-hand* en su CLD. La estructura predicha corresponde a la región conservada de las CDPKs (KD, AD y CLD) pero no incluye los primeros treinta aminoácidos del dominio NTV.

En la Fig. C1.7 A se muestran los elementos de estructura secundaria que componen la topología de la subunidad catalítica de la PKA que está compuesta por dos lóbulos unidos por un *linker*, el menor formado por cinco hojas plegadas  $\beta$  (1-5) y dos hélices  $\alpha$  (B-C) y el mayor constituido por cuatro hojas  $\beta$  (6-9) y siete hélices  $\alpha$  (D-J) (Knighton *et al.* 1991). Esta estructura se conserva en todas las PKs de eucariontes superiores (McClendon *et al.* 2014; Rademacher y Offringa, 2012; Taylor y Kornev, 2011).

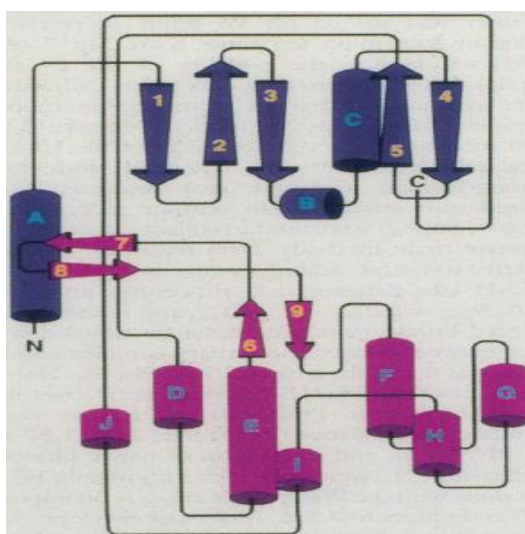
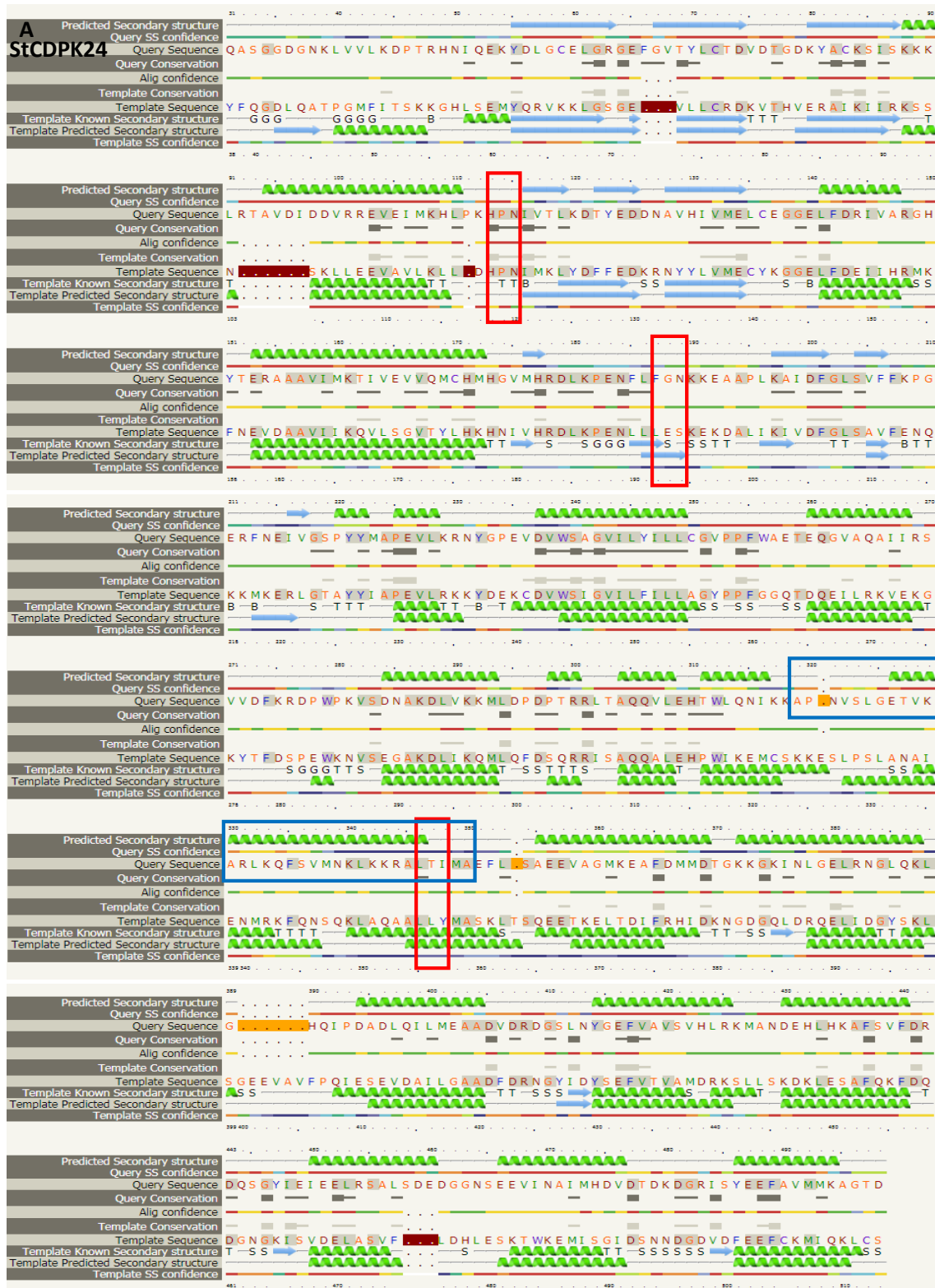
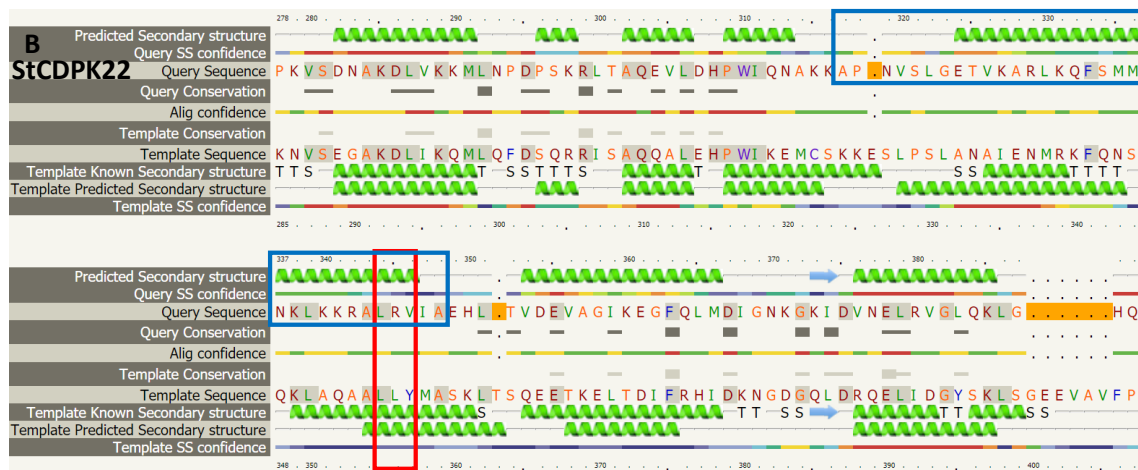


Fig. C1.7 Topología de la subunidad C de la PKA. En azul el lóbulo N y en rosa el lóbulo C. Los números indican las hojas  $\beta$  y las letras corresponden a las hélices  $\alpha$ . Tomado de Knighton *et al.* (1991).

En la Fig. C1.8 A, se muestra la predicción para StCDPK24 y se indica la ubicación de la región bisagra (AD) que separa el KD del CLD. La aplicación predijo que tanto StCDPK22 como StCDPK24 están constituidas por 10 hojas plegadas  $\beta$  y 21 hélices  $\alpha$ . Dichos elementos de estructura secundaria componen: i) los dos lóbulos del KD, el menor formado por seis hojas plegadas  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$  y el mayor constituido por cuatro hojas  $\beta$  y siete hélices  $\alpha$ ; ii) el AD formado por una larga hélice  $\alpha$  y iii) el CLD constituido por ocho hélices  $\alpha$  (Chandran *et al.* 2006).





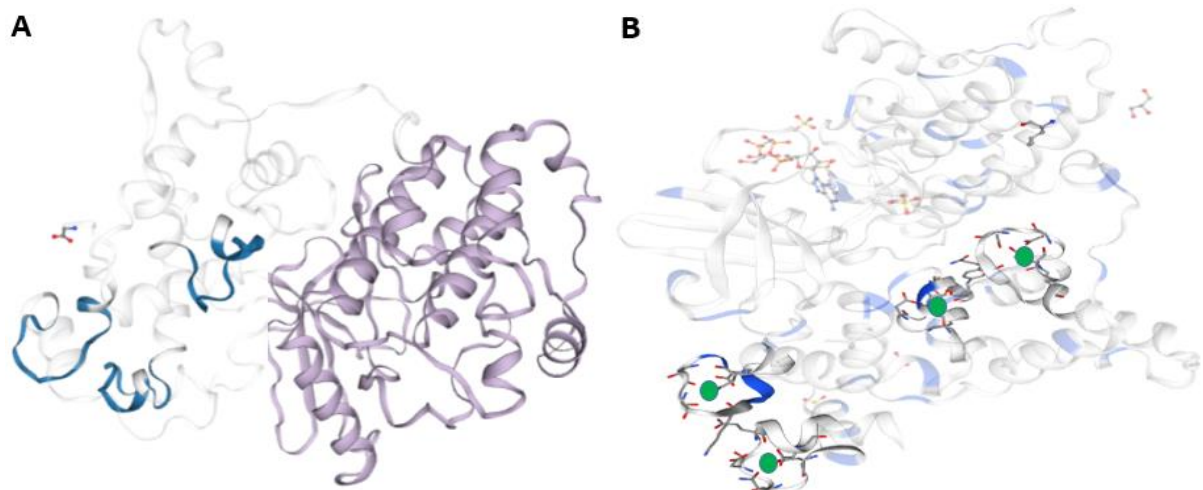
**Fig. C1.8 Estructura secundaria modelada de StCDPK22 y StCDPK24.** Para StCDPK24 (A) se muestra la estructura completa, mientras que para StCDPK22 (B) sólo la región del AD (hélice  $\alpha$  con recuadro azul) donde difieren (aminoácidos T y R). Con recuadro rojo se indican los aminoácidos mencionados en la Tabla C1.6. Cada modelo construido por *Phyre2* se basa en una alineación generada por la coincidencia HMM-HMM (modelo oculto de Markov, por sus siglas en inglés). Las filas de 'Conservación' contienen información sobre la conservación de residuos en los homólogos de secuencia detectados clasificados en 3 estados. Ningún símbolo indica que no está conservado, una barra gris delgada indica una conservación moderada y un bloque grande indica un alto grado de conservación. La predicción es de 3 estados: hélice  $\alpha$  (espirales verdes), cadena  $\beta$  (flechas celestes) o bobina. La línea de 'confianza SS' indica la confianza en la predicción, con rojo como alta confianza y azul como baja confianza. La predicción de la estructura secundaria tiene una precisión promedio del 78-80% (es decir, se predice que el 78-80% de los residuos están en su estado correcto). Los bloques marrones indican inserción respecto al templado y los naranjas indican delección. G: hélice de 3 vueltas ( $3_{10}$  hélices); I: hélice de 5 vueltas (hélice  $\pi$ ); T: giro unido por hidrógeno; B: residuo en el puente  $\beta$  aislado; S: curva. Las vueltas  $\beta$  y las curvas  $\beta$  se tratan como bobina, y las hélices  $\pi$  y las  $3_{10}$  hélices se consideran hélices  $\alpha$ .

Nos interesaba determinar si los aminoácidos mencionados en la Tabla C1.6 pudieran afectar la estructura secundaria de las proteínas. No se observaron diferencias entre StCDPK22 y StCDPK24 en el caso de los aminoácidos del KD. Sin embargo, la hélice  $\alpha$  del AD en StCDPK24 (Fig. C1.8 A) es más corta que en StCDPK22 (Fig. C1.8 B), sugiriendo que la presencia de una T en lugar de una R modifica la estructura secundaria de esa región.

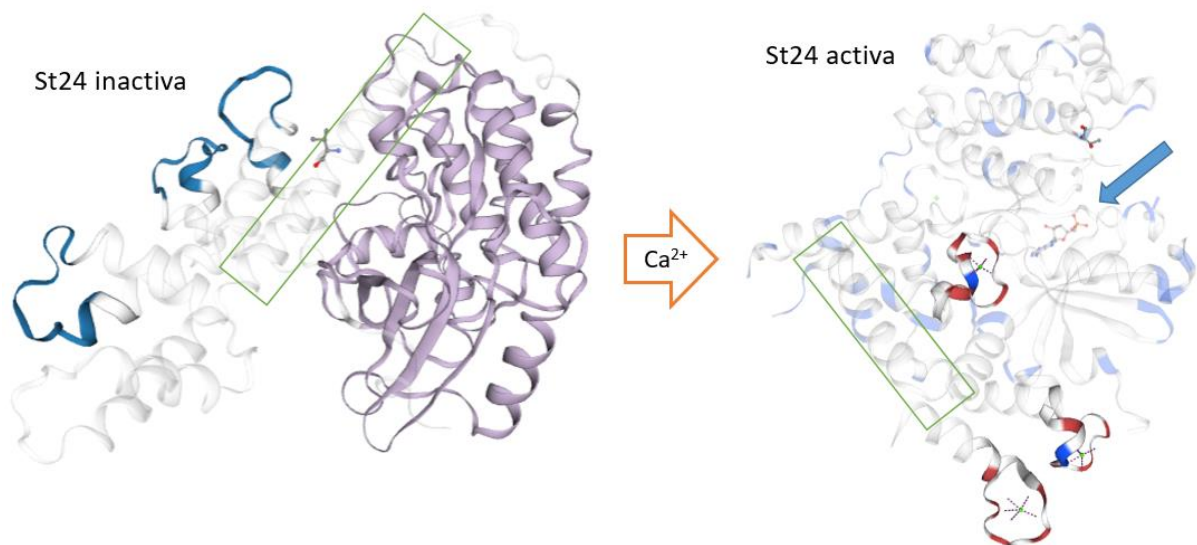
Una búsqueda en *UniProt* permitió identificar, en la base de datos de estructura 3D, a las proteínas M1AEI7 y M1D6X7 que corresponden a proteínas no caracterizadas de *Solanum tuberosum* con 100% de identidad con StCDPK22 y StCDPK24 respectivamente. Para comparar ambas isoformas con una del grupo III-b que presenta cuatro sitios *EF-hands* también se analizó la estructura de StCDPK20. Se obtuvo un 100% de identidad con la proteína no caracterizada de *S. tuberosum* M1CK12. En la Fig. C1.9 A se muestran las estructuras terciarias obtenidas con la aplicación *Swiss-Model* (Waterhouse *et al.* 2018), donde se observa el KD y el CLD con sus tres sitios *EF-hands* en el caso de StCDPK22, y con cuatro sitios en el caso de StCDPK20 (Fig. C1.9 A y B). Para M1D6X7 encontramos dos estructuras, una cristalizada en ausencia (3t3u.1.A) y otra en presencia (4y5q.1.A) de calcio.

Por otro lado, la Fig. C1.10 muestra la predicción para StCDPK24; se indica el dominio AD que, en ausencia de calcio, forma una larga hélice  $\alpha$  junto con la primera hélice  $\alpha$  del *EF-hand1* (no funcional) que se extiende desde la base del KD, y ocupa el sitio de unión del sustrato ocluyendo el bolsillo catalítico (Wernimont *et al.* 2010) y que en presencia del catión se desplaza permitiendo el acceso al sitio activo. Este modelo sugeriría que la actividad de

StCDPK24 dependería del calcio.



**Fig. C1.9 Estructura terciaria predicha según Swiss Model.** **A** StCDPK22 modelada a partir de M1AE17. Las predicciones se basan en la proteína cristalizada 4ieb.1.A que comparte con M1AE17 una identidad del 36,24% y 85% de cobertura. Se resaltan los tres *EF-hands* en azul y el KD en violeta. **B** StCDPK20 modelada a partir de M1CK12. Las predicciones se basan en la proteína cristalizada 3hx4.1.A que comparte con M1CK12 una identidad del 36,69% y 84% de cobertura. Las esferas verdes son los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en los *EF-hands*.



**Fig. C1.10 Estructura terciaria predicha para StCDPK24.** Modelada a partir de M1D6X7. Las predicciones se basan en la estructura de las proteínas cristalizadas 3t3u.1.A (en ausencia de calcio) y 4y5q.1.A (en presencia de calcio) que comparten 34,91% de identidad y 83% de cobertura y 37,75% de identidad y 84% de cobertura con M1D6X7, respectivamente. En el panel izquierdo se muestra la enzima en ausencia de calcio, se resaltan los tres *EF-hands* en azul, el AD con recuadro verde que bloquea el sitio activo y el KD en violeta; en el panel derecho se indica el sitio activo ocupado por AMP (flecha azul).

De acuerdo al modelo de activación de las CDPKs (Fig. I.10) (Delormel y Boudsocq, 2019), los sitios *EF-hand*3-4 tienen alta afinidad por el calcio y siempre están unidos al catión, mientras que los sitios *EF-hand*1-2 tienen menor afinidad y sólo lo unen cuando aumenta la concentración intracelular de calcio en respuesta a un estímulo, regulando así el cambio conformacional que permite la activación de la proteína (Ingram *et al.* 2015).

Se ha reportado que las isoformas de CDPK con tres sitios en vez de cuatro tienen menor dependencia por el calcio que las que presentan cuatro sitios ([Boudsocq et al. 2012](#)). La presencia de CDPKs atípicas que carecen de uno o más sitios *EF-hand* en su CLD ha sido observada en algas, briofitas, pteridofitas y plantas superiores ([Hamel et al. 2014](#)). Mientras que las CDPKs atípicas constituyen el 48% de las CDPKs en algas, este porcentaje disminuye en angiospermas (21%) sugiriendo que a medida que las plantas aumentan en complejidad, las CDPKs atípicas tienden a disminuir. Sin embargo, la conservación de estas proteínas en plantas superiores sugiere que desempeñan funciones vitales ([Edel et al. 2017](#)).

Se procedió a obtener las proteínas recombinantes de las isoformas StCDPK22/24 con el objetivo de caracterizar su actividad y su dependencia por el calcio.

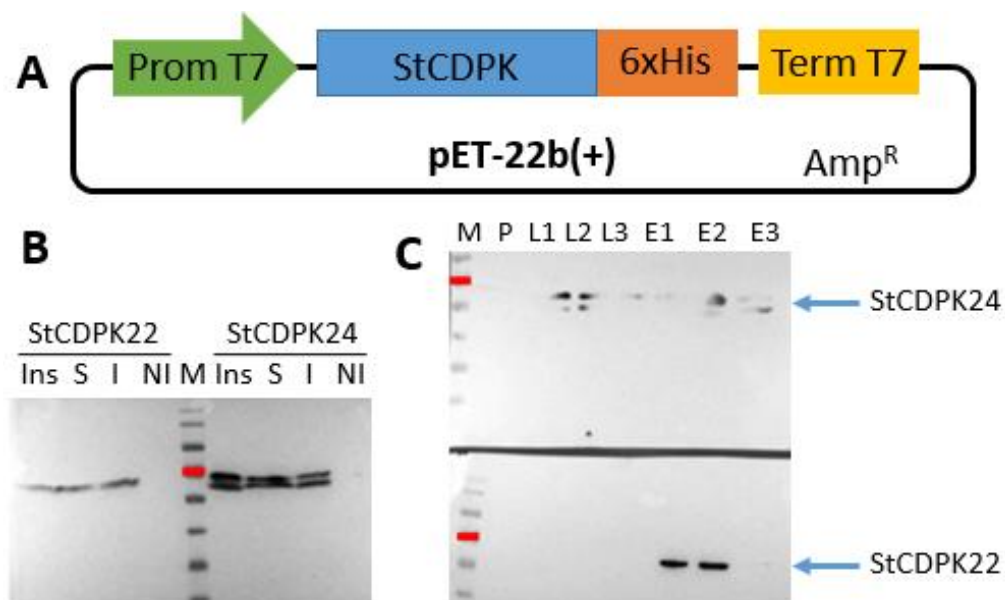
## CAPÍTULO 2: Caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis

Las CDS de *StCDPK22* y *StCDPK24* presentan todos los dominios propios de las CDPKs (Fig. C1.3); sin embargo, es necesario comprobar si codifican quinasas de proteínas activas y analizar su dependencia por el calcio.

### 2.1 - Expresión, purificación y actividad de StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis

Se clonaron las CDS completas de *StCDPK22* y *StCDPK24* en el vector de expresión pET-22b(+) (Fig. C2.1 A) utilizando las enzimas de restricción *Nde I* y *Xho I* para *StCDPK22* y *Ase I* y *Xho I* para *StCDPK24*. El vector está diseñado para obtener la proteína etiquetada con seis histidinas en el extremo C-terminal (StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis) lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad en una columna de níquel-agarosa (*His-Select Nickel Affinity Gel*, Sigma-Aldrich).

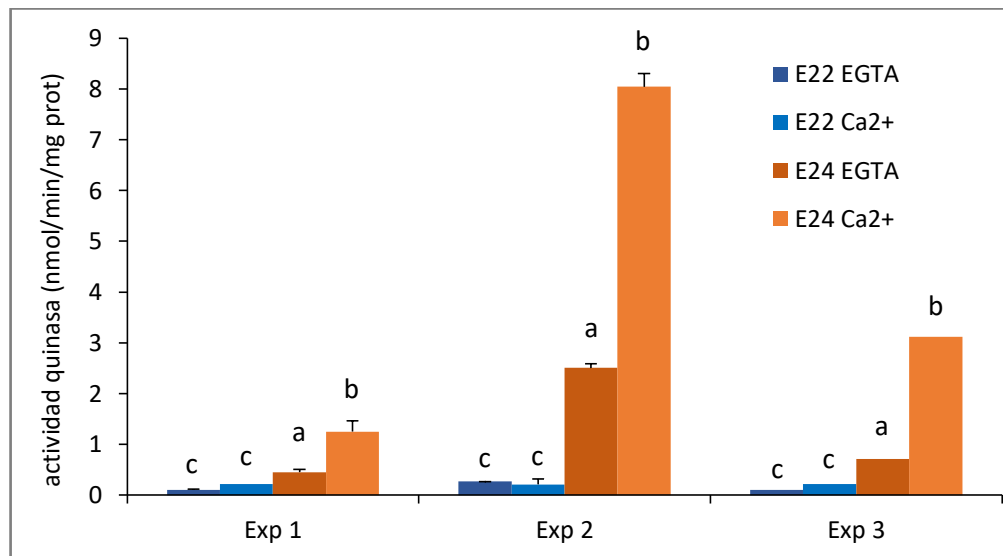
Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 Rosetta 2 con los plásmidos recombinantes y se indujo la expresión de las proteínas con 1 mM isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Los cultivos inducidos (I) se sembraron en la matriz Ni-Shepharose-IMAC, que se eluyeron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Los pasos de purificación se analizaron por SDS-PAGE (Fig.C2.1 B) y *western blot* con el anticuerpo anti-polihistidina (anti-His) (Fig.C2.1 C) confirmándose la obtención de ambas proteínas del tamaño esperado (~60 kDa). Es llamativa la obtención de 2 bandas en la isoforma StCDPK24, que podría deberse a modificaciones post-traduccionales de la proteína (por ejemplo, autofosforilación).



**Fig. C2.1 Expresión y purificación de StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis.** A Esquema de clonado en el vector de expresión pET-22b(+). B Alícuotas (50  $\mu$ g) de los pasos de producción de las enzimas recombinantes se analizaron por SDS-PAGE (10-12%) y se obtuvieron *western blot* de las isoformas St22 (izquierda) y St24 (derecha) de distintas fracciones obtenidas de la extracción a partir de cultivos bacterianos. Ins: insoluble; S: soluble; I: inducido; NI: no inducido. C Purificación de las isoformas St22 (abajo) y St24 (arriba). P: percolado; L: lavados; E: eluidos; M: *marker* PageRuler (Fermentas), en rojo se indica la banda de 70 kDa.

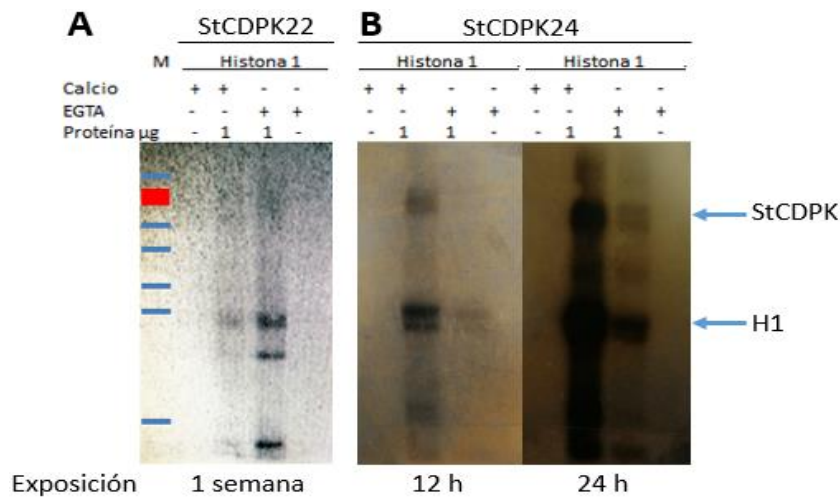


Para determinar la actividad quinasa de proteínas, los eluidos obtenidos se dializaron y se utilizaron como fuente de enzima (E22 y E24). Se realizaron tres experimentos independientes en presencia de 25  $\mu\text{M}$  calcio o 5 mM EGTA usando el péptido sintético Syntide-2 (Syn) como sustrato aceptor y el complejo  $\text{ATP}(\gamma^{32}\text{P})\text{-Mg}^{2+}$  como sustrato dador. La actividad quinasa se definió como  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{ATP}(\gamma^{32}\text{P})$  incorporado por mg de proteína. La actividad de StCDPK24 fue siempre mucho mayor que la de StCDPK22 y, mientras no hubo cambios en la actividad de StCDPK22 en presencia o ausencia de calcio, sí se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la actividad de StCDPK24 en presencia del catión (2,7 a 4,4 veces de acuerdo al ensayo) (Fig. C2.2).



**Fig. C2.2 Actividad quinasa.** Actividad específica en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{ATP}(\gamma^{32}\text{P})$  incorporado por mg de proteína. 25  $\mu\text{M}$  Calcio o 5 mM EGTA. Se representa Media  $\pm$  SEM.  $p=0,022$ . Letras distintas indican diferencias significativas en cada experimento individualmente ( $p < 0,05$ ).

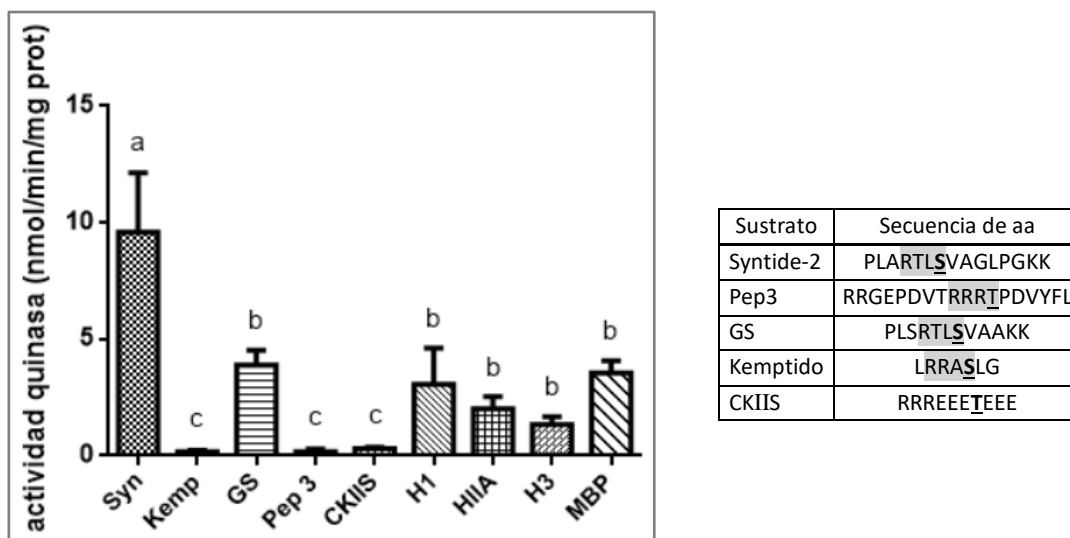
Para confirmar la actividad quinasa de proteínas se realizaron ensayos de fosforilación de histona (H1, 0,1 mg/ml) en geles utilizando 1  $\mu\text{g}$  de StCDPK22/24:6xHis como fuente de enzima. La reacción se incubó 5 minutos con 5  $\mu\text{M}$   $\text{ATP}(\gamma^{32}\text{P})$  y 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  en presencia de 5 mM EGTA o 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Como control negativo se incubó la H1 con ATP en ausencia de enzima. Luego de la corrida electroforética, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y éstas se expusieron a placas autorradiográficas durante 12 h y 24 h. Se confirmó que StCDPK24 es capaz de fosforilar H1 en forma dependiente de calcio (se detecta la banda fosforilada de 21 kDa). Cuando la placa se expuso durante 24 h se observó también la fosforilación de H1 en presencia de EGTA. Además, se observó una banda de 60 kDa, cuya fosforilación aumenta en presencia de calcio, que podría corresponder a la autofosforilación de StCDPK24 (Fig. C2.3 B). Sin embargo, no se detectó ninguna señal en la placa de StCDPK22 sugiriendo que la enzima era incapaz de fosforilar H1 (dato no mostrado). Para confirmarlo, la membrana se expuso y se escaneó en equipo *STORM* luego de una semana. Luego de esta prolongada exposición se observó una banda de 21 kDa cuya fosforilación aumenta en presencia del catión (Fig. C2.3 A). Hasta el momento los datos indican que StCDPK24:6xHis es una quinasa activa dependiente de calcio mientras que StCDPK22:6xHis tiene muy baja actividad.



**Fig. C2.3 Fosforilación de histona (H1, 0,1 mg/ml) con StCDPK22:6xHis (A) o StCDPK24:6xHis (B) como fuente de enzima (1 µg).** La reacción se incubó durante 5 minutos con 5 µM ATP(γ32P) y 10 mM Mg<sup>2+</sup> en presencia de 5 mM EGTA o 5 µM Ca<sup>2+</sup>. **A** revelado en equipo *STORM* luego de una semana de exposición. **B** revelado en placa radiográfica *Amersham Hyperfilm* (GE Healthcare) luego de 12 y de 24 horas de exposición. M: *marker* PageRuler, en rojo se indica la banda de 70 kDa.

## 2.2 - Determinación del sustrato aceptor óptimo *in vitro*

Dado que StCDPK24:6xHis presenta mucha mayor actividad se estudió su capacidad de fosforilar distintos sustratos comerciales, tanto péptidos sintéticos (15 µM) como proteínas (1 g/L) para evaluar el sustrato óptimo (Fig. C2.4).



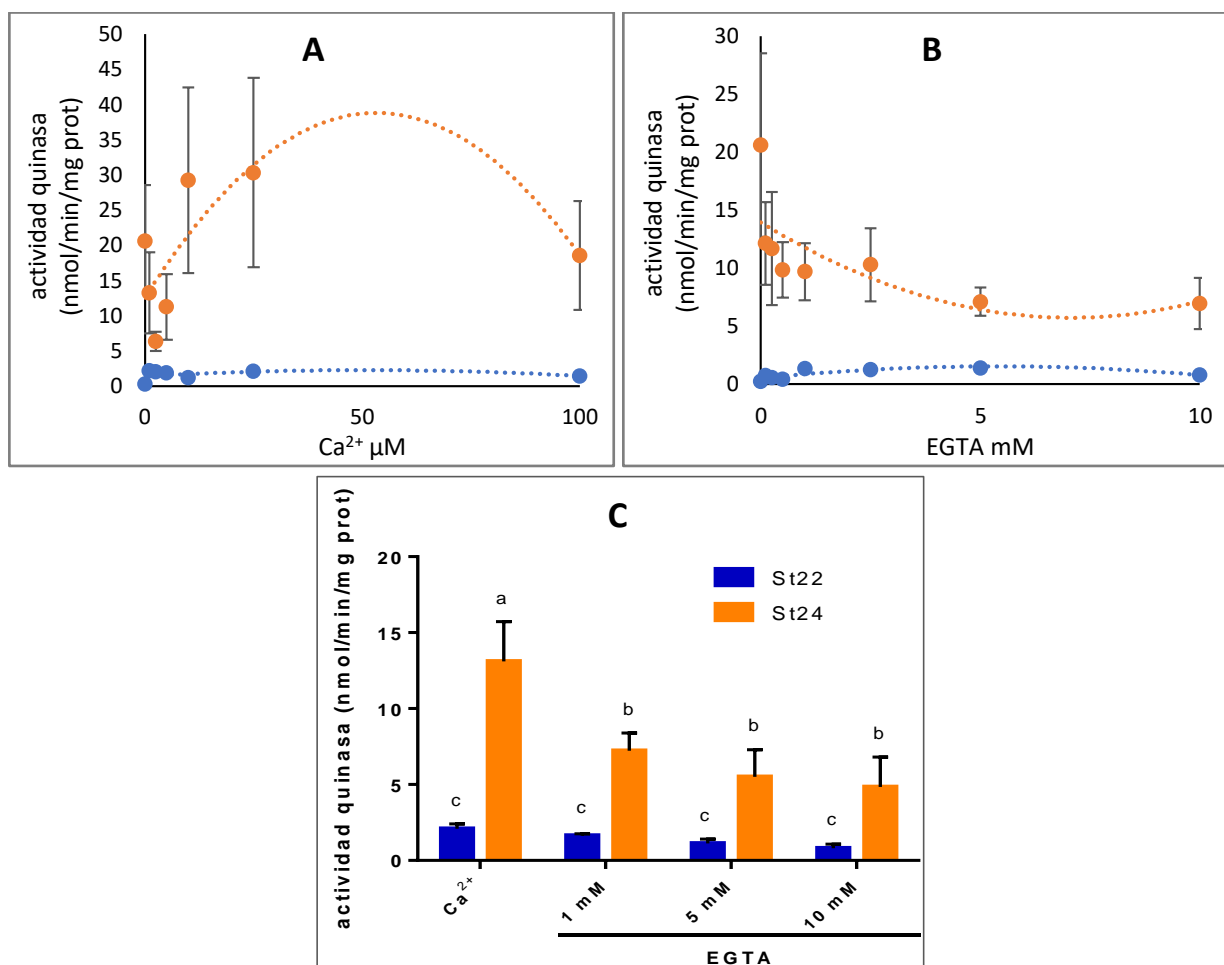
**Fig. C2.4 Actividad quinasa de StCDPK24:6xHis con distintos sustratos.** Ensayos de actividad quinasa (nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) realizados en presencia de 25 µM Ca<sup>2+</sup> utilizando 15 µM de distintos péptidos sintéticos (Syn, Pep3, GS, Kemp, y CKIIS cuya secuencia se detallada en la tabla de la derecha, se resalta la serina (S) fosforilada y el contexto de aminoácidos en el caso de Syn y GS y las S o T que deberían ser fosforiladas en los otros sustratos) y 1 g/L de proteínas (MBP, H1, H1IA y H3) como sustratos. Se representa Media ± SEM de cuatro experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno. Letras distintas representan diferencias significativas (p<0,05).

El Syntide-2, reconocido como sustrato de la CaMKII y de CDPKs, resultó ser el sustrato óptimo de StCDPK24:6xHis. En menor medida el péptido derivado de glucógeno sintasa (GS), y

las proteínas H1, HIIA, H3 y proteína básica de mielina (MBP). Por otro lado, StCDPK24 fue incapaz de fosforilar al kemptido que es sustrato de la PKA, al CKIIS que es sustrato de la caseín kinasa II y el péptido 3 derivado de la PP2A (Pep3). Se puede ver que se requiere algo más que el consenso **RXXS/T** para ser un buen sustrato, ya que el kemptido y Pep3 comparten esta secuencia con GS y Syntide-2 y sin embargo no son fosforilados. En función de estos resultados continuamos caracterizando ambas proteínas usando Syntide-2 como sustrato aceptor.

### 2.3 - Dependencia de $\text{Ca}^{2+}$ . Efecto de quelantes de $\text{Ca}^{2+}$ y antagonistas de CaM

Para determinar la concentración óptima de calcio y analizar la dependencia de ambas quinasas por el catión se determinó la actividad enzimática utilizando concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA (Fig. C2.5).

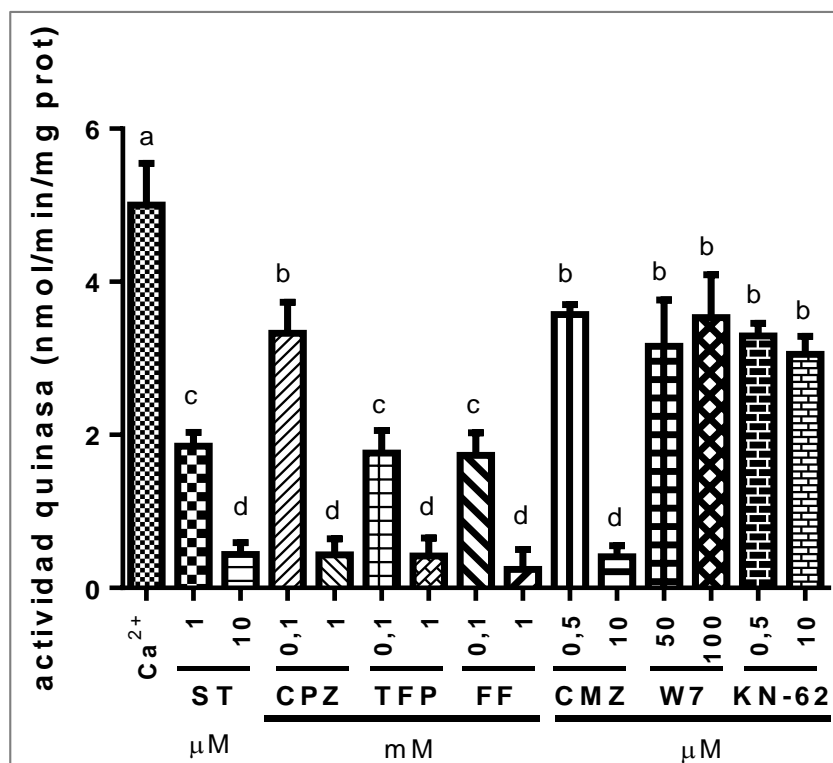


**Fig. C2.5** Curvas de  $\text{Ca}^{2+}$  (A) y EGTA (B); (C) Actividad quinasa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (25 $\mu\text{M}$ ) o EGTA (1,5, 10 mM). En C, actividad quinasa en nmol/min/mg proteína de ambas isoformas utilizando Syntide-2 como sustrato aceptor. Se representa Media  $\pm$  SEM de nueve experimentos con dos réplicas técnicas cada uno en el caso de StCDPK24 (●) y de cuatro experimentos con dos réplicas técnicas cada uno en el caso de StCDPK22 (●). Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Es evidente la mayor actividad de StCDPK24 respecto de StCDPK22 (~5 veces en panel C); la mayor activación se obtuvo con 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (panel A) por lo que se siguió usando esta concentración en futuros experimentos. Por otro lado, se confirma que StCDPK22:6xHis y

StCDPK24:6xHis no son completamente dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que se detecta actividad en presencia de EGTA (panel B). Como se observa en el panel C, hay diferencias significativas en la actividad de StCDPK24 en presencia de calcio y EGTA, pero aún en presencia de 10 mM EGTA se detecta un 37% de actividad residual. Por otro lado, en el caso de StCDPK22 no hay diferencias significativas entre calcio y EGTA, aunque la actividad se reduce en presencia del quelante.

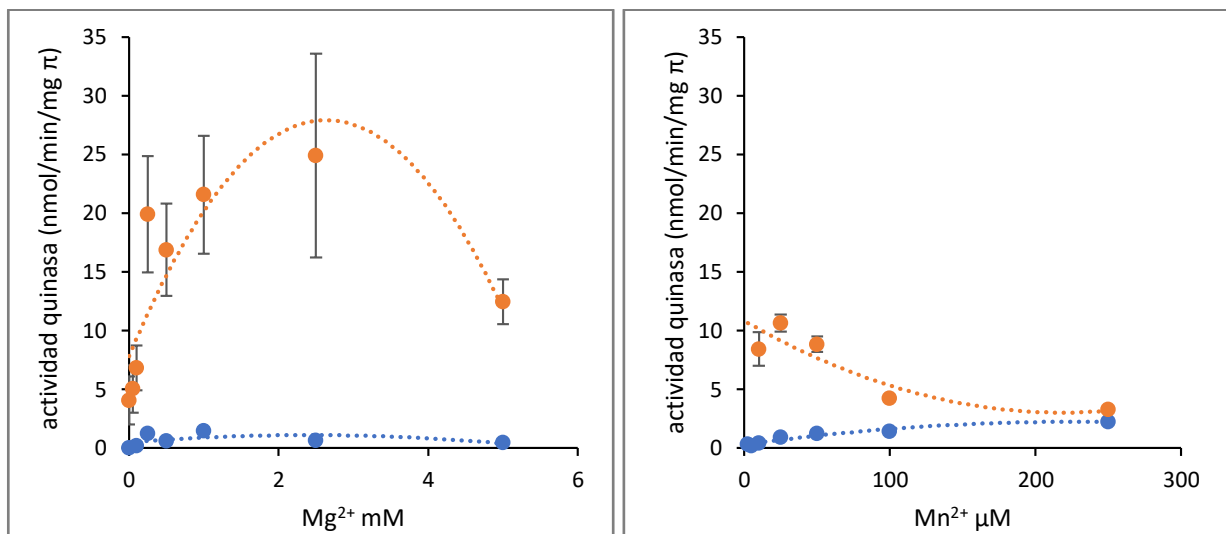
La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se confirmó adicionalmente en presencia de antagonistas de calmodulina (Fig. C2.6). Debido a la baja actividad de StCDPK22 este ensayo se realizó únicamente con StCDPK24. Todos los ensayos se realizaron en presencia de 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ; la actividad en ausencia de inhibidor se usó como control positivo, y la actividad en presencia de estaurosporina (ST), inhibidor de PKs que compite con el ATP, como control negativo (inhibe más del 90% de la actividad). Los antagonistas de CaM derivados de las fenotiazinas (CPZ, TFP, FF) forman complejos con CaM impidiendo su interacción con calcio. Como se observa, las tres drogas inhiben la actividad enzimática de StCDPK24, siendo su efecto a 1 mM similar al de 10  $\mu\text{M}$  ST. Un efecto similar se observó con otro antagonista de CaM (CMZ) en concentraciones micromolares, mientras que la inhibición con W7 y con el inhibidor de la CaMKII, KN-62 fue menor, aunque significativa. Estos resultados indican que el efecto activador del calcio es mediado a través del CLD de la proteína.



**Fig. C2.6 Inhibición de la actividad StCDPK24 por quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y antagonistas de CaM.** Todos los ensayos se llevaron a cabo en presencia de 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  utilizando 15  $\mu\text{M}$  Syn, 50  $\mu\text{M}$  ATP( $\gamma^{32}\text{P}$ ) y 200 ng de enzima. Se determinó la actividad quinasa de StCDPK24:6xHis en ausencia de inhibidores (control positivo), en presencia del inhibidor de quinasas estaurosporina (ST, control negativo) o de los antagonistas de CaM: clorpromazina (CPZ), trifluoperazina (TFP), flufenazina (FF) (0,1 y 1 mM), cloruro de calmidazolio (CMZ), derivados del ácido naftaleno - sulfónico W7 (W7), (1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) (KN-62). Se representa Media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En la figura se indican las concentraciones de los inhibidores utilizadas.

## 2.4 - Cofactores del complejo ATP-Me<sup>2+</sup>. Preferencia de Magnesio y Manganeso

En la célula el ATP se encuentra formando un complejo con iones metálicos divalentes (Me<sup>2+</sup>). El magnesio es el ion metal divalente más abundante en la célula siendo su concentración citosólica entre 0,5 y 1 mM. Su interacción con ATP modifica la interacción de éste con las proteínas; además, la unión con un segundo ion es crítica para la unión de ATP al dominio quinasa (Saylor *et al.* 1998; Sun y Budde, 1997). De esta manera, la presencia de Mg<sup>2+</sup> regula la actividad quinasa (Lin *et al.* 2005). Sin embargo, otros metales, tales como el manganeso (Mn<sup>2+</sup>), cuya concentración citosólica oscila entre 60 y 150 µM, son adecuados para la catálisis. Se determinó la actividad de StCDPK22 y StCDPK24 en presencia de 25 µM Ca<sup>2+</sup> utilizando Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como cofactores (ATP-Me<sup>2+</sup>) (Fig. C2.7).



**Fig. C2.7** Requerimiento de cofactores para StCDPK22:6xHis (●) y StCDPK24:6xHis (●). Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando 15 µM Syn y 50 µM de ATP( $\gamma^{32}\text{P}$ ) como sustratos aceptor y donador respectivamente. Curvas de concentración de Mg<sup>2+</sup> (panel izquierdo) y Mn<sup>2+</sup> (panel derecho). Actividad quinasa en nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína. Se representa Media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes con dos réplicas técnicas cada uno.

Como se observa en la Fig. C2.7, la actividad de StCDPK24:6xHis fue mucho mayor utilizando Mg<sup>2+</sup> como cofactor; el óptimo en este caso se encuentra entre 0,25 y 2,5 mM (panel izquierdo). Por el contrario, la concentración óptima de Mn<sup>2+</sup> resultó ser 10-25 µM para StCDPK24:6xHis; concentraciones más altas inhiben fuertemente la actividad quinasa (panel derecho). Sin embargo, en el caso de StCDPK22:6xHis concentraciones superiores a 1 mM Mg<sup>2+</sup> inhibieron la actividad (panel izquierdo) mientras que 250 µM Mn<sup>2+</sup> no resultó inhibitoria (panel derecho).

Existen pocas diferencias entre las esferas de coordinación de Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> responsables de la especificidad catiónica, siendo los motivos más comunes DXD o DXDXD (Kretsinger, 2013). Los residuos histidina (H) están subrepresentados en ciertas posiciones alrededor de los residuos de ácido aspártico (resaltados en negrita) y E involucrados en la coordinación de Mg<sup>2+</sup> (NADFDGD, YXDD o LXDD) (Dudev y Lim, 2007), mientras que están sobrerrepresentados en ciertas posiciones alrededor de los residuos de D y E que coordinan Mn<sup>2+</sup> (motivos DXH, DXXH o HXD) (Khrustalev *et al.* 2016). De esta manera, la ausencia de H alrededor de D capaz de unir

cationes lo hace propenso a unir más bien  $Mg^{2+}$  que  $Mn^{2+}$ . La región de la bobina aleatoria en el motivo "cadena  $\beta$  - bobina aleatoria - hélice  $\alpha$ " para la unión de  $Mg^{2+}$  es generalmente más corta que la del mismo motivo para la coordinación de  $Mn^{2+}$ . Esta característica está asociada con el menor número de aminoácidos de unión (y menores niveles de uso de aglutinantes "principales" como D y E) para  $Mg^{2+}$  (que es un ácido de Lewis fuerte) en comparación con los de  $Mn^{2+}$  (un ácido de Lewis intermedio) (Khrustalev *et al.* 2016).

Los resultados sugieren que ambas enzimas difieren en el requerimiento del cofactor en el complejo ATP- $Me^{2+}$ . Al analizar las secuencias aminoacídicas de StCDPK22/24 se puede observar que ambas contienen el motivo característico DFG del subdominio VII en el KD de unión al  $Mg^{2+}$  (Steichen *et al.* 2012); el residuo D se encarga de unir dos cationes de  $Mg^{2+}$  en colaboración con la asparagina (N) del sitio catalítico y también el dominio YXDD mencionado por Dudev y Lim (2007). Sin embargo, se puede observar un sitio DYAH que podría coordinar la unión a  $Mn^{2+}$  (Fig. C2.8) en el dominio NTV de StCDPK22 mientras que StCDPK24 tiene uno entre los *EF-hand*-3 (DEH). Esta última localización estaría desfavorecida para la unión a  $Mn^{2+}$  frente a la presencia de iones  $Ca^{2+}$  debido a la mayor afinidad por este último (Kretsinger, 2013). Quizás la preferencia de StCDPK22 por el  $Mn^{2+}$  se deba a la presencia del sitio adicional en el NTV.

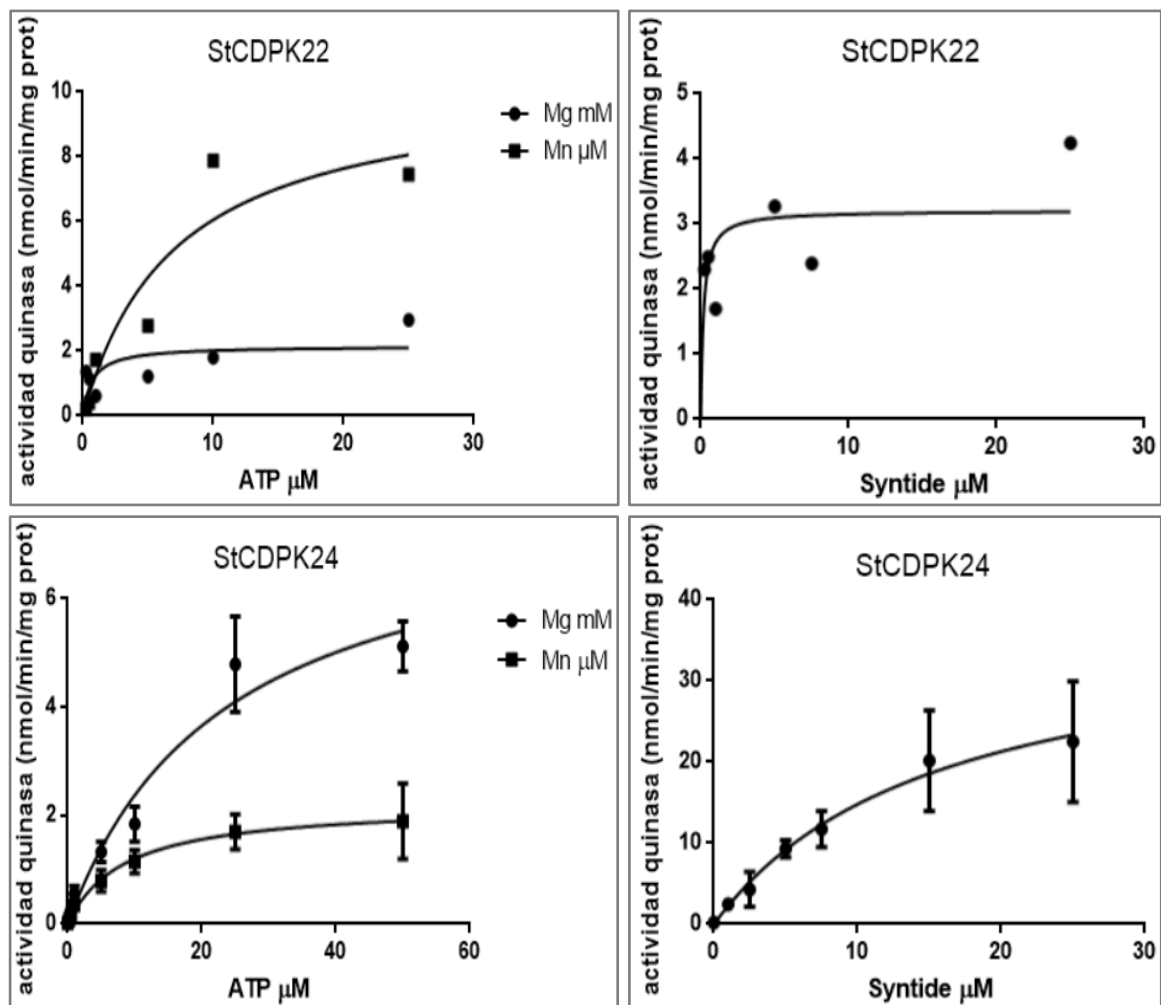
```
>St22
MGNCCAVPKTSETEEKRGKGNKPNPFSVDYAHGNGHKSIVLDNPTGTDIEATYELGRELGRGEFGVTTY
LSTDKVSGDVYACKSISKKKLRTRVDIEDVRREVEIMKHLPKHSNIVTLKDTYEDDNAVHIVMELCEG
GELFDRI VARGHYTERAAA AVTRIVEVIQMCHKHGV MHRDLKPENFLFENKKE TAPLKAIDFGLSVF
FKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKR DYGPEVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETE QGVAQAIIRSAVNF
KRDPWPVKVSDNAKDLVKKMLNPDPSKRLTAQEVLDHPWIQNAKKAPNVSLGETVKARLKQFSMMNKLK
KRALRVIAEHLTVDEVAGIKEGFQ LMDIGNKGI DVNELRVGLQKLGHQIPESDVQILMDVGDVDKDG
FLDYGEFVAISVHLRKM ANEEHLKKA FDFDRNQNGYIEIEELREALDDEIETNSEEVINAIMQD VDT
DKDGRISYDEFSTMMKAGTDWRKASRQYSRERYNSLSLKLMDGSLQS

>St24
MGNCCGTPGNSENKKKKNKPNPFALDYGATQASGGDGNKLVVLKDPTRHNIQEKYDLGCELGRGEFGV
TYLCTDVTGDKYACKSISKKKLR TAVDIDDVRREVEIMKHLPKHPNIVTLKDTYEDDNAVHIVMELC
EGGELFDRI VARGHYTERAAAVIMKTIVEVVQMCHMHGV MHRDLKPENFLFGNKKEA APLKAIDFGLS
VFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKRNYGPEVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETE QGVAQAIIRSVV
DFKRDPWPVKVSDNAKDLVKKMLDPDPTRRLTAQQVLEHTWLQNIKKAPNVSLGETVKARLKQFSVMNK
LKKRALTIMAEFLSAEEVAGMKEAFDMMDTGKKGKINLGELRNGLQKLGHQIPDADLQILMEAA DVDR
DGS LN YGEFVAVSVHLRKM ANDEHLHKAFSVFDRDQSGYIEIEELRSALSDEDGGNSEEVINAIMHDV
DTDKDGRISYEEFAVMMKAGTDWRKASRQYSRERFNSLSLKLMDRGSIQVGKEEGR
```

**Fig. C2.8 Sitios de unión de cofactores.** Unión de  $Mn^{2+}$  subrayado; unión de  $Mg^{2+}$  doble subrayado de acuerdo a Dudev y Lim (2007). KD en azul, AD en verde y *EF-hand* en rojo. En gris se resaltan los aminoácidos del motivo DFG y la N que unen  $Mg^{2+}$ .

## 2.5 - Determinación de los parámetros cinéticos ( $V_{m\acute{a}x}$ y $K_M$ )

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de cada enzima se hicieron curvas de concentración del sustrato aceptor (el péptido comercial Syntide-2) y del sustrato donador (complejo ATP- $Me^{2+}$ ) usando como cofactor  $Mg^{2+}$  (0,25 mM) o  $Mn^{2+}$  (25  $\mu$ M) en presencia de 25  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  (Fig. C2.9).



**Fig. C2.9 Actividad quinasa con sustratos dadores y aceptores de grupos fosfatos.** Curvas de concentración de ATP usando Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como cofactor (paneles izquierdos) y de Syntide (paneles derechos). Actividad quinasa (nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína) para StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis. El análisis de los datos y los gráficos se realizaron a través del programa *GraphPad Prism* v6.01. Se representa Media ± SEM de cuatro experimentos independientes con dos réplicas técnicas para StCDPK24 mientras que los datos presentados para StCDPK22 corresponden a un único experimento con dos réplicas técnicas.

En las curvas de Syntide-2 se utilizó 50 μM ATP-Mg<sup>2+</sup> como sustrato donador y en las de ATP se usó 25 μM Syntide-2 para asegurarnos que estuvieran en exceso. A partir de las curvas de concentración se puede observar que la cinética de reacción se ajusta al modelo *Michaelis-Mentem* para ambos sustratos. Es claro que el complejo ATP-Mg<sup>2+</sup> es el preferido para StCDPK24, ya que la enzima triplica su actividad con Mg<sup>2+</sup> respecto de Mn<sup>2+</sup> mientras que lo opuesto ocurre para StCDPK22. Sin embargo, es necesario confirmar este último resultado dada la baja actividad que siempre encontramos en esta enzima.

Realizando las regresiones lineales de cada curva (Fig. C2.10), se obtienen la V<sub>máx</sub> de reacción, calculando la inversa de la ordenada al origen, y el K<sub>M</sub>, concentración del sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la V<sub>máx</sub>. La pendiente de la recta es igual a K<sub>M</sub>.V<sub>máx</sub><sup>-1</sup>, por lo tanto a partir de ello se obtiene el K<sub>M</sub>. Se utilizó el paquete estadístico *GraphPad Prism* v6.01, para obtener los parámetros que se detallan en la Tabla C2.1. Los resultados indican que para StCDPK22:6xHis el K<sub>M</sub> para el complejo ATP-Me<sup>2+</sup> es 0,7 μM o 7 μM dependiendo si se usó Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como cofactor, mientras que para StCDPK24:6xHis el K<sub>M</sub> fue de 23,4 o 8 μM. Dado que

la concentración intracelular de ATP en células vegetales se estima en 1,3 mM (Blatt, 1987) su concentración no es limitante. En el caso de Syntide-2, el  $K_M$  fue 0,18  $\mu\text{M}$  y 15,6  $\mu\text{M}$  para StCDPK22 y StCDPK24 respectivamente por lo que la baja actividad detectada para StCDPK22 no se debe a las concentraciones utilizadas en los ensayos. Por otro lado, las  $V_{\text{máx}}$  obtenidas son 0,0032 para StCDPK22 y 0,038  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  para StCDPK24, en consonancia con la diferencia de actividad entre ambas enzimas.

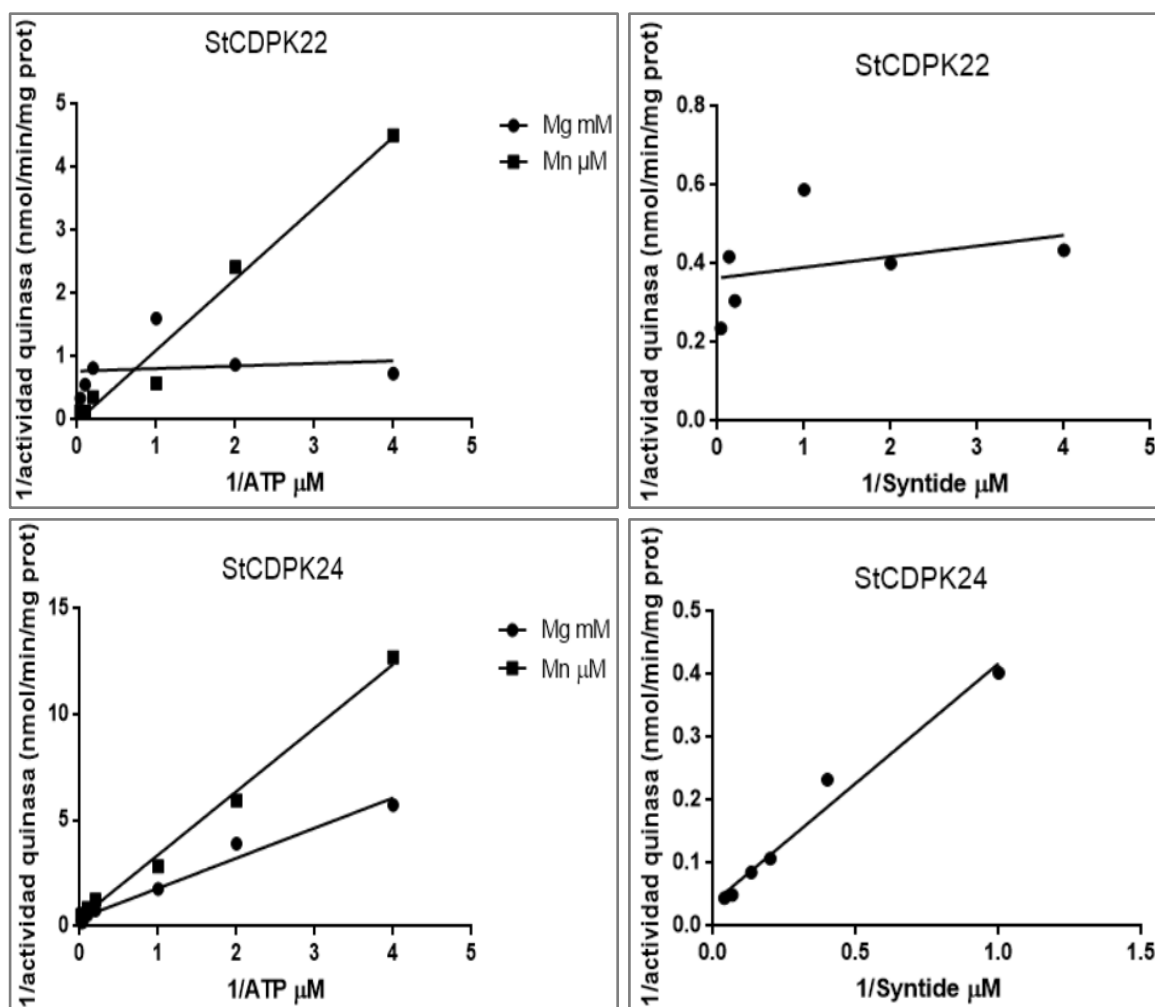


Fig. C2.10 Transformación de Lineweaver-Burk. A partir de las curvas de concentración  $\mu\text{M}$  de ATP y Syn se realizó la regresión lineal para calcular los parámetros cinéticos correspondientes a cada isoforma.

Se compararon los valores de  $K_M$  y  $V_{\text{máx}}$  obtenidos para StCDPK22/24:6xHis con los de las isoformas StCDPK1/2/3/7:6xHis ya caracterizadas en nuestro laboratorio (Tabla C2.1). StCDPK24 muestra un  $K_M$  similar para ATP- $\text{Mg}^{2+}$  que StCDPK1/2/7:6xHis mientras que StCDPK22 tendría una afinidad más parecida a StCDPK3:6xHis. En el caso de las  $V_{\text{máx}}$  obtenidas, las CDPKs del grupo III muestran menor actividad que las otras CDPKs caracterizadas. StCDPK3/7/22/24:6xHis comparten la misma concentración óptima de  $\text{Ca}^{2+}$  (25  $\mu\text{M}$ ) a la cual alcanzan la actividad máxima, aunque las dos primeras conservan los 4 sitios *EF-hand*. En cambio, StCDPK1:6XHis y StCDPK2:6XHis, presentan mayor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  (Giammaria *et al.* 2011; Grandellis *et al.* 2012, Fantino *et al.* 2017). Estos resultados indican que más allá de la identidad de sus dominios catalíticos, cada una de estas isoformas presenta parámetros



cinéticos específicos y posiblemente blancos específicos de fosforilación.

Tabla C2.1 Parámetros cinéticos de las CDPKs.

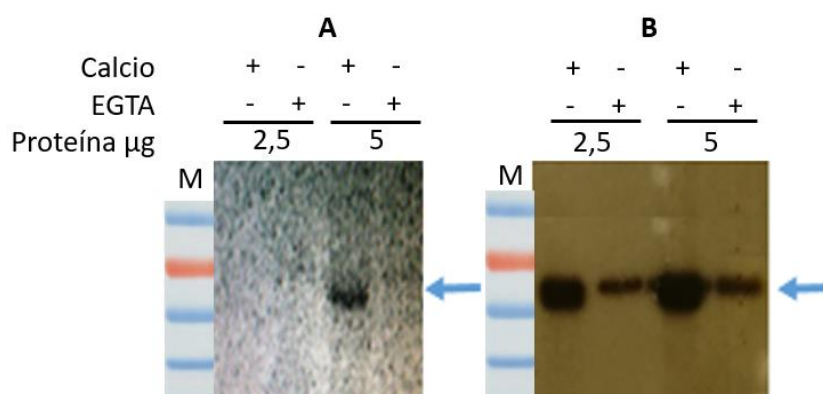
Isoforma CDPK	K <sub>M</sub> (μM)		V <sub>máx</sub> μmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	Actividad Máxima Ca <sup>2+</sup> (μM)
	ATP Sustrato donador	Syntide-2 Sustrato aceptor		
StCDPK22:6xHis	Mg <sup>2+</sup> : 0,71 Mn <sup>2+</sup> : 7,08	0,18	0,0032	25(?)
StCDPK24:6xHis	Mg <sup>2+</sup> : 23,44 ± 8,42 Mn <sup>2+</sup> : 8,40 ± 3,95	15,64 ± 12,44	0,038 ± 0,01568	25
StCDPK1:6xHis (*)	19,7 ± 0,03	7,74 ± 0,04	0,05 ± 0,01	2,5
StCDPK2:6xHis (**)	18 ± 0,03	1,75 ± 0,04	0,4 ± 0,05	0,6
StCDPK3:6xHis (*)	3,3 ± 0,02	31,2 ± 0,04	0,094 ± 0,01	25
StCDPK7:6xHis (***)	14,76 ± 2,9	8,17 ± 1,48	0,287 ± 0,019	25

Comparación de K<sub>M</sub> y V<sub>máx</sub> utilizando ATP y Syn como sustratos, y de la concentración de Ca<sup>2+</sup> a la cual las isoformas alcanzan su actividad máxima. (?) La actividad fue mayor con 25μM Ca<sup>2+</sup>, pero debido a la baja actividad de StCDPK22 no hubo diferencias significativas entre Calcio y EGTA. (\*) [Grandellis et al. 2012](#). (\*\*) [Giammaria et al. 2011](#). (\*\*\*) [Fantino et al. 2017](#).

Los resultados sugieren que StCDPK22:6xHis tiene muy baja o nula actividad; de acuerdo a [Asai et al. \(2013\)](#) la proteína recombinante StCDPK6:6xHis también carece de actividad mientras que StCDPK7, con la que comparte una alta identidad de secuencia, es muy activa ([Fantino et al. 2017](#)), sugiriendo que algunas CDPKs habrían perdido actividad más allá de conservar un KD aparentemente funcional. Sin embargo, no conocemos los verdaderos blancos de fosforilación de estas PKs en la célula vegetal por lo que nuestra caracterización es limitada. Una vez identificados los sustratos *in vivo* sería importante estimar los parámetros cinéticos y evaluar más específicamente la actividad de StCDPK22/24.

## 2.6 - Autofosforilación de StCDPK22 y StCDPK24

En los ensayos de fosforilación de H1 detectamos una banda fosforilada de 60 kDa que podía corresponder a la autofosforilación de StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis. Con el fin de confirmar este dato se incubaron ambas proteínas recombinantes con la misma mezcla de reacción usada para la fosforilación de H1, pero sin sustrato. En este ensayo usamos concentraciones más altas de enzima (2,5 y 5 μg en vez de 1 μg). Luego de la corrida electroforética los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y éstas se expusieron a placas autorradiográficas (12 h) o se escanearon en equipo *STORM* luego de una semana (Fig. C2.11).

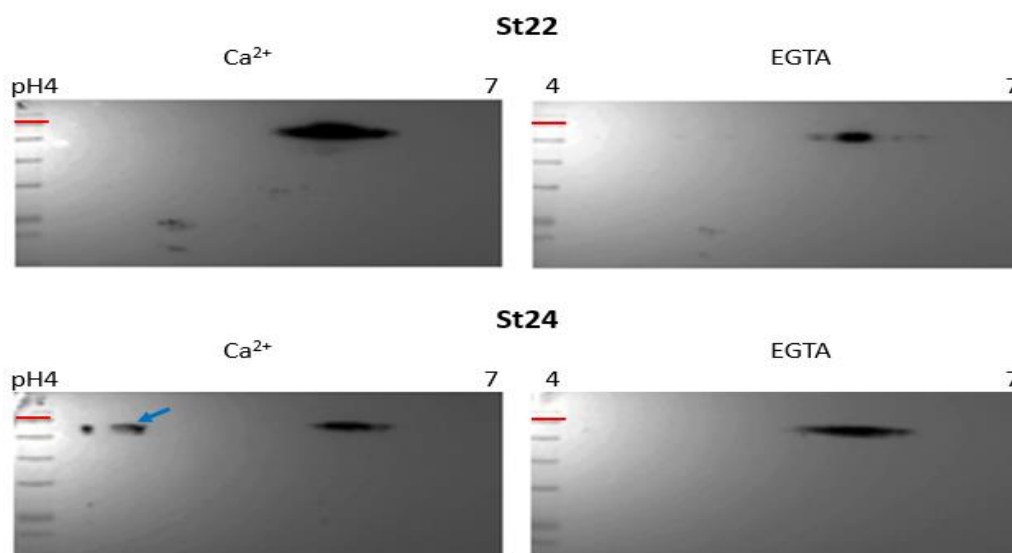


**Fig. C2.11 Autofosforilación de StCDPK22:6xHis (A) y StCDPK24:6xHis (B).** Los ensayos se realizaron incubando 2,5 o 5  $\mu\text{g}$  de las proteínas recombinantes con 5  $\mu\text{M}$  ATP( $\gamma^{32}\text{P}$ ) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (5  $\mu\text{M}$ ) o EGTA (5 mM). En **A** la membrana se escaneó en el equipo *STORM* luego de una semana de exposición, mientras que en **B** la placa radiográfica se reveló luego de 12 horas de exposición. M: *marker* PageRuler, la banda de 70 kDa se indica en rojo.

En ambos casos se detectó autofosforilación de una proteína de 60 kDa. En el caso de StCDPK22 sólo detectamos la señal cuando se usaron 5  $\mu\text{g}$  de enzima y el ensayo se realizó en presencia de calcio, mientras que para StCDPK24 la banda fosforilada se detectó usando las dos concentraciones de enzima tanto con calcio como con EGTA, aunque es evidente el aumento de la autofosforilación en presencia de calcio.

A continuación, se incubaron las proteínas recombinantes (200  $\mu\text{g}$ ) con 1 mM ATP frío en presencia de 25  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  y 10 mM EGTA durante 1 h a 30 °C. Luego se analizaron las muestras por electroforesis bidimensional (2D); se usaron *strips* de pH 4-7 para la primera dimensión y geles de 12% para la segunda. Luego de la corrida electroforética los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se revelaron con un anticuerpo anti-His. Los pI estimados son 5,9 y 6,1 para StCDPK22 y StCDPK 24 respectivamente (Tabla C1.1). En ambas condiciones el anticuerpo detectó, a la altura esperada (60 kDa) un “collar de perlas” formado por distintos *spots* que podrían corresponder a diferentes estados de fosforilación de las proteínas (Fig. C2.12).

La mayor intensidad observada en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto de EGTA para StCDPK22 puede deberse a un problema técnico durante la precipitación posterior a la reacción de autofosforilación; sin embargo, se detectan menos *spots* en presencia de EGTA sugiriendo que los estados de fosforilación se reducen. Cuando la reacción de autofosforilación de StCDPK24 se hizo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se detectan algunos *spots* que migran hacia pH mucho más ácidos; esto puede deberse a la acumulación de cargas negativas de los grupos fosfato (Fig. C2.12). Cuando se realiza la reacción con EGTA, la proteína no migra hacia pH más ácidos. Nuestros datos sugieren que ambas enzimas se autofosforilan en múltiples sitios.



**Fig. C2.12 Electroforesis bidimensional.** Se utilizaron 200 µg por gel, 25 µM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM EGTA. Las membranas se revelaron con el anticuerpo anti-His (1:500). La flecha azul indica los *spots* que migran hacia pH más ácidos. *marker* PageRuler, la banda de 70 kDa se indica en rojo.

## 2.7 - Predicción y determinación de sitios de fosforilación

Para evaluar qué residuos podían ser fosforilados en ambas isoformas utilizamos el programa *NetPhos 3.1 Server* (Blom *et al.* 1999). A cada uno de éstos se le asigna un valor de predictibilidad y se consideraron sólo aquellos que presentan un valor  $\geq 0,85$ . Este mismo análisis lo hicimos con las otras CDPKs del grupo III (Tabla C2.2).

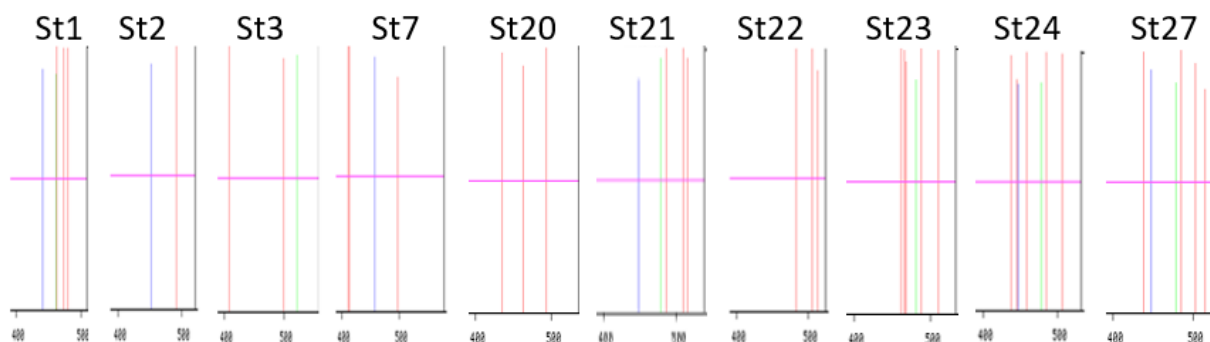
**Tabla C2.2 Predicciones de sitios de fosforilación en las CDPKs del grupo III.**

Isoforma	Sitios predichos				Distribución (compartidos)			
	S	T	Y	Total	NTV	KD	AD	CLD + CTV
StCDPK20	10	4	3	17	6	7 (3)	0	4 (2)
StCDPK21	8	2	1	11	3	3 (1)	0	6 (5)
StCDPK22	7	5	2	14	1	7 (6)	2 (2)	4 (5)
StCDPK23	10	7	2	19	1	8 (6)	2 (2)	8 (3)
StCDPK24	11	7	3	21	2	7 (6)	3 (2)	9 (6)
StCDPK27	11	3	2	16	2	6 (4)	0	8 (6)

Se indica cantidad y ubicación de los residuos fosforilados.

Como se observa en la Tabla C2.2 y en el alineamiento de la Fig. C2.14, las seis isoformas cuentan con varios residuos serina, treonina y tirosina (Y) pasibles de ser fosforilados. En todas se predijeron residuos que podrían fosforilarse en el NTV (seis en StCDPK20, tres en StCDPK21, dos en StCDPK24/27 y uno en StCDPK22/23). Además, se predijeron sitios de fosforilación en el dominio KD (ocho en StCDPK20/22/23, siete en StCDPK24 y seis en StCDPK27). Algunos de estos sitios se comparten entre las isoformas, en particular la predicción de una o dos S en el subdominio II del KD (S<sup>85/87</sup> o S<sup>87/89</sup> en StCDPK22/24 respectivamente) y en cinco CDPKs se predijo la fosforilación de una T (T<sup>150</sup> o T<sup>152</sup> en StCDPK22/24 respectivamente) entre los

subdominios V y VI. Sólo en StCDPK22/23/24 se predijeron sitios de fosforilación en el AD (dos de los sitios se comparten entre las tres isoformas). Además, se predijeron varios sitios de fosforilación en el CLD (nueve en StCDPK24, ocho en StCDPK21/27, seis en StCDPK22 y cuatro en StCDPK23/20). Las seis isoformas comparten la predicción de la fosforilación de una S en el cuarto *EF-hand* ( $S^{483}$  o  $S^{485}$  en StCDPK22/24 respectivamente). Llamó la atención la cantidad de sitios que se predijeron en StCDPK24 en los últimos 100 aminoácidos de la proteína (CLD y C-terminal). Esto también se observa cuando se compara con StCDPK1/2/3 del grupo II y con StCDPK7 del grupo I de la familia CDPK de papa (Fig. C2.13).



**Fig. C2.13** Comparación de los sitios de fosforilación predichos en la región C-terminal de distintas CDPK de papa. *Threshold* de 0,85 en el programa *NetPhos 3.1 Server*.

Para determinar fehacientemente si dichos residuos son fosforilados, 50  $\mu\text{g}$  de cada proteína se fosforilaron con ATP frío en presencia de 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  o 10 mM EGTA, se precipitaron y se corrieron en gel de poliacrilamida 12% para finalmente cortar las bandas correspondientes. Las cuatro bandas de gel obtenidas se colocaron en agua ultra pura y se enviaron a la Plataforma de Proteómica del Centro de Investigación de CHU, Quebec – Canadá para su análisis por LC-MS/MS. Según el programa *Scaffold 4.9* y con un 57% de cobertura, se determinó que StCDPK22+EGTA se fosforila en 6 residuos distintos; lamentablemente ocurrió un error con la muestra StCDPK22+ $\text{Ca}^{2+}$  (10% cobertura, se detectaron sólo 4 péptidos) y no pudimos tener resultados confiables.

En el caso de StCDPK24+ $\text{Ca}^{2+}$  hubo fosforilación en 6 residuos (con una cobertura del 77%), y en StCDPK24+EGTA hubo en 4 residuos (con cobertura del 58%) que también se fosforilaron en la otra condición ensayada (Fig. C2.13 y Tabla C2.3). Se confirmó que ambas isoformas se autofosforilan en dos residuos ( $S^{321/323}$  y  $T^{323/327}$  respectivamente) del dominio AD en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y que StCDPK22 se fosforila en la  $S^{83}$  del subdominio II del KD. Además, se confirmó la fosforilación de  $S^{33}$  en el dominio NTV de StCDPK24 y se determinó que StCDPK22 se autofosforila en la  $Y^{39}$  y en  $S^{297}$  (fosforilaciones que no fueron predichas). Por último, se identificaron dos residuos fosforilados en el CLD de StCDPK24 ( $S^{438}$ , fosforilación también reportada en LeCPK1 de tomate (Rutschmann *et al.* 2002), y  $S^{445}$ ) que sólo se detectaron en presencia de calcio, y en ambas isoformas se detectó la fosforilación de una S en el C-terminal (Fig. C2.14 y Tabla C2.3). Este análisis se debe repetir nuevamente para tener mayor certeza, pero al momento no fue posible debido al costo del servicio.



En la Tabla C2.3 se muestra el entorno de fosforilación de los sitios identificados y únicamente se observa la secuencia RxxS/T en dos de los sitios de StCDPK24.

**Tabla C2.3 Localización de los residuos fosforilados en StCDPK22/24.**

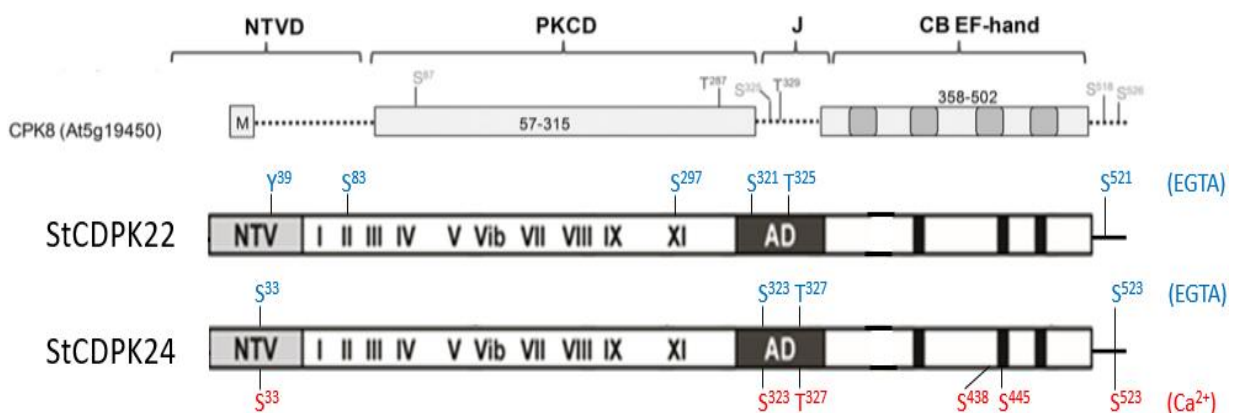
Isoforma	Dominio	Contexto
StCDPK22	NTV	GHKSYVLDN
	KD	YACKSISKK
		NPDPSKRLT
	AD	APNVSLGET
		SLGETVKAR
CTV	MKDGSLQS-	
StCDPK24	NTV	ATQASGGDG
	AD	APNVSLGET
		SLGETVKAR
	CLD	HKAFSVFDR
		DRDQSGYIE
CTV	MRDGSIQVG	

Se resaltan en rojo los residuos fosforilados para cada isoforma y en gris la secuencia RxxS/T.

En general, el número de sitios de autofosforilación y el grado de fosforilación en cada sitio no están suficientemente bien documentados, aunque se ha informado que la autofosforilación ocurre en múltiples sitios dentro de varios péptidos de CDPKs diferentes. Sólo se han descrito pocos *knockouts* en sitios de autofosforilación de CDPKs directamente relacionados con fenotipos específicos; hasta la fecha el único publicado es CDPK4 de *Plasmodium berghei*, que es esencial para la formación de gametocitos masculinos y la progresión a través de las etapas reproductivas del ciclo de vida plasmodial (Hegeman *et al.* 2006). Una de las cuestiones centrales inherentes al estudio de la autofosforilación *in vitro* es que puede ser difícil distinguir la fosforilación espuria de la fosforilación mecánica o fisiológicamente relevante *in vivo*. Podría decirse que la observación generalizada de este fenómeno dentro de esta familia de proteínas podría ser simplemente el resultado de la actividad promiscua de las PKs. Sin embargo, dada la ausencia de un sistema robusto para la complementación *in vivo*, se pueden obtener pistas importantes sobre la función biológica a partir de la caracterización sistemática de la autofosforilación en múltiples isoformas de CDPK para dilucidar las características conservadas y las tendencias generales en la fosforilación dentro de las secuencias primarias de aminoácidos.

En nuestro caso pudimos corroborar que ambas quinasas se autofosforilan en varios residuos (indicados en la Fig. C2.15). En muchos casos la autofosforilación se detectó en ausencia de calcio sugiriendo que el estado habitual de la proteína es con estos residuos fosforilados. En particular, los dos residuos que son fosforilados en el AD de ambas isoformas (S<sup>321/323</sup> y T<sup>325/327</sup>) y la S<sup>521/523</sup> en el C-terminal se corresponden con los identificados en AtCPK8 (Swatek *et al.* 2014), ortólogo de StCDPK24 en Arabidopsis. Swatek *et al.* (2014) también encontraron que la mayor cantidad de residuos fosforilados en AtCPK8 se encuentran entre el AD y el C-terminal, lo que podría ser una característica del clado. De acuerdo a Boudsocq *et al.*

(2012), seis CDPKs de *Arabidopsis* del grupo III tienen baja o nula sensibilidad por el calcio; quizás la autofosforilación de estos residuos del AD contribuya a regular la actividad de este grupo de CDPKs. Se ha descrito que las CCaMK se autofosforilan en dos residuos (S<sup>343</sup> y S<sup>344</sup>) en el dominio de unión a CaM/autoinhibitorio (Routray *et al.* 2013). Datos bioquímicos indican que esta autofosforilación genera un cambio conformacional que impide la interacción de la PK con CaM anulando su actividad y regula negativamente el desarrollo de nódulos en el sistema radicular de *Medicago truncatula* (Downie, 2014; Jauregui *et al.* 2017). StCDPK22 presentó al igual que AtCPK8 una autofosforilación en el KD; la autofosforilación de la T<sup>287</sup> en AtCPK8 produce una actividad independiente de calcio al prevenir la reasociación del dominio catalítico y el segmento autoinhibidor (Ito *et al.* 2017). Por otro lado, en StCDPK24 detectamos dos residuos del dominio CLD cuya fosforilación depende de calcio y que podrían ser importantes para la activación de la proteína.



**Fig. C2.15** Mapa de los residuos fosforilados en AtCPK8 y StCDPK22/24. En rojo se indican los residuos fosforilados en presencia de Ca<sup>2+</sup>; en azul los que se fosforilaron en presencia de EGTA. Adaptado de Swatek *et al.* (2014).

Se ha observado autofosforilación en CDPKs nativas y recombinantes (Saha y Singh, 1995; Chaudhuri *et al.* 1999; Harmon *et al.* 2000) pero su papel en las actividades de las CDPKs no está claro. La actividad de McCPK1 de *Mesembryanthemum crystallinum* se abolió cuando se reemplazaron dos residuos que son autofosforilados (S<sup>62</sup> en el NTV y S<sup>420</sup> entre los EF-hands1-2) por A (Chehab *et al.* 2004). La autofosforilación permite a una CDPK de maní (*Arachis hypogea*, GncDPK) tener un cambio estructural y así poder fosforilar al sustrato exógeno MLCpep (péptido sintético de cadena liviana de miosina) (Chaudhuri *et al.* 1999); mientras que Saha y Singh (1995) reportaron que la autofosforilación previa reduce la fosforilación de dicho sustrato exógeno por parte de una PK de poroto (*Psophocarpus tetragonolobus*). Estas diferencias se pueden deber a la localización de los residuos que se autofosforilan y a los cambios que se generan en la estructura de la proteína. Por otro lado, la autofosforilación no mostró ningún efecto sobre la dependencia del Ca<sup>2+</sup> en las actividades CDPK de maní y soja (Chaudhuri *et al.* 1999; Harmon *et al.* 2000).

La autofosforilación puede ocurrir a través de varios mecanismos. Uno implicaría la formación de un homodímero, que puede reducir la distancia entre los sitios de autofosforilación de un monómero y el sitio activo del otro monómero (uno actuaría simultáneamente como sustrato y como activador alostérico del otro). Sin embargo, este





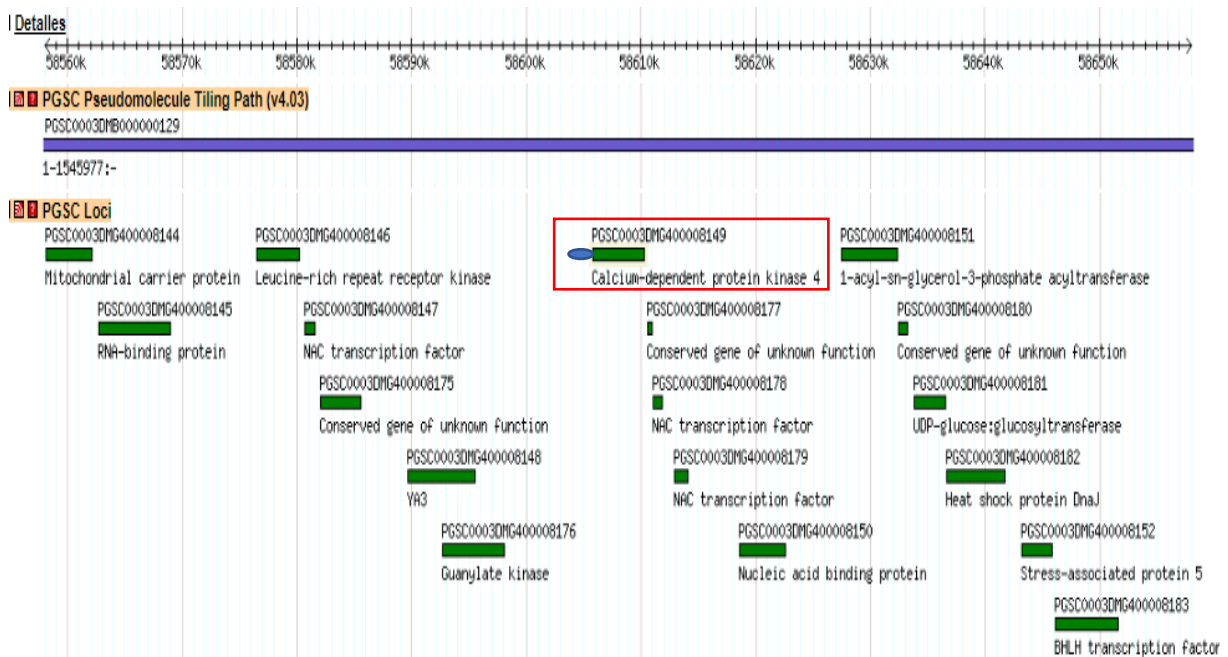
La activación de las CDPKs también puede ser modulada por otras proteínas quinasas. Por ejemplo, la activación completa de una CDPK de tabaco (NtCDPK2) requiere calcio y fosforilación. Debido a que el evento de fosforilación es insensible al antagonista W7 *in vitro*, y la autofosforilación *in vitro* no puede sustituir a la activación dependiente de fosforilación *in vivo*, la autofosforilación probablemente no sea responsable de esta activación (Romeis *et al.* 2000; Romeis *et al.* 2001). Por lo tanto, NtCDPK2 probablemente se activa a través de la fosforilación directa por una proteína quinasa aguas arriba. Por su parte, se reportó que la actividad de AtCPK24 es independiente del calcio, pero que AtCPK11 que es activada por Ca<sup>2+</sup> fosforila a AtCPK24, y ésta transduce las señales de calcio y regula la actividad de SPIK (*shaker pollen inward K<sup>+</sup>*) durante el crecimiento del tubo polínico al inhibir los canales de potasio (Zhao *et al.* 2013). A partir de estos resultados se propuso que podría haber un nuevo tipo de regulación que involucre cascadas de fosforilación en las que una CDPK perciba las oscilaciones de calcio y active a otro miembro de la familia que no presente sensibilidad al calcio (Schulz *et al.* 2013). Quizás este también pueda ser el caso para StCDPK22/24.

Nuestros resultados aportan a la caracterización de estas isoformas, pero para poder realmente entender su regulación y su función debemos conocer qué ocurre *in vivo* y encontrar sus sustratos fisiológicos. Otros autores han reportado sustratos específicos para las AtCDPKs del grupo III: AtCPK10/30 pueden activar el promotor de cebada *HVA1* que responde a ABA, el frío y la salinidad (Sheen, 1996); HSP1 se identificó como una proteína que interactúa con AtCPK10 (Zou *et al.* 2010); AtCPK13 fosforila AtKAT1 y AtKAT2 (Ronzier *et al.*, 2014) y al factor de choque térmico AtHsfB2a (Kanchiswamy *et al.* 2010); Swatek *et al.* (2014) demostraron que AtCPK8/24 son capaces de fosforilar At14-3-3 $\chi$  y  $\epsilon$  en varios sitios; AtCPK32 fosforila y activa el factor de transcripción ABF4 que responde a ABA (Choi *et al.* 2005). Estos datos sugieren que los miembros de este grupo podrían participar en la respuesta a estreses abióticos. Como una primera aproximación al estudio de la función de estas isoformas quisimos evaluar su expresión en tejidos de la planta y en respuesta al estrés salino.

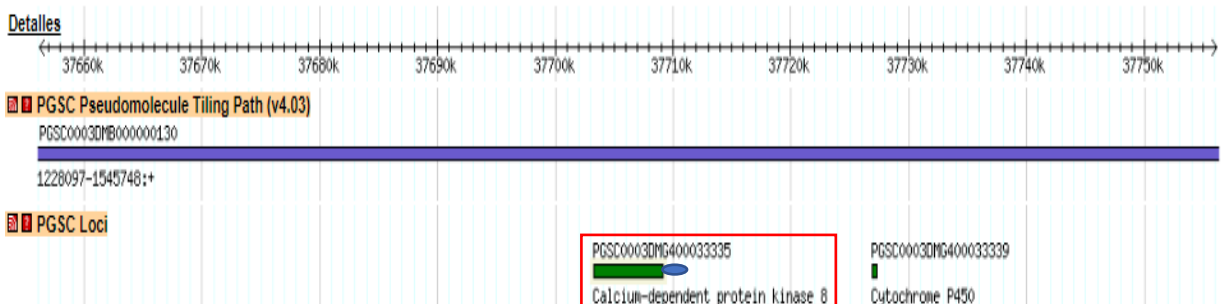
## CAPÍTULO 3: Estudio de expresión de *StCDPK22/24*

### 3.1 - Entorno genómico de *StCDPK22/24*

Para analizar el entorno genómico de *StCDPK22* y *StCDPK24* se analizaron regiones de 100 kb de los cromosomas 10 (entre 58,56 y 56,66 Mb) y 11 (entre 37,6 y 37,7 Mb) respectivamente. Se puede ver que el entorno de *StCDPK22* es rico en otros genes que codifican FTs, transferasas, proteínas de unión al ADN y al ARN, proteínas relacionadas a estreses, y otras quinasas. El gen más cercano río arriba, que codifica para un gen conservado de función desconocida, se encuentra a menos de 1 kb en orientación cola-cola. Además, hay dos factores de transcripción NAC con la misma orientación a 1 y 3 kb de distancia. A su vez, la secuencia más cercana río abajo, que codifica una proteína guanilato quinasa, se ubica a 8 kb en orientación cabeza-cabeza. Esto sugiere que la secuencia promotora a analizar sólo regularía la expresión de *StCDPK22* (Fig. C3.1). En cambio, en el entorno de *StCDPK24* solamente aparece el gen correspondiente al citocromo P450 en orientación cabeza-cola a una distancia de 18 kb, por lo que no habría solapamiento en la regulación de ambos genes (Fig. C3.2).



**Fig. C3.1 Entorno genómico de *StCDPK22*.** Se toman 100 kb del cromosoma 10. Elipse azul es la secuencia promotora de 2,1 kb. Según [Fantino et al. \(2017\)](#), *CDPK4* del PGSC corresponde a *StCDPK22* (Tabla C1.1).

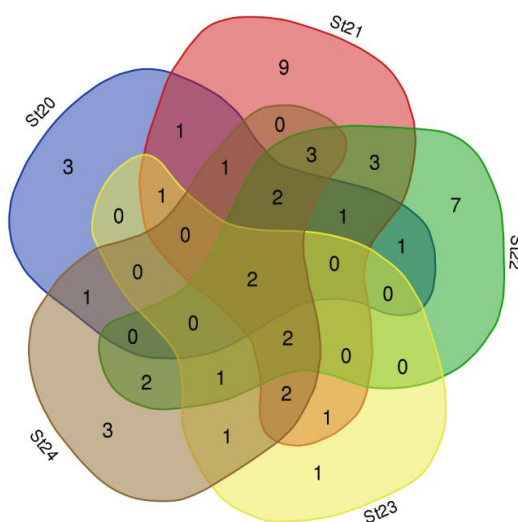


**Fig. C3.2 Entorno genómico de *StCDPK24*.** Se toman 100 kb del cromosoma 11. Elipse azul es la secuencia promotora de 2,1 kb. Según [Fantino et al. \(2017\)](#), *CDPK8* del PGSC corresponde a *StCDPK24* (Tabla C1.1).

Un análisis del entorno de los otros miembros del grupo reveló que el gen más cercano río arriba de *StCDPK21* está a 8 kb en orientación cabeza-cabeza (codifica una proteína de tipo pentatricopéptido) y río abajo hay un *gap* de 50 kb en el ensamblado del genoma. El gen más próximo a *StCDPK23* río arriba está a 3,3 kb en orientación cabeza-cola y codifica una ubiquitin-ligasa, y río abajo, a 7 kb en orientación cola-cola, se encuentra un gen de función desconocida. A 1,2 Kb río arriba del ATG de *StCDPK20*, en orientación cabeza-cabeza, se encuentra un gen que codifica para una proteína ribosomal y río abajo a 0,1 kb en orientación cola-cola se encuentra un gen que codifica para una E3 ubiquitin-ligasa. Por un error en el ensamblado del genoma de *S. phureja*, sólo se encuentra una secuencia parcial de *StCDPK27* que incluye la región 3'UTR, río abajo del gen, a 700 pb en orientación cola-cola se encuentra un gen que codifica una proteína látex. Por otro lado, 19 kb río arriba de su ortólogo en tomate (*Solyc09G005550.2.1*) se encuentra un factor de transcripción en orientación cabeza-cola que comparte la misma localización cromosómica en papa.

### 3.2 - Secuencias promotoras

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región de aproximadamente 2 kb río arriba del ATG de *StCDPK22/24* usando ADN genómico como templado, pero no tuvimos éxito. Decidimos entonces obtener las secuencias de interés (2,1 kb) del PGSC para analizar los elementos reguladores en *cis* presentes con la aplicación web *PlantPAN 3.0* (Chow *et al.* 2019). También obtuvimos las secuencias río arriba de los otros genes CDPK del grupo III para evaluar qué elementos tienen en común. Los elementos se agruparon de acuerdo a su función considerando aquellos con  $p \leq 2 \cdot 10^{-5}$  (Fig. C3.3).



**Fig. C3.3** Cantidad de elementos en *cis* que comparten las regiones promotoras de *StCDPKs* del grupo III. El diagrama de Venn muestra la cantidad de elementos en *cis* de cada región promotora compartidos o exclusivos. Se consideró un  $p \leq 2,0 \cdot 10^{-5}$ . Se analizó un total de 48 elementos encontrados en las cinco regiones promotoras con la siguiente distribución: 13 en *StCDPK20*, 28 en *StCDPK21*, 24 en *StCDPK22*, 11 en *StCDPK23* y 20 en *StCDPK24*.

Como se observa en la Fig. C3.3 y Tabla C3.1, los cinco genes del grupo III comparten dos tipos de elementos en sus regiones promotoras: sitios de unión para FTs de la familia AP2/ERF que están involucrados en sequía, tolerancia a salinidad, cambios de temperatura,

resistencia al ataque de patógenos, floración y germinación (Hoang *et al.* 2017; Muñiz García y Capiati, 2011; Sheshadri *et al.* 2016; Zhuang *et al.* 2010), y sitios de unión a FTs de la familia Homeodomain/HD-ZIP que están involucrados en procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas (Elhiti y Stasolla, 2009). Además, a excepción de *StCDPK23*, los otros genes presentan sitios de unión a FTs del tipo MYB, MYB-related o MYB-SANT relacionados con la respuesta a estrés hídrico (Chinnusamy *et al.* 2004; Sheshadri *et al.* 2016; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997) y sitios de unión a proteínas AT-Hook (Širl *et al.* 2020; Wong *et al.* 2019), mientras que todos menos *StCDPK20* contienen elementos de respuesta a auxinas (Tabla C3.1).

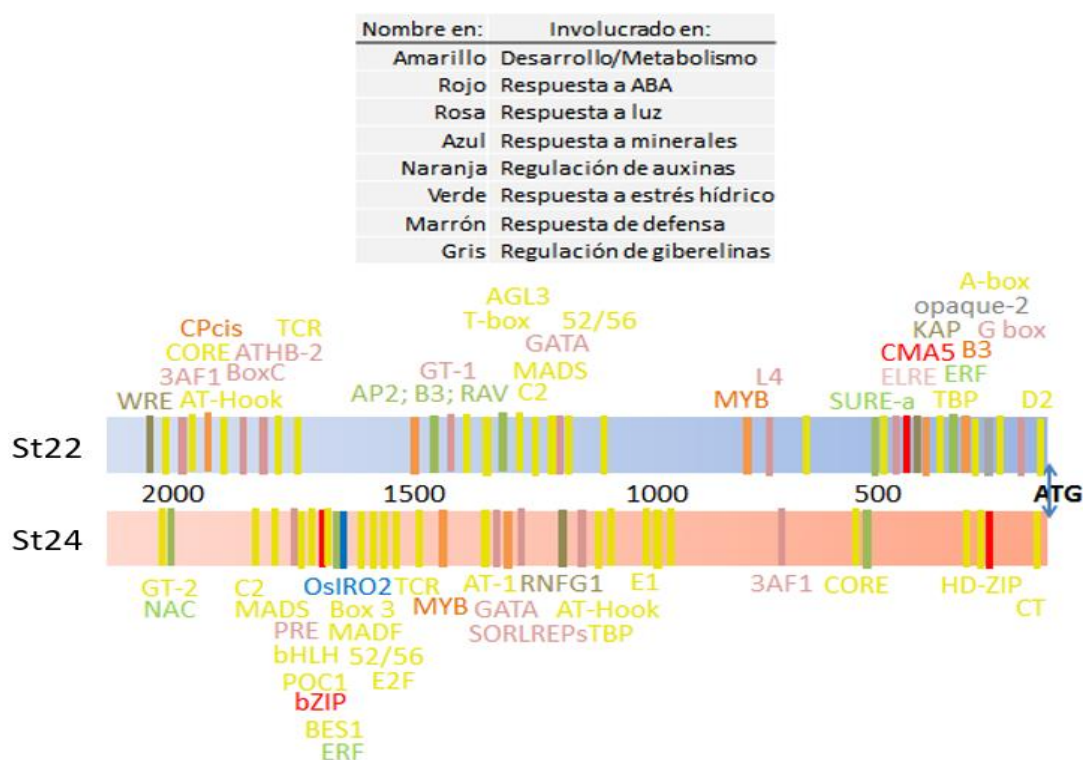
**Tabla C3.1 Elementos regulatorios en *cis* compartidos y exclusivos de las *StCDPK* del grupo III.**

Regiones promotoras	elementos compartidos	elementos regulatorios en <i>cis</i>
St20 St21 St22 St23 St24	2	Homeodomain/HD-ZIP, AP2/ERF
St20 St21 St22 St24	2	AT-Hook, MYB
St21 St22 St23 St24	2	TBP, Aux
St20 St21 St22	1	<b>Sugar and ABA responsiveness (CMA5)</b>
St20 St21 St23	1	GAGA
St20 St21 St24	1	MADS box/MIKC
St21 St22 St24	3	GT-2, bHLH, GATA
St21 St23 St24	2	E2F, bZIP
St22 St23 St24	1	3AF1
St20 St21	1	WRKY
St20 St22	1	Opaque 2
St20 St24	1	SORLEPs
St21 St22	3	MADS box, ELRE, B3
St21 St23	1	CE3
St22 St24	2	52/56 box, TCR
St23 St24	1	Element 1
Regiones promotoras	elementos exclusivos	elementos regulatorios en <i>cis</i>
St20	3	TCA-1, Glutelin common motif, CArG3
St21	9	WRC/GRF, C2H2, AGL, Dof, RSE, GARE, LIM, Box3, ABRE
St22	7	AP2/RAV, AGL3, GT-1, CORE, SURE, GT-element, WRE
St23	1	SEF1
St24	3	BES, NAC/NAM, MADF

Cabe señalar ciertas características particulares de las regiones promotoras de cada gen; *StCDPK20* presenta una caja CArG3 que une proteínas como APETALA que interviene en la diferenciación de pétalos y estambres (Tilly *et al.* 1998). En *StCDPK21*, el elemento de unión a AP2/ERF está definido por 33 matrices lo que le otorga confianza a la predicción. Además presenta tres sitios para proteínas MADS-box, un sitio de expresión en raíces (RSE (Liang *et al.* 2017)), y varios elementos que sugieren que podría participar en la señalización de ABA: un

sitio para FTs de tipo bZIP (Ambawat *et al.* 2013; Chinnusamy *et al.* 2004; Hoang *et al.* 2017; Kawamoto *et al.* 2015; Mehlmer *et al.* 2010; Muñiz García y Capiati, 2011; Muñiz García *et al.* 2012; Schwechheimer *et al.* 1998; Sheshadri *et al.* 2016; Shi *et al.* 2018; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Sibérial *et al.* 2001), dos sitios ABRE y elemento CE3 (Hobo *et al.* 1999) y un elemento de respuesta a azúcar y ABA. Por su parte *StCDPK23* contiene pocos elementos que se repiten muchas veces, entre ellos se destacan seis sitios de unión a E2F lo que sugeriría que es un gen regulado por el ciclo celular.

Respecto de las regiones promotoras de *StCDPK22/24* (Fig. C3.4) se observa que en *StCDPK22* la mayor densidad de elementos se encuentran en tres regiones: -2100 a -1750, -1500 a -1100 y -500 a -50. Para *StCDPK24* la mayor densidad está en la región -1800 a -900. Los promotores de ambos genes presentan elementos relacionados con procesos de desarrollo/metabolismo (C2 (TAIR), TBP (Iwataki *et al.* 1997), Box 3, bHLH (Abe *et al.* 2002), TCR (TAIR) y 52/56 (Eyal *et al.* 1995)), y luego de respuesta a luz (GT-2 (Eyal *et al.* 1995), GATA (Giuliano *et al.* 1988) y 3AF1 (Ouwerkerk *et al.* 1999)). En particular, *StCDPK22* contiene un elemento de unión a AGL3 vinculado al desarrollo floral (Huang *et al.* 1995) y un elemento de regulación de giberelinas (opaque-2) (Schwechheimer *et al.* 1998).



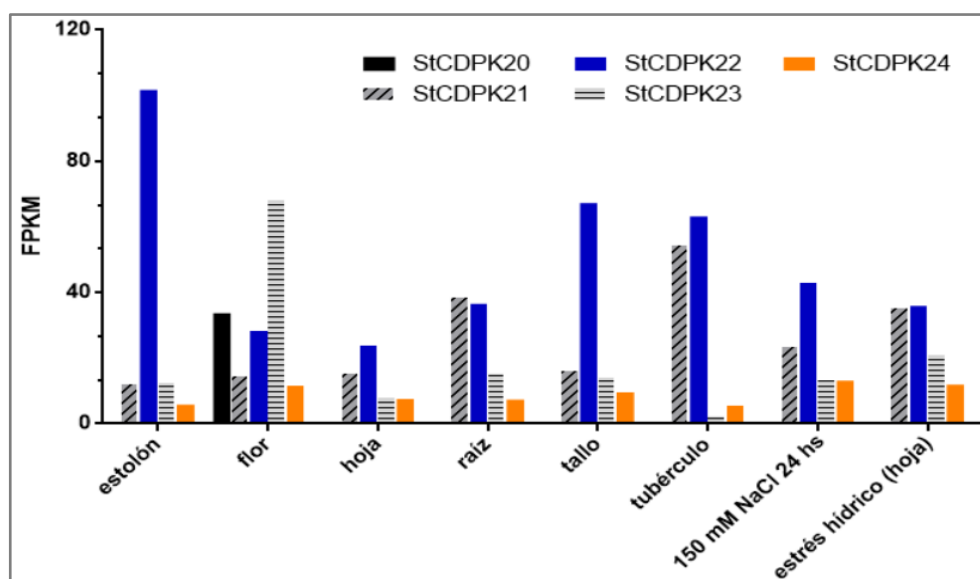
**Fig. C3.4** Mapa de las regiones promotoras de *StCDPK22* y *StCDPK24*. El color de los nombres de dichos elementos se corresponde con una función detallada en la tabla del centro arriba. Se abarcó una región de 2,1 kb río arriba del ATG de cada isoforma.

En cuanto a elementos relacionados a respuestas frente a estreses abióticos (y regulación de ABA) *StCDPK24* presenta dos sitios de unión a bZIP, un FT de tipo bHLH; 16 matrices identificaron al sitio que se encuentra entre -1702 y -1689 pb río arriba del ATG otorgando robustez a la predicción. Además, contienen un sitio de unión a FTs de tipo NAC/NAM involucrado en la respuesta al estrés hídrico (Hoang *et al.* 2017; Schwechheimer *et al.* 1998).

Por su parte *StCDPK22* contiene tres sitios de unión a FTs de tipo AP2/RAV/B3 que participan en la respuesta a etileno (Hoang *et al.* 2017; Sheshadri *et al.* 2016) y cuatro elementos de respuesta a azúcares, entre ellos SURE-a (Sun *et al.* 2003) y un elemento de unión a CMA5 que participa en la respuesta a ABA y azúcar (López-Ochoa *et al.* 2007). En ambas isoformas se encontraron elementos relacionados a respuestas de defensa (WRE (Asao *et al.* 2003), KAP (Lindsay *et al.* 2002) y RNFG1 (Yin y Beachy, 1995)).

### 3.3 - Expresión de *StCDPK22/24* por FPKM

Se analizaron los datos de *RNAseq* del PGSC para comparar los valores de FPKM de las isoformas *StCDPK20/21/22/23/24* (Fig. C3.5). Se observa que la expresión de *StCDPK22* es ubicua y mayor que la de los otros genes del grupo excepto en flor y raíz. Sus ortólogos en *Arabidopsis*, *AtCPK14* y *AtCPK32*, en cambio tienen una expresión más restringida: a estadios de flor y polen en el caso de *CPK14*, mientras que *AtCPK32* se expresa fuertemente en el primer internodo de la inflorescencia, pétalos, silicuas maduras y pecíolos de hojas senescentes y en menor grado en hojas (datos de *RNAseq* de TAIR, ver Anexo 3). *AtCPK32* participa en la respuesta a ABA (Choi *et al.* 2005; Kline *et al.* 2010) y activa un canal de calcio que regula el crecimiento del tubo polínico (Zhou *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2014).



**Fig. C3.5 Análisis de expresión de *StCDPKs*.** Valores FPKM para *StCDPK20-24* de acuerdo con los datos de *RNAseq* disponibles en PGSC (doble monoploide *S. tuberosum* Grupo Phureja clon DM1-3). Expresión en respuesta a estreses abióticos usando datos de *RNAseq*: planta entera tratada con 150 mM NaCl a las 24 h (clon DM1-3); estrés hídrico en hoja (clon RH).

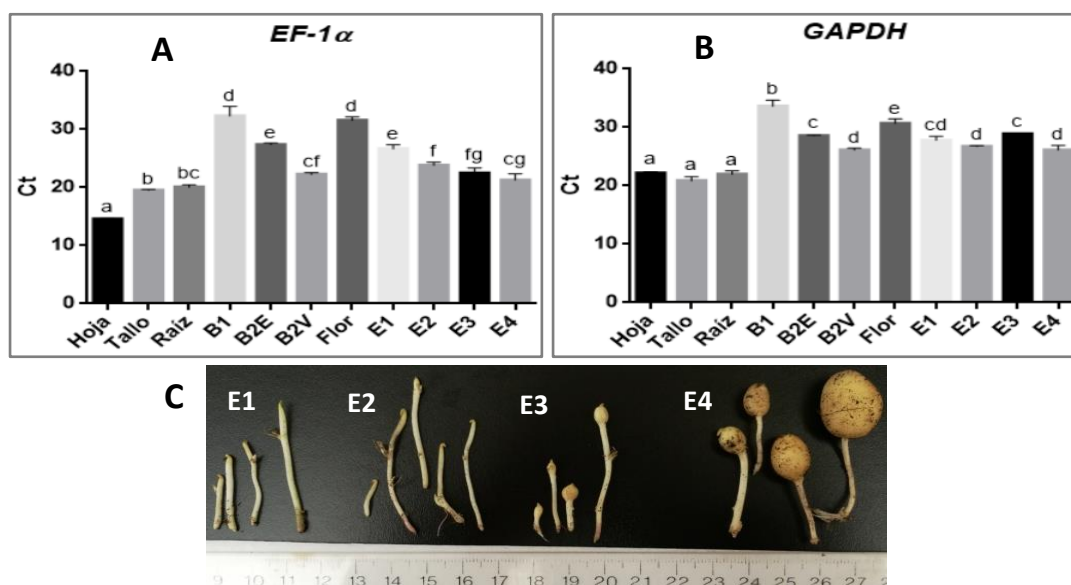
Por su parte, *StCDPK20* se expresa sólo en flor, lo que puede vincularse con la presencia de la caja CARG3 que se identificó en su promotor; su ortólogo en *Arabidopsis*, *AtCPK24* comparte con *AtCPK14* la expresión restringida a pétalos y polen maduro y germinado (Klepikova *et al.* 2016). *StCDPK21* se expresa principalmente en raíz, tubérculo y estrés hídrico consistente con los elementos encontrados en su región promotora. Su ortólogo *AtCPK10* también se induce en respuesta al estrés hídrico y participa en el cierre estomático (Zou *et al.*

2010). *StCDPK23* se expresa principalmente en flor, no se detecta en tubérculos y su expresión es baja en los demás tejidos/condiciones, mientras que la expresión de *StCDPK24* es ubicua y baja en todos los tejidos/condiciones considerados (Fig. C3.4). Los ortólogos de *StCDPK23/24* en *Arabidopsis*, *AtCPK7/8*, se expresan en forma ubicua en todos los tejidos de la planta (datos de RNAseq de TAIR, ver Anexo 3).

Por lo expuesto, en algunos casos se encontró una correlación entre patrón de expresión y similitud de secuencia entre los ortólogos de papa y *Arabidopsis*. Sin embargo, Valmonte *et al.* (2014) considera que no siempre es posible encontrar verdaderos ortólogos funcionales de CDPKs entre especies ni predecir la función de las secuencias de CDPKs recientemente identificadas dentro de un genoma.

### 3.4 - Expresión de *StCDPK22/24* en tejidos de plantas de papa

Se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre las regiones NTV de ambas isoformas (Tabla MyM1) para analizar por RT-qPCR su expresión en hojas, tallos, raíces, flor, brotes (B1, B2E y B2V) y estadios de tuberización (E1-4) de plantas var. Spunta crecidas en invernadero. Se analizó la expresión de *EF-1 $\alpha$*  y *GAPDH* en los tejidos y se realizó un análisis estadístico (ANOVA de un factor y *test* de comparaciones múltiples de Tukey) para determinar cuál gen constitutivo usar como gen de referencia. Se decidió usar *GAPDH* porque presenta menor dispersión en cuanto a su expresión entre los tejidos considerados (Fig. C3.6).



**Fig. C3.6 Comparación de genes constitutivos *EF-1 $\alpha$*  (A) y *GAPDH* (B).** Ct obtenidos para cada tejido. B1 brote hasta 1 cm; B2E brote etiolado entre 1 y 5 cm; B2V brote verde entre 1 y 5 cm. Letras distintas representan diferencias significativas. Se representa Media  $\pm$  SEM. ANOVA de un factor y *test* de Tukey. C Estadios de tuberización utilizados en este ensayo (E1 estolón, E2 estolón con gancho apical, E3 engrosamiento, E4 tubérculo inicial) se muestran en el panel inferior.

Se analizó la expresión de ambas CDPKs según la fórmula  $2^{-(\Delta Ct)}$ , de acuerdo al manual *Real-time PCR handbook*, Life technologies (2014). Como se observa en la Fig. C3.7, se detectó expresión de ambas isoformas en todos los tejidos analizados excepto en raíces. Sin embargo, no se ve el mismo patrón de expresión que en la Fig. C3.5. *StCDPK22* presenta una expresión

más restringida; se expresa en flor lo que puede relacionarse con el elemento de unión a AGL3 encontrado en su región promotora, y en estadios de tuberización E1/2. A diferencia de lo observado en la Fig. C3.5, en los ensayos de RT-qPCR *StCDPK24* se expresa más que *StCDPK22* en B1, hoja, tallo, flor y en los estadios E3/4; sin embargo, el análisis estadístico por ANOVA de dos factores y *test* de comparaciones múltiples de Tukey sólo reveló diferencias significativas entre las dos isoformas en el estadio B1 (Fig. C3.7). Evidencias fisiológicas sugieren que señales similares y proteínas homólogas participan en la inducción de los procesos de floración y tuberización de papa en variedades estrictamente fotoperiódicas (Abelenda *et al.* 2014); quizás *StCDPK22/24* podrían estar involucradas en ambos procesos.

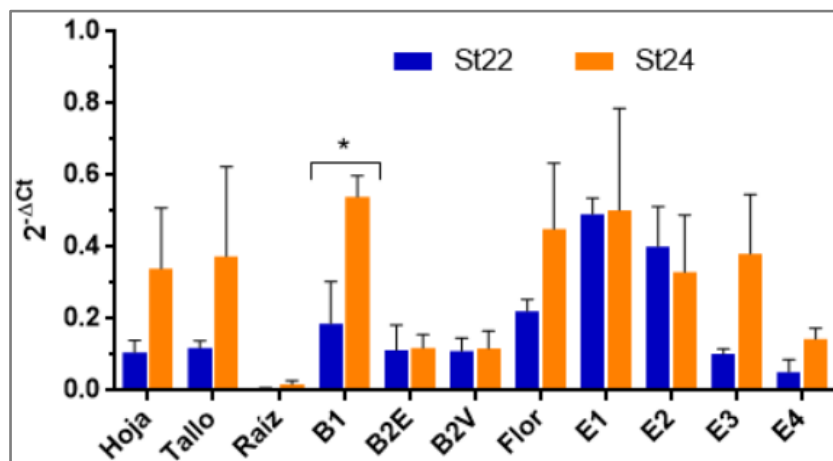


Fig. C3.7 Niveles de expresión de *StCDPK22/24*. *GAPDH* como referencia. Nivel relativo expresado como  $2^{-(\Delta Ct)}$ . Se representa Media  $\pm$  SEM. ANOVA de dos factores y *test* de Tukey. (\*) diferencia significativa.

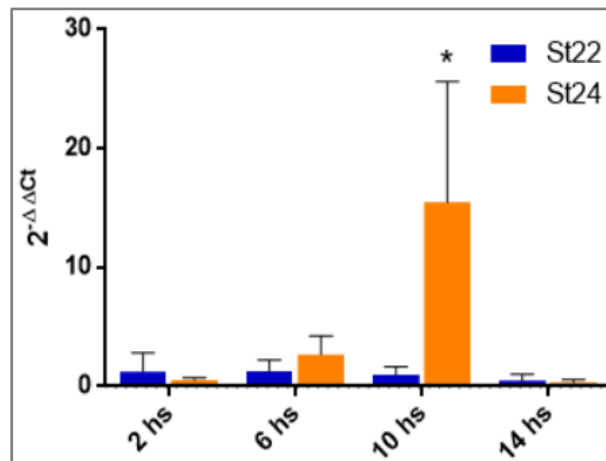
### 3.5 - Expresión de *StCDPK22/24* en tratamiento salino *in vitro*

Para evaluar si la expresión de *StCDPK22/24* varía en respuesta al estrés salino, se realizaron ensayos de RT-qPCR usando como templados ADNc var. Desiree de plantas *in vitro* expuestas a estrés salino durante tiempos cortos o prolongados. Las veces de cambio de expresión respecto del control sin sal se calcularon según la fórmula  $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$  que se detalla en MyM 7.4, de acuerdo al manual *Real-time PCR handbook*, Life technologies (2014).

#### 3.5.1 - Ensayo de salinidad en tiempo corto (TC)

Las plantas se crecieron en tubos individuales durante 3 semanas en medio MS sólido y se transfirieron a MS líquido durante 24 h. Pasado este tiempo se añadió 150 mM NaCl al medio (tratadas) o se mantuvieron en medio MS sin sal (control) durante 2, 6, 10 o 14 h. Como se observa en la Fig. C3.8, la expresión de *StCDPK22* se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo y decae a las 14 h por debajo de los valores de las plantas control ( $2^{-\Delta \Delta Ct} < 1$ ). Por su parte, se observa un leve aumento en la expresión de *StCDPK24* en las plantas tratadas respecto de las plantas control luego de 6 h, que llega a un máximo (aproximadamente 15 veces) a las 10 h para luego decaer ( $2^{-\Delta \Delta Ct} < 1$ ). Si bien hubo una importante dispersión entre los diferentes ensayos biológicos (la inducción respecto del control fue de 14,9; 5,7 o 25,9 veces) la diferencia observada a las 10 h es significativa.

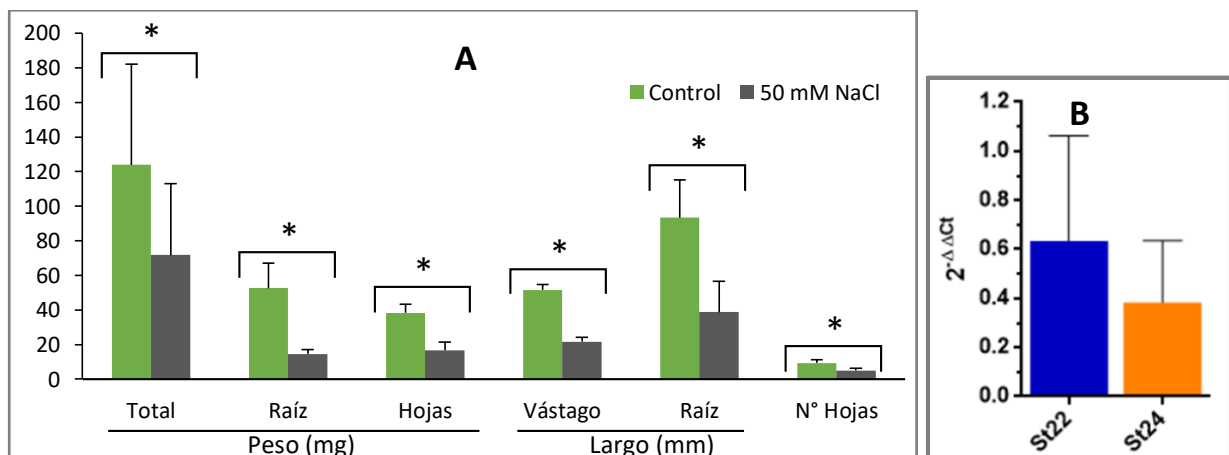




**Fig. C3.8 Niveles de expresión de *StCDPK22/24*.** Plantas con agregado de 150 mM NaCl en tiempo corto (2, 6, 10 y 14 h *in vitro*) respecto del control. Referencia gen constitutivo *EF-1α*. Nivel relativo expresado como  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Se representa Media  $\pm$  SEM. ANOVA de dos factores y *test* de Sidak arroja diferencia significativa en *StCDPK24* a las 10 hs (\*).

### 3.5.2 - Ensayo de salinidad en tiempo largo (TL)

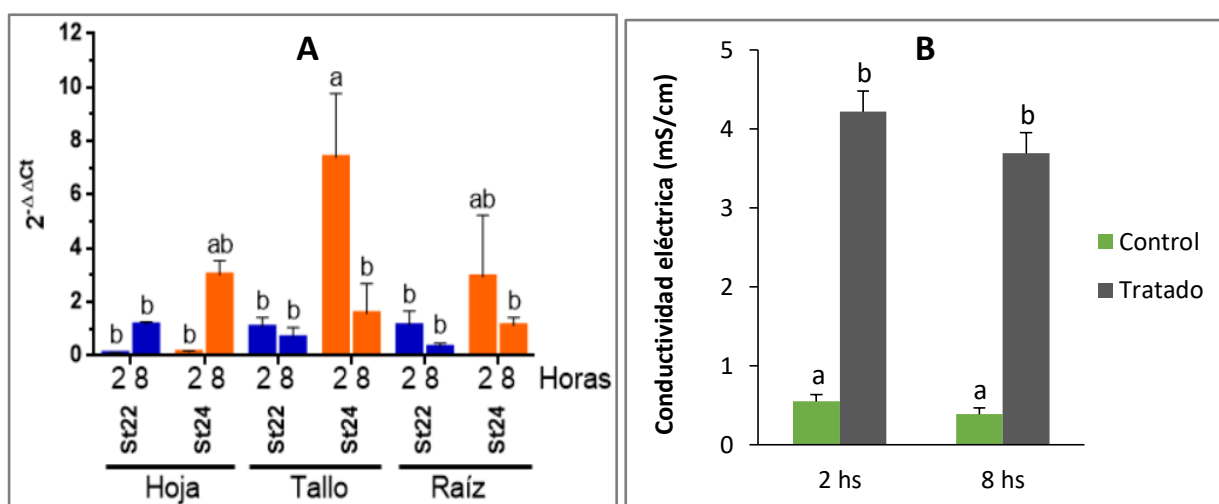
Las plantas se crecieron durante 3 semanas en medio de multiplicación con o sin (control) agregado de 50 mM NaCl. Los datos morfológicos recabados para todas las variables consideradas indican que las plantas tratadas tienen valores significativamente menores que el control, tanto en la biomasa de la parte aérea o subterránea (ya sea determinada como peso en mg o largo en mm) como en el número de hojas (Fig. C3.9 A), lo que confirma el efecto deletéreo de la salinidad. También se observa una reducción en la expresión de ambos genes en las plantas tratadas respecto del control: *StCDPK22* se expresa 1,5 veces menos y *StCDPK24* 2,6 veces menos (Fig. C3.9 B). No se observaron diferencias significativas entre ambos genes ( $p > 0.5$  para el *t test*).



**Fig. C3.9 Datos morfológicos (A) y expresión de *StCDPK22/24* (B).** Plantas cultivadas *in vitro* con y sin agregado de 50 mM NaCl durante 3 semanas. **A** Al momento de la cosecha se determinó el peso (expresado mg) y el largo (mm) de parte aérea y subterránea y el número de hojas. Se representa Media  $\pm$  SEM. (\*) indica diferencias significativas entre control y tratadas en cada variable analizada ( $p \leq 0,005$ , *test* de Student). **B** Se usó el gen constitutivo *EF-1α* como referencia. Nivel relativo expresado como  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Se representa Media  $\pm$  SEM.

### 3.6 - Expresión de *StCDPK22/24* en tratamiento salino en invernadero

Se realizaron ensayos de RT-qPCR usando como templados ADNc de hoja, tallo y raíz de plantas de papa var. Spunta que fueron regadas durante 4 semanas con 150 mM NaCl o sin sal (control) y cosechadas a las 2 y 8 h (Fig. C3.10 A). Como en la sección 3.5, las veces de cambio de expresión respecto del control sin sal se calcularon según la fórmula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . La conductividad del medio registrada al momento de la cosecha mostró una clara diferencia (Fig. C3.10 B). Los niveles de expresión de *StCDPK22* respecto del control sin sal no varían significativamente en ninguno de los tejidos en los dos tiempos de tratamiento ensayados, aunque se observa una reducción en la expresión respecto del control ( $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ ) luego de 2h de exposición a la sal en hojas y luego de 8 h en raíces. Sin embargo, hay cambios más evidentes en la expresión de *StCDPK24*: en tallo se observa una significativa ( $p < 0,05$ ) inducción luego de 2 h de exposición a la sal (aumenta 7 veces respecto del control) y a las 8 h retorna a niveles basales (valores cercanos a 1). Se observa una tendencia similar en raíz, aunque en este caso el cambio entre 2 y 8 h no fue significativo de acuerdo al análisis estadístico. Por otro lado, en hoja la expresión disminuye al inicio del estrés ( $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ ) y luego aumenta a las 8 h (3 veces respecto del control), aunque, al igual que en raíz, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.



**Fig. C3.10 Niveles de expresión de *StCDPK22/24* y conductividad del medio.** Hoja, tallo y raíz de plantas tratadas con 150 mM NaCl durante 2 y 8 h. **A** Referencia gen constitutivo *EF-1 $\alpha$* . Nivel relativo expresado como  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Se representa Media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de dos factores y *test* de Tukey. **B** Conductividad del medio en invernadero. Se determinó la conductividad (mS/cm) en el momento de cosechar las plantas. Se representa Media  $\pm$  SEM. Letras distintas indican diferencias significativas.

Los análisis realizados indican que la expresión de *StCDPK22* no varía en respuesta al estrés salino; sin embargo, los cambios en la expresión de *StCDPK24* tanto en plantas *in vitro* como en tierra sugieren que esta isoforma se induce tempranamente en respuesta a la sal. Además, se puede vislumbrar un cambio espacio-temporal en su expresión que podría correlacionarse con el tiempo en que los diferentes tejidos se exponen al estímulo (secuencia raíz-tallo-hoja). En este sentido, cabe aclarar que las raíces pueden parecer la parte más vulnerable de la planta, ya que están expuestas directamente a la sal o al suelo seco, pero son sorprendentemente robustas; su tasa de crecimiento no se ve tan afectada como la de los

brotos (Munns, 2002). Su estado iónico es relativamente bueno; sus concentraciones de iones no aumentan con el tiempo, como en las hojas, y a menudo tienen una concentración más baja de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que la solución externa, lo que rara vez ocurre en las hojas (Munns, 2002). Por ejemplo, en el trigo que crece en 150 mM NaCl, el  $\text{Na}^+$  en las raíces fue de solo 20-40 mM dependiendo del genotipo (Gorham *et al.* 1990). En el ajuste osmótico pueden estar involucrados solutos todavía no identificados.

Las primeras respuestas al estrés hídrico y salino son esencialmente idénticas, entre ellas las relacionadas al transporte de iones. Los efectos específicos de la sal ocurren principalmente en las hojas viejas donde la sal que entra con la corriente de transpiración se acumula a niveles altos con el tiempo (Munns, 2002). Las respuestas hormonales son similares; por ejemplo, los niveles de ABA aumentan dentro de 1 h de una imposición de estrés hídrico (Bensen *et al.* 1988) y estrés salino (He y Cramer, 1996). La fotosíntesis también disminuye tanto en estrés hídrico como salino, siendo las respuestas en días en lugar de minutos (Munns, 2002). Si ingresan cantidades excesivas de sal a la planta, eventualmente se elevarán a niveles tóxicos en las hojas transpirantes más viejas, causando senescencia prematura, lo cual reducirá la cantidad de asimilado que la planta puede producir, y una reducción en el asimilado transportado a los tejidos en crecimiento puede limitar aún más el crecimiento (Munns, 2002).

Como se mencionó previamente, no es posible inferir la función de un gen a partir de la de sus ortólogos; sin embargo, la inducción temprana de StCDPK24 en respuesta a la sal podría indicar que participa en esta vía al igual que AtCPK7/8 que pueden actuar como reguladores en respuesta al estrés abiótico y la señalización de ABA. Se reportó que AtCPK8 es un regulador positivo en respuesta al estrés por sequía; se induce frente a ROS, la proteína se asocia a membrana plasmática (Dammann *et al.* 2003) y participa en el movimiento estomático mediado por ABA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Zou *et al.* 2015). Por su parte, Li *et al.* (2015) mostraron que AtCPK7 funciona en el transporte de agua en la raíz. AtCPK7 comparte 90% de identidad de secuencia aminoacídica con AtCPK8 (Cheng *et al.* 2002); sin embargo, sus patrones de expresión son diferentes. La expresión impulsada por el promotor *AtCPK8* fue abundante en las células de la guarda del estoma, mientras que la actividad GUS impulsada por el promotor *AtCPK7* no fue evidente en esas células (Zou *et al.* 2015), revelando diferentes roles para ambas isoformas.

Por otro lado, la actividad de StCDPK22 es nula o muy baja en las condiciones ensayadas y no muestra una dependencia por el calcio (determinado en Capítulo 2). Además, los datos de RT-qPCR muestran que su expresión es acotada a flor o estadios tempranos de tuberización y no se observó un cambio de expresión en respuesta al estrés salino. A partir de los datos bioquímicos obtenidos *in vitro* es difícil asignarle una función a esta proteína; sin embargo, los datos de expresión sugieren que podría participar en algún proceso de desarrollo. Definir con mayor exactitud la expresión espacio-temporal de esta quinasa, a través de la actividad de su promotor podría darnos alguna pista sobre su función. Uno de sus ortólogos, AtCPK32, controla el crecimiento polar del tubo polínico, y su sobreexpresión provoca una acumulación excesiva de calcio en el *tip* que despolariza el crecimiento. Por doble híbrido se demostró que AtCPK32 interactúa con el canal de cationes regulado por nucleótidos cíclicos, CNGC18 y regula positivamente su actividad. Los autores sugieren que AtCPK32 promueve el ingreso de calcio generando un sistema de retroalimentación positiva de las CDPKs de polen (Zhou *et al.* 2014).

Queda claro que, más allá de compartir una alta identidad de secuencia, cada isoforma

tiene características propias. Resta dilucidar cuál sería el rol específico desempeñado por StCDPK24 en papa en respuesta al estrés abiótico y la cascada de señalización en la que participa, y qué función tendría StCDPK22. Esto abriría las puertas a futuras investigaciones, tanto básicas como aplicadas, que permitan el desarrollo de cultivos con mayores rendimientos.

## CONCLUSIONES

---

### Del Capítulo 1:

- ✓ Análisis *in silico* muestran que cuatro miembros del grupo III de CDPK de papa contienen sólo tres sitios *EF-hand* en el dominio *calmodulin like* (CLD). En StCDPK22/23/24, el primer sitio está degenerado, mientras que StCDPK27, un miembro del grupo que identificamos en este trabajo, carece del segundo sitio.
- ✓ StCDPK22/24 codifican proteínas ácidas (pI estimados: 5,9 y 6,1) de ~60 kDa (St22: 524 aa; St24: 532 aa). Ambas isoformas comparten 78,12% de identidad nucleotídica y 80,11% a nivel de aminoácidos. Programas de predicción indican que ambas isoformas se palmitoilan en C<sub>5</sub>, lo que podría determinar su asociación a membranas.
- ✓ StCDPK22/24 tienen una estructura de 8 exones/7 intrones. StCDPK24 tiene un intrón adicional (I<sub>0</sub>) en la región 5'UTR, cuyo efecto en la expresión del gen no se puede inferir dado el bajo *score* de la predicción.
- ✓ Evolutivamente, StCDPK22 se encuentra más cercana a SICDPK10 y AtCPK14/32; mientras que StCDPK24 lo está a StCDPK23, SICDPK1/11 y AtCPK7/8 (son todos genes parálogos).
- ✓ Se predijo que ambas isoformas están constituidas por 10 hojas plegadas  $\beta$  y 21 hélices  $\alpha$  en su estructura secundaria. El dominio AD, en ausencia de calcio, forma una larga hélice  $\alpha$  junto con la primera hélice  $\alpha$  del *EF-hand1* (no funcional) que se extiende desde la base del KD, y ocupa el sitio de unión del sustrato ocluyendo el bolsillo catalítico; en presencia del catión se desplaza permitiendo el acceso al sitio activo. Este modelo (concordante con el modelo de activación de las CDPKs) sugiere que la actividad de StCDPK24 depende del calcio.

### Del Capítulo 2:

- ✓ StCDPK24:6xHis es una quinasa de proteínas activa capaz de fosforilar H1 o Syntide-2, mientras que nuestros resultados indican que StCDPK22:6xHis presenta nula (con H1) o muy baja actividad (con Syntide-2).
- ✓ La mayor actividad para ambas isoformas se obtuvo con 25  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. Se observó un aumento significativo en la actividad de StCDPK24 en presencia del catión (2,7 a 4,4 veces) pero no es completamente dependiente de Ca<sup>2+</sup> ya que se detecta actividad en presencia de EGTA. No hubo cambios significativos en la actividad de StCDPK22 en presencia o ausencia de calcio.
- ✓ Ambas quinasas pueden utilizar Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como cofactores de ATP para catalizar la reacción de fosforilación. De hecho, ambas isoformas comparten el mismo sitio de unión a Mg<sup>2+</sup>. La actividad de StCDPK24:6xHis fue mucho mayor utilizando Mg<sup>2+</sup> (entre 0,25 y 2,5

mM) como cofactor en el complejo ATP-Me<sup>2+</sup>, mientras que la concentración óptima de Mn<sup>2+</sup> resultó ser 10-25 μM, pero a mayores concentraciones resultó inhibitorio. En el caso de StCDPK22:6xHis concentraciones superiores a 1 mM Mg<sup>2+</sup> inhibieron la actividad, mientras que 250 μM Mn<sup>2+</sup> no resultó inhibitoria.

- ✓ Para StCDPK22:6xHis el K<sub>M</sub> para el complejo ATP-Me<sup>2+</sup> es 0,7 μM o 7 μM dependiendo si se usó Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como cofactor, mientras que para StCDPK24:6xHis el K<sub>M</sub> fue de 23,4 o 8 μM. En el caso de Syntide-2, el K<sub>M</sub> fue 0,18 μM y 15,6 μM para StCDPK22 y StCDPK24 respectivamente. Las V<sub>máx</sub> obtenidas son 0,0032 para StCDPK22 y 0,038 μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> para StCDPK24.
- ✓ Ambas proteínas recombinantes se autofosforilan. Mediante técnicas de fosfoproteómica se identificaron dos residuos que son fosforilados en el AD de ambas isoformas (S<sup>321/323</sup> y T<sup>325/327</sup>) y una S<sup>521/523</sup> en el C-terminal que se corresponden con los residuos identificados en AtCPK8. La autofosforilación se detectó en ausencia de calcio sugiriendo que el estado habitual de la proteína es con estos residuos fosforilados. Se puede proponer que la autofosforilación de los residuos del AD contribuya a regular la actividad de este grupo. Además, StCDPK22 se autofosforiló en forma independiente de calcio en la Y<sup>39</sup> del NTV, por lo que podría tener actividad de quinasa de tirosina, y en dos residuos del KD. Por otro lado, en StCDPK24 detectamos dos residuos del dominio CLD cuya fosforilación depende de calcio y que podrían ser importantes para la activación de la proteína.

### Del Capítulo 3:

- ✓ Los cinco genes del grupo III comparten dos tipos de elementos en sus regiones promotoras: sitios de unión para FTs de la familia AP2/ERF que están involucrados en sequía, tolerancia a salinidad, cambios de temperatura, resistencia al ataque de patógenos, floración y germinación, y sitios de unión a FTs de la familia Homeodomain/HD-ZIP que están involucrados en procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas. En particular en el promotor de StCDPK24 se encontraron elementos de unión a FTs tipo bZIP, bHLH y NAC/NAM, entre otros; y en StCDPK22 un elemento de unión a AGL3 que podría determinar su expresión en flor.
- ✓ *StCDPK22* presenta una expresión restringida; se expresa en flor y en estadios de tuberización E1/2. *StCDPK24* se expresa más que *StCDPK22* en B1, hoja, tallo, flor y en los estadios E3/4.
- ✓ En los tratamientos de salinidad *in vitro* hubo disminución de las variables consideradas (peso, largo y número de hojas). La expresión de *StCDPK24* aumenta en plantas en medio salino a tiempos cortos (10 h), pero se reduce a tiempos más largos (tratamiento de 21 d). *StCDPK22* no varía de forma significativa en respuesta al estrés.
- ✓ En los tratamientos de salinidad en invernadero hubo aumento de la conductividad del medio. La expresión de *StCDPK22* no varía en respuesta al estrés, mientras que la expresión de *StCDPK24* se induce tempranamente a las 2 h en respuesta a la sal y luego decae a las 8

h, sugiriendo que participa en eventos tempranos de la cascada de señalización desencadenada en respuesta a la sal.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

---

Algunos de los interrogantes por responder son los siguientes:

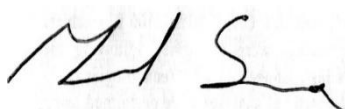
¿Qué ocurre con la localización subcelular de ambas isoformas? Analizar la localización de fusiones CDPK:GFP.

¿Qué factores influyen en la distinta actividad que presentan? ¿En qué medida la autofosforilación regula a la proteína *in vivo*? ¿Cuáles son sus sustratos fisiológicos?

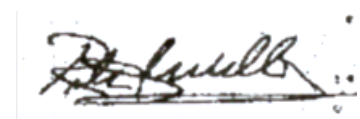
¿Cómo son sus expresiones espaciales y temporales? Analizar la actividad de los promotores fusionados a genes reporteros (promStCDPK22/24:GUS o GFP).

¿StCDPK22/24 podrían formar parte de una cascada de fosforilación en la que ella sea el blanco de otra CDPK? ¿En qué función estaría implicada?

Los resultados presentados en esta Tesis abren varias perspectivas sobre las posibles funciones asociadas a StCDPK24. La caracterización de las plantas sobreexpresantes y los ensayos de estrés hídrico permitirán determinar si la manipulación biotecnológica de esta PK puede conferir tolerancia a la falta de agua o el exceso de salinidad del suelo en los campos para aumentar el rendimiento de este importante cultivo.



Lic. Marcelo D. Sciorra



Dra. Rita M. Ulloa

# MATERIALES y MÉTODOS

---

## 1 - Cepas bacterianas de *Escherichia coli*

### 1.1 - Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa DH10B para los clonados y la cepa BL21 Rosetta 2 para la producción de proteínas recombinantes. Los cultivos líquidos se crecieron a 37°C en medio LB (peptona de triptona 10 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g.L<sup>-1</sup>, y NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>) (Bertani 1951) con agitación a 220 rpm durante 16 hs. Los cultivos sólidos se crecieron en placas de Petri a 37°C en medio LB adicionado con 1.5 % de agar. El medio se suplementa con antibiótico ampicilina 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 1.2 - Preparación de células electro-competentes de *E. coli*

Una colonia aislada de *E. coli* se sembró en 5 mL de medio LB con ampicilina y se cultivó durante 16 hs a 37°C a 300 rpm. Se utilizó como inóculo de un cultivo de 250 mL que se creció hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> = 0,5-0,7. El cultivo se centrifugó a 4000 x g durante 15 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió suavemente a 4°C en 250 mL de glicerol 10%, repitiéndose este paso con 125, 10 y 1 mL de glicerol. Se generaron alícuotas de 50 µL y se congelaron en nitrógeno líquido. Las alícuotas de bacterias competentes fueron almacenadas a -70°C.

### 1.3 - Transformación de células competentes de *E. coli* por electroporación

Se descongeló una alícuota conteniendo 50 µL de la preparación de células de *E. coli* competentes y se mantuvo en hielo. Se agregó 50-100 ng de ADN plasmídico y se mezcló suavemente. Las células se transfirieron a una cubeta de electroporación (tamaños de vidrio 1-2mm). Se ajustó el *Gene Pulser* a 2.5 KV y el CAP a 25 µFD. La resistencia fue de 400 Ohm en el *Pulse Controller Unit*. Se introdujo la cuba en el equipo y se realizó un pulso hasta escuchar el tono que indica que se logró el pulso deseado. Se agregó 1 mL de medio LB inmediatamente en la cubeta de electroporación y se colocó en hielo. Se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo falcon de 15 mL y se incubó en agitación constante a 37°C durante 1 h. Se sembró en medio selectivo (conteniendo ampicilina) y se incubó a 37°C durante 24 h.

## 2 - Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa *S. tuberosum* L var. Spunta (tubérculos libres de virus; Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata) y *S. tuberosum* L var. Desiree (ensayos *in vitro*).

### 2.1 - Cultivo *in vitro*

Las plantas fueron micropropagadas *in vitro* en medio de multiplicación MS utilizando porciones del tallo que contengan yemas meristemáticas. Las plantas se colocaron en tubos de



vidrio con tapones de gasa y algodón autoclavados y se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de días largos (DL) 16 h luz - 8 h oscuridad.

*Medio de multiplicación:* sales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 2% p/v, pH 5,7 (7 g.L<sup>-1</sup> agar).

## 2.2 - Cultivo en invernadero

Se sembraron tubérculos de papa var. Spunta en maceta (mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita) en el invernadero en condiciones de fotoperiodo DL y temperatura entre 20-25°C con riegos semanales. Las plantas propagadas en invernadero se procesaron cuando tenían entre 3 y 4 semanas de edad. Se recolectaron brotes, hojas, tallos, raíces, estolones, flores y minitubérculos.

## 2.3 - Ensayos de salinidad *in vitro*

Se utilizaron plantas var. Desiree. Para tiempos largos (TL), se utilizaron 5 segmentos nodales por frasco y 5 frascos por tratamiento. Las plantas se crecieron durante 3 semanas en medio de multiplicación con y sin agregado de 50 mM NaCl. Se registraron los siguientes parámetros morfológicos: peso total, peso raíz, peso hojas, largo aéreo, largo raíz y número de hojas, siendo peso en mg y largo en mm.

Para tiempos cortos (TC), se utilizaron 9 plantas por tratamiento. Las plantas se crecieron durante 3 semanas en medio de multiplicación. Luego se transfirieron a medio líquido durante 1 día para aclimatación, y finalmente a medio líquido con y sin agregado de 150 mM NaCl durante 2, 6, 10 y 14 h.

## 2.4 - Ensayos de salinidad en invernadero

Se utilizaron 3 plantas de papa var. Spunta por tratamiento, crecidas durante 4 semanas en macetas con riegos semanales de 200 mL. Luego de cada riego se mide la conductividad en cada una. Transcurrido este tiempo, se riegan con y sin agregado de 150 mM NaCl a las 2 y 8 h, y se extrae ARN de hoja, tallo y raíz.

## 3 - Extracción de ADN genómico de plantas

El tejido foliar (3g) proveniente de plantas *in vitro* se trituró en mortero con nitrógeno líquido, se adiciona *buffer* de extracción (15 mL) y 30 µL de β-mercaptoetanol y se incubó 30 min a 1 h a 65°C. Se agrega mismo volumen de cloroformo, se mezcla por inversión 10 min y se coloca a 4°C. Se centrifugó durante 10 min a 8000 rpm a temperatura ambiente (TA) y el sobrenadante se trasvasa a un nuevo tubo. Se agregó 2/3 volumen de isopropanol, se centrifugó durante 10 min a 8000 rpm a TA. Se agregó 500 µL de etanol 70% y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. El *pellet* fue resuspendido en 1 mL de agua con ARNs. Se cuantificó por *nanodrop* y se utilizaron 100 ng como molde de reacción de PCR.

Buffer de extracción: 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH8, 0,02 M EDTA, 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol (al momento de usarlo)

## 4 - Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Tabla MyM1 Oligonucleótidos utilizados para las PCR y RT-qPCR.

Gen/secuencia	Nombre	Tm (°C)	Primers	Amplicón pb
<i>Elongation factor</i>	EF-1 $\alpha$ Fw	54,2	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	100
	EF-1 $\alpha$ Rv	58,1	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	
<i>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>	GAPDH Fw	55,8	GAAGGACTGGAGAGGTGGA	151
	GAPDH Rv	53,3	GACAACAGAAACATCAGCAGT	
<i>StCDPK22</i> (semicuantitativa)	St22 Fw1 5' UTR	58,6	TCTTGAGACCCCTTTTAGCTG	225
	St22 Rv1	58,8	CCTAACTCATACGTTGCCTC	
	St22 Rv2 3' UTR	57,8	GGTGAACAGGAAAGAAGGGACG	
<i>StCDPK24</i> (semicuantitativa)	St24 Fw1 5' UTR	58,9	ATTGTTATGGGAAATTGCTG	199
	St24 Rv1	58,7	CTCCTCTTCCTAGCTCACAA	
	St24 Rv2 3' UTR	55,7	GCATTTGATCATCTACCTTCCTCC	
<i>StCDPK22</i> (cuantitativa)	St22 Fw RT	53,9	TGGGTAATTGTTGTGCAGTACCAA	169
	St22 Rv RT	56,3	GGCAACGTATGAGTTAGGGCG	
<i>StCDPK24</i> (cuantitativa)	St24 Fw RT	51,8	TGGGAAATTGCTGTGGGAC	103
	St24 Rv RT	54,3	TGCAACTCAAGCATCTGGAGG	

Nota: pb pares de bases; Fw forward; Rv reverse; RT real time.

## 5 - Metodología del ADN recombinante

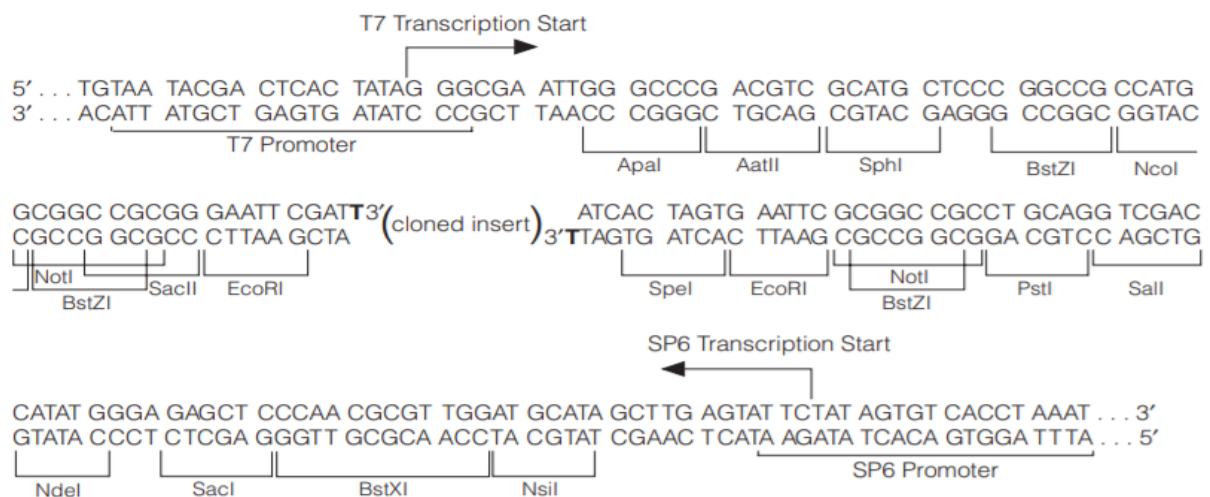
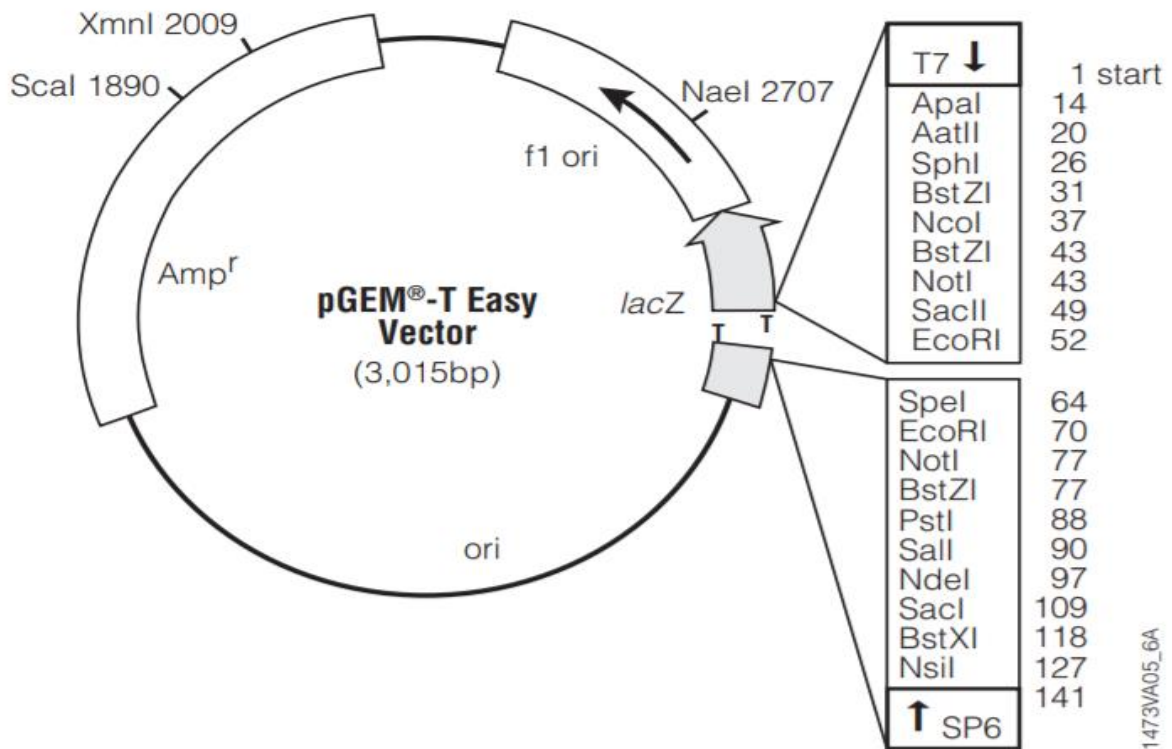
### 5.1 - Clonados realizados en esta tesis

Secuencias codificantes de *StCDPK22* y *StCDPK24* en el plásmido de clonado pGEM-T Easy

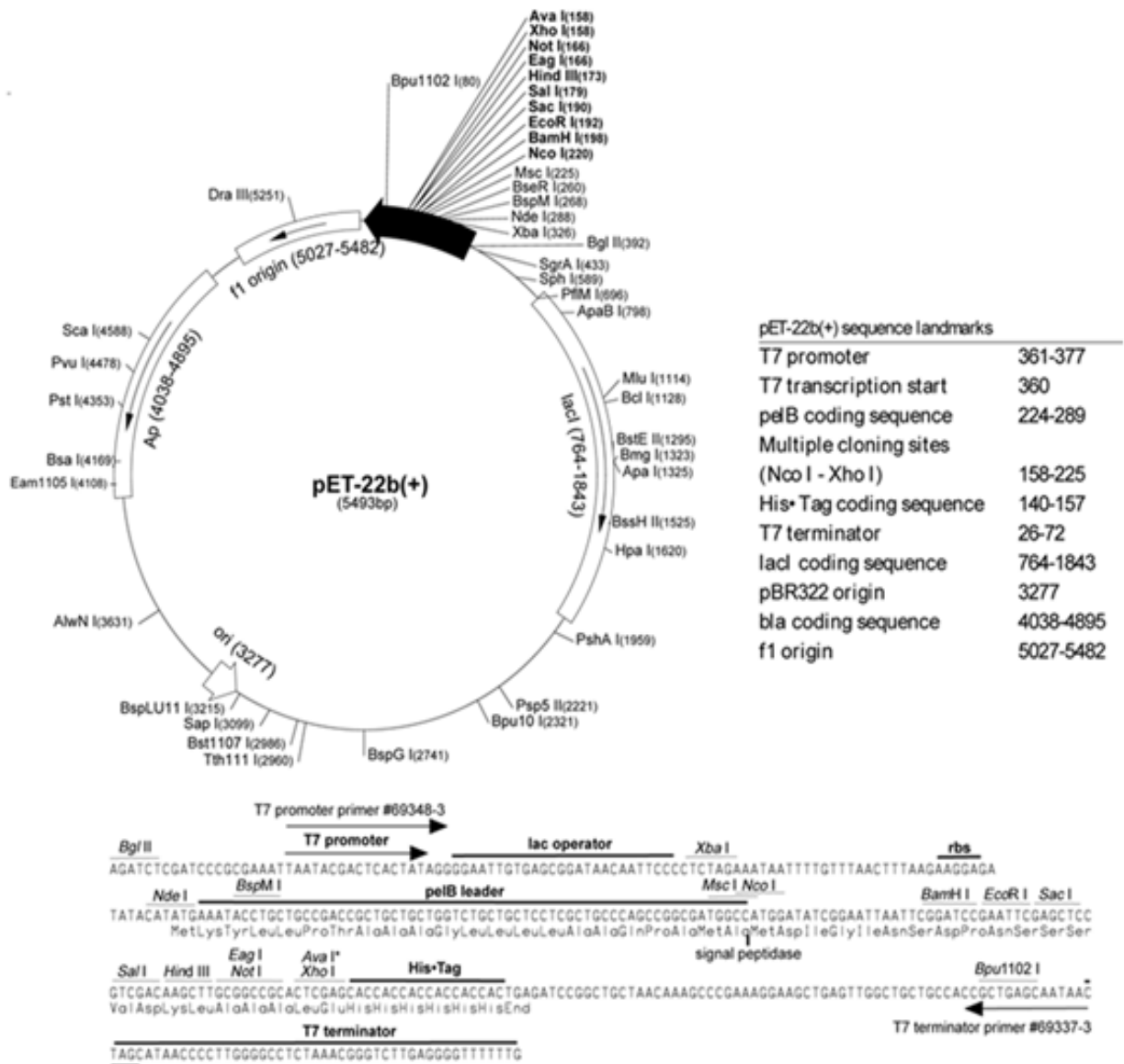
Secuencias codificantes de *StCDPK22* y *StCDPK24* en el plásmido de expresión pET-22b(+)

#### 5.1.1 - Plásmidos

**pGEM-T Easy** (Promega): Vector de alto número de copias que contiene promotores de ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean una región de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La inactivación por inserción del péptido  $\alpha$  permite la identificación de recombinantes mediante detección azul/blanca en placas indicadoras. Resistencia a ampicilina.



**pET-22b(+)** (Novagen): Vector de expresión en *E. coli*. Permite clonar la secuencia de interés bajo el promotor T7 quedando la secuencia codificante en fusión con 6xHis, en el C-terminal. Resistencia a ampicilina. Se utilizaron las enzimas de restricción *Nde I* y *Xho I* para *StCDPK22* y *Ase I* y *Xho I* para *StCDPK24*.



## 6 - Mini preparación de ADN plasmídico (miniprep)

Se inocularon 5 mL de LB líquido, con el antibiótico requerido, con colonias aisladas conteniendo el plásmido de interés. Los cultivos fueron crecidos durante 16 h con agitación a 37°C. Se centrifugaron 4 mL del cultivo y el precipitado se resuspendió en 200 µL de solución 1 (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregaron 300 µL de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó a 4° durante 5 min. Se agregaron 300 µL de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Transcurrida la incubación se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 min a TA. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 400 µl de cloroformo, se mezcló por inversión enérgicamente 10 veces y se centrifugó 1 min a TA. Se agregó un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 20 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada conteniendo ARNsA A para eliminar restos de ARN presentes en la extracción. El ADN fue cuantificado por Nanodrop.

## 6.1 - Purificación de ADN plasmídico utilizando kits comerciales

Se utilizaron los sistemas de purificación *Wizard plus SV minipreps ADN Purification System* (Promega), siguiendo los protocolos del fabricante. El ADN fue cuantificado por Nanodrop.

### 6.1.1 - Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de Agarosa

Se utilizó el *kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System* de Promega. La purificación se realizó acorde a las instrucciones del fabricante.

## 6.2 - Amplificación de insertos por PCR semicuantitativa

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se hizo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) utilizando las enzimas *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs - NEB) o *Phusion* ADN polimerasa (NEB) en los clonados donde fue necesaria una alta fidelidad. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizaron como molde 10 ng de una biblioteca de expresión de hojas de *S. tuberosum* Desirée cedida por la Dra. Salomé Prat (CSIC, Madrid), ADNc obtenido a partir de hojas y tallos de plantas de papa cultivadas en invernadero o 100-300 ng de ADN genómico. Las condiciones de reacción, número de ciclos y temperatura variaron de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados, longitud del amplicón y polimerasa utilizada en cada caso.

## 6.3 - Clonado de secuencias codificantes

### 6.3.1 - Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión de plásmidos o ADN genómico se realizaron utilizando enzimas de restricción de Promega, Fermentas o NEB. Se utilizaron los buffers proporcionados y BSA. Los tiempos de digestión variaron de 1 a 3 hs a 37°C. El resultado de estas reacciones fue visualizado en electroforesis en geles de agarosa (1%) conteniendo 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Se utilizó un transiluminador marca *Syngene* para la captura de imágenes.

### 6.3.2 - Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando ADN ligasa del fago T4 (Promega, catálogo M1801). Se usaron 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido:inserto (1:3). En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado por Promega 10X o 2X al utilizar el sistema de clonado pGEM-T Easy. El volumen final de reacción varió entre 10-20  $\mu\text{L}$ . Se utilizaron 3 U de la enzima ligasa en todos los casos y el tiempo de incubación varió de 1 h a 25°C o 16 h a 4°C.

### 6.3.3 - Cuantificación del ADN y ARN

Se obtuvieron las concentraciones utilizando el equipo Nanodrop. Se corroboraron las relaciones de Absorbancia 260/280 y 260/230. La primera (1,8-2) permite evaluar la

contaminación por proteínas. La segunda (1,8-2,2), la contaminación con compuestos fenólicos.

## 7 - Análisis de expresión por RT-qPCR en tiempo real

### 7.1 - Extracción de ARN

Plantas de *S. tuberosum* L var. Desiree, fueron propagadas en macetas o *in vitro*. Se cosecharon muestras de hojas, tallos, raíces, estolones, flores y minitubérculos o planta entera, de 4 y 3 semanas de edad. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Se extrajo el ARN utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen) agregando 1 mL cada 50 mg de tejido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por Nanodrop.

#### 7.1.1 - Determinación de la calidad del ARN

Se resolvieron alícuotas de 200 ng del ARN adicionado con 3 µl de buffer de siembra en geles de agarosa 1,5%, buffer TAE 1X adicionados con 10 µl de formamida. La presencia de bandas ribosomales definidas indicaron la integridad del ARN.

### 7.2 - Tratamiento con DNAsa

Se partió de 1 µg de ARN purificado y se agregó 1 µL de *buffer Dnasa* (Promega), 1 µL de la enzima *Dnasa RQ1 ARNse free* (Promega), y se llevó a volumen final 10 µL. Se incubó la reacción a 37°C durante 30 min. Se adicionó 1 µL de la solución *Stop Dnase* (Promega), y se incubó nuevamente a 65°C durante 10 min.

### 7.3 - Síntesis de ADNc

Al tratamiento con *DNAsa* (10 µL de reacción) se agregó una mezcla de deoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 500 µM de cada uno) y 0,5 µg de oligodT. Se incubó la reacción a 65°C durante 5 min, luego se enfrió en hielo por 1 min. Se agregó *First Strand Buffer* 1X (Promega), 0,1M DTT, 40 unidades de *RNAsin* y 200 U de la enzima M-MLV-Transcriptasa Reversa (Promega). El volumen final de reacción fue de 20 µL. Se incubó la reacción a 42°C durante 60 min, seguido de 15 min a 70°C para inactivar la transcriptasa reversa. Todas las incubaciones se realizaron en un ciclador MiniCycler™ MJ Research. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 7.4 - PCRs cuantitativas (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, utilizando la mix *FastStart Universal SYBR Green Master Rox* (Roche). Se utilizó como gen de referencia *GAPDH* o *EF-1α* (Nicot *et al.* 2005). Las reacciones se realizaron a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg, 51°C por 15 seg y 60°C por 1 min, usando los oligonucleótidos RT de la Tabla MyM1. A los genes *StCDPK22/24* se les realizaron las curvas estándares para evaluar las eficiencias y optimizar las condiciones de reacción. La

especificidad de las reacciones de PCR se verificó a través del análisis de las curvas de *melting*. Los datos se analizaron con la fórmula  $2^{-(\Delta Ct)}$  para los ensayos de expresión en tejido, mientras que los datos de los ensayos de salinidad se analizaron utilizando  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM, posterior análisis de ANOVA de un factor o de dos factores y se aplicó el test de Tukey o el de Sidak.

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta Ct)} = 2^{-(Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo})}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} = 2^{-((Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo}) \text{ tratado} - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen constitutivo}) \text{ control})}$$

## 8 - Metodología de Proteínas

### 8.1 - Extracción de proteínas para ensayos de actividad o *western blot*

Las muestras de tejido vegetal se homogeneizaron en mortero con N<sub>2</sub> líquido. Se adicionó 1 volumen de buffer de extracción (50 mM TrisHCl pH 6.8, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,2% polivinilpirrolidona, PVP) suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail* P9599 – para extractos de tejidos vegetales, en DMSO). Se centrifugó a 4°C durante 30 min a 10000 x g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo a 4°C hasta la electroforesis.

#### 8.1.1 - Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Bradford (1976). En una placa de ELISA se adicionaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford comercial de Bio Rad (dilución 1:5) y se agregaron 10  $\mu$ L de muestra. Se registró el valor de absorbancia a 580 nm. Se estimó la concentración mediante una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de 0,05-0,5 g.L<sup>-1</sup>.

### 8.2 - Expresión y purificación de proteínas recombinantes

#### 8.2.1 - Purificación de proteínas recombinantes de fusión a His

Se inocularon 1000 mL de LB-ampicilina con 5 mL de un cultivo bacteriano *starter* de *E. coli* Rossetta transformadas con los plásmidos pET22-b(+):StCDPK22/24. Se incubaron a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.5. Se reservó una alícuota de 1 ml (cultivo no Inducido, NI) y el resto del cultivo se indujo con 1mM de IPTG y se incubó 4 h a 26°C. Se realizó el protocolo de purificación en condiciones nativas. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000 x g. El *pellet* se resuspendió en 4 mL de buffer de lisis. Se agregó 1 mg.mL<sup>-1</sup> de lisozima y se incubó 30 min a 4°C. Se sonicó 6 veces durante 10 seg cada vez. Se centrifugó el sobrenadante durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. Se puso en contacto el sobrenadante obtenido con 1 mL de resina de níquel-agarosa (*His-Select Nickel Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) en agitación durante 1 h a 4°C. Luego de recoger el percolado (P) se realizaron 3 lavados de 2 mL (L1-3) cada uno utilizando *buffer* de lavado. Posteriormente se eluyó 3 veces con 500  $\mu$ L cada vez (E1-3). Los eluidos que contenían la proteína recombinante fueron dializados por 4 h contra buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5, y posteriormente con el *Buffer* de enzimas durante 4 h más (Ed). Los eluidos fueron cuantificados

mediante el método de Bradford utilizando una curva patrón de BSA, y visualizados a través de SDS-PAGE y tinción de Coomassie Brilliant Blue. Las fracciones obtenidas (P, L1-3, E 1-3, Ed) se almacenaron a -20°C.

*Buffer de lisis:* 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.

*Buffer de lavado:* 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.

*Buffer de elución:* 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8, inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*-Sigma CNP9599) 10 µL.mL<sup>-1</sup> de *buffer* de elución, 5% glicerol.

### 8.3 - Ensayo de *western blot*

Extractos proteicos (0,3-100 µg) fueron resueltos en geles SDS-PAGE 10-12%. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Amersham-C) utilizando el sistema de transferencia semiseca Fastblot (Biometra) y el buffer de transferencia Tris-glicina 1X, 10% metanol durante 1 h a 4 mA/cm<sup>2</sup>. Las membranas se bloquearon con caseína (leche en polvo) 0.5 % PBS-Tween. Se incubó con el anticuerpo correspondiente por 1 h a TA, seguido de 3 lavados con PBS-Tween de 10 min cada uno. Para el revelado se utilizó ECL (Bio-lumina, Productos Biológicos-UNQ) y fue expuesto en el equipo GeneGnome-XRQ-NM (Syngene).

#### 8.3.1 - Anticuerpos utilizados:

-Anti-His- anticuerpo monoclonal comercial (QIAGEN) 0.5% BSA (1:7000) o

-Anti-His- anticuerpo monoclonal comercial (Santa Cruz) 0.5% BSA (1:500)

*PBS 10X:* 115 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 29.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 58,4 g NaCl, en H<sub>2</sub>O destilada hasta 1 L

*PBS-tween:* PBS 1x, 0,1% Tween-20

*Solución 40% acrilamida: bisacrilamida (19:1):* 38 g de acrilamida, 2 gr de bisacrilamida, llevar a 100 mL con agua destilada.

### 8.4 - Ensayos de actividad CDPK

Se realizaron ensayos de actividad quinasa de proteínas utilizando ATP( $\gamma^{32}\text{P}$ ) para evaluar la actividad de las proteínas recombinantes StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis, la concentración óptima de Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, la fosforilación de diferentes sustratos, efecto de inhibidores y autofosforilación.

Las determinaciones se realizaron de acuerdo a [MacIntosh et al. \(1996\)](#) utilizando 15 µM Syntide-2 o el sustrato indicado y 200 ng del eluido dializado (Ed) como fuente de enzima. El volumen final de reacción fue de 60 µL. La mezcla de reacción se compuso de 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol (BME), 50 µM ATP frío y ATP( $\gamma^{32}\text{P}$ ) (2x10<sup>6</sup> cpm/ensayo; 3000 Ci/mmol, NEB). Los ensayos se realizaron en presencia de CaCl<sub>2</sub> (25 o 100 µM final) o EGTA (1 o 5mM). Se hicieron curvas de Ca<sup>2+</sup> (1 a 100 µM), EGTA (0,1 a 10 mM), Mn<sup>2+</sup> (10 a 250 µM) y Mg<sup>2+</sup> (0,05 a 5 mM) y se evaluó la capacidad de clorpromazina, trifluoperazina y flufenazina (0,1 y 1 mM), de EGTA (5mM), de 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine o KN-62 (0,5 y 10 µM), derivados del ácido naftaleno - sulfónico W7 (50 y 100 µM), cloruro de calmidazolio (0,5 y 10 µM) y de estaurosporina (1 y 10 µM) de inhibir



la actividad de StCDPK24:6xHis. Asimismo se determinó la capacidad de fosforilar distintos péptidos (15  $\mu\text{M}$ ) y proteínas (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ): Syntide-2 (Syn); péptido 3 derivado de PP2A (Pep3); péptido derivado de glucógeno sintasa (GS); kemptido (Kempt); sustrato de la casein kinasa II (CKIIS); proteína básica de mielina (MBP), H1, histona 2a (HIIa) e histona 3 (H3). Las reacciones se incubaron 15 min a 30°C (se corroboró que esta condición corresponde a velocidad inicial,  $V_0$ ). Se detuvo el ensayo colocando 40  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción de cada tubo sobre cuadraditos (4  $\text{cm}^2$ ) de papel de fosfo celulosa Whatman P81 cargado positivamente, lo cual favorece el pegado de péptidos con grupos fosfatos. Los papeles fueron inmersos en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  75 mM y fueron lavados (x3) durante 10 min. El último lavado se realiza con acetona durante 1 min. Los papeles se secaron y se colocaron en un tubo polistor conteniendo 2 mL de líquido centelleante de 30% (v/v) etanol en tolueno con 0,4% (p/v) Omnifluor (DuPont). La lectura del fósforo radiactivo incorporado se realizó en un contador de centelleo líquido LKB Wallac 1214 Rack Beta. Se realizaron tres blancos con  $\text{Ca}^{2+}$  y con EGTA, sin fuente enzimática. Se graficaron las Medias  $\pm$  SEM de tres ensayos con tres réplicas técnicas cada uno.

## 8.5 - Ensayos de Autofosforilación y de Fosforilación de sustratos en geles

Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de enzima (Ed) de StCDPK22:6xHis o StCDPK24:6xHis en ensayos de fosforilación de sustratos (histona H1, 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y 2,5 y 5  $\mu\text{g}$  en ensayos de autofosforilación según se indica en las figuras. El volumen final de reacción fue 40  $\mu\text{L}$  y la mezcla se compuso de 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  o 1 mM EGTA, 0,1% Tritón X-100, 10 mM BME, y 5  $\mu\text{M}$  ATP suplementado con  $\text{ATP}(\gamma^{32}\text{P})$  (5000 Ci/mmol, 10 a 20 Ci por reacción). Se incubó a 30°C durante 5 min. Luego los tubos se colocaron en hielo y se agregó buffer de siembra 5X, se incubó a 100°C durante 5 min y se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, gel 10-12%). Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se expusieron en placas autorradiográficas (*Amersham Hyperfilm, GE Healthcare*) durante una noche a TA, o una semana y luego escaneada en equipo *STORM 820 Phosphorimager (GE Healthcare; programa Storm Scanner Control v5.20)*.

### 8.5.1 - Ensayos de autofosforilación usando ATP frío

StCDPK22:6xHis y StCDPK24:6xHis (50  $\mu\text{g}$ ) se incubaron 1 h a 30°C con una mezcla de reacción conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  o 5 mM EGTA, 10 mM ATP, 10 mM BME. El volumen final de reacción fue de 100  $\mu\text{L}$ .

## 8.6 - Electroforesis 2D

### 8.6.1 – Electroforesis en geles bidimensionales

Una vez concluido el tiempo de reacción se realizó una precipitación con 3 volúmenes de TCA10% y 0,07% BME en acetona. Luego de 12 h se centrifugó durante 30 min a 10000 x g. El *pellet* fue lavado dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de 0,07% BME en acetona, y luego se centrifugó 5 min a 10000 x g. Se secó brevemente el *pellet* en estufa a 37°C y se resuspendió en 106,8  $\mu\text{L}$  de *buffer* IEF (*Buffer* de isoelectroenfoque). Se adicionaron 0,66  $\mu\text{L}$  IPG *Buffer* pH 4-7 (GE Healthcare), 10

$\mu\text{L}$  BpB (Azul de bromofenol saturado), 0,06 M DTT. Se resuspendió la muestra con la ayuda de un vortex y se incubó 30 min a 37°C. Luego se centrifugó 15 min a 10000 x g y se procedió a la hidratación pasiva del *strip* (*reswelling*). Para esto se adicionaron los 125  $\mu\text{L}$  de la muestra en la placa de *reswelling* y se colocó el *strip* en contacto con la muestra, de modo tal que el gel deshidratado quede boca abajo. La placa se cubrió con *PlusOne Dry Strip Cover Fluid* (GE Healthcare). Se incubó durante 16-20 h a 30°C. Se realizó el isoelectroenfoque utilizando el equipo *Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing* (GE). El programa utilizado para el isoelectroenfoque consistió en 3 ciclos: 500 V x 30 min, 1000 V x 30 min, 5000 V x 1 h 40 min. Una vez concluido el programa se realizó un cuarto ciclo a 5000 V hasta completar un total de 8700 V. Luego, los *strips* se incubaron en buffer de equilibrio suplementado con 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de DTT durante 15 min, en agitación, seguido de otra incubación en buffer de equilibrio suplementado con 45  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de iodoacetamida durante 15 min en agitación. Se lavaron los *strips* brevemente con buffer de corrida y se resolvieron en geles de acrilamida 12% desnaturalizantes. El *strip* fue inmovilizado sobre el gel de poliacrilamida por el agregado de una solución previamente calentada conteniendo: 0,6% de agarosa, 40  $\mu\text{L}$  de BpB, 0,5% SDS. Las condiciones de la corrida fueron: 15 mA por gel durante 15 min, luego se aumentó a 30 mA por gel. Finalmente se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se reveló con anti-His.

*Buffer de isoelectroenfoque (IEF)*: 0,84 g urea, 0,3 g tiourea, CHAPS 2%, Tritón 2%, vol. final 2 mL

*Buffer de equilibrio*: 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 30% glicerol, 2% SDS, 4-8  $\mu\text{L}$  BpB

*Buffer de corrida*: 0,025 M Tris, 0,19 glicina, pH 8,3 SDS 0,10%

### **8.6.2 - Determinación de sitios de fosforilación**

Las mismas reacciones de autofosforilación con ATP frío se llevaron a cabo con 50  $\mu\text{g}$  de cada proteína para la determinación de los sitios de fosforilación, pero usándose 25  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  o 10 mM EGTA. Se precipitaron y lavaron como en el ensayo de geles bidimensionales. Luego se resuspendieron en 80  $\mu\text{L}$  de buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,4 y se agregó 20  $\mu\text{L}$  de buffer de siembra 5x para la corrida electroforética. Se tiñeron los geles con Coomassie Brilliant Blue y se cortaron las bandas correspondientes a las CDPKs recombinantes, las cuales se almacenaron en *ependorf* con agua miliQ. Se enviaron a la Plate-forme proteomique del Centre de recherche du CHU de Québec – Canadá para que, utilizando técnicas de fosfoproteómica, se identifiquen los aminoácidos fosforilados en ambas condiciones. Para esto se realiza la digestión trípica de las proteínas y luego la cromatografía líquida de los péptidos obtenidos seguida de la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis de los resultados se realizó con el programa *Scaffold 4.9* (Proteome Software, Inc. 2019).

## **9 - Bioinformática**

Se utilizaron diferentes *softwares* disponibles online para análisis de datos o imágenes. Las bases de datos del *Spud DB* del *Potato Genomics Resource* de la *Michigan State University* (<http://potato.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) permitieron identificar los genes

correspondientes a la familia CDPK, brindando el número de acceso del gen, transcripto o proteína (DMG, DMT o DMP, respectivamente) con su correspondiente localización cromosómica y datos de *RNAseq* (valores FPKM) obtenidos de diferentes tejidos o de plantas cultivadas en diferentes condiciones/tratamientos. La misma fue consultada para las isoformas de tomate, además de la base de datos *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>). En el caso de *Arabidopsis* se consultó la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org/>).

- *Análisis de secuencias y Predicción de estructura de las proteínas*: PROSITE (Sigrist *et al.* 2013), SMART - *Simple Modular Architecture Research*, Pfam (pfam.xfam.org), PredictProtein (<https://www.predictprotein.org>), InterProScan (Zdobnov y Apweiler, 2001) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)
- *Análisis proteómico*: Scaffold 4.9
- *Análisis filogenético*: MEGA X, *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (Kumar *et al.* 2018) (<http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html>)
- *Búsqueda de elementos reguladores en promotores*: PlantPAN 3.0 (Chow *et al.* 2019)
- *Cálculo de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI)*: Expasy SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/>): Translate tools, Compute MW/pI tool (Gasteiger *et al.* 2005)
- *Comparación de secuencias*: TargetAlign (<http://www.leonxie.com/targetAlign>) (Xie y Zhang, 2010), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) *Basic Local Alignment Search Tool*, Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Madeira *et al.* 2019)
- *Diseño de oligonucleótidos*: Oligocalc *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northWestern.edu/biotools/oligocalc.html>)
- *Gráficos y análisis estadístico*: Excel (Microsoft Office) y PRISMA GraphPad v6.01
- *Modelado por homología*: Phyre2 *web portal for protein modeling, prediction and analysis* (Kelley *et al.* 2015), EzMol 2.1 - *Molecular display wizard* (Reynolds *et al.* 2018), Swiss-Model (Waterhouse *et al.* 2018), UniProt (*The UniProt Consortium*)
- *Predicción de IME (intron-mediated enhancement)*: IMEter v.2.1 (Parra *et al.* 2011) ([http://korflab.ucdavis.edu/cgi-bin/IMEter\\_2014/web-imeter2.1.pl](http://korflab.ucdavis.edu/cgi-bin/IMEter_2014/web-imeter2.1.pl))
- *Predicción de Miristoilación*: NMT - The MYR Predictor (Podell y Gribskov, 2004), (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>), Myristoylator (Bologna *et al.* 2004)
- *Predicción de palmitoilación*: CSS-Palm - *Palmitoylation Site Prediction* (Ren *et al.* 2008)
- *Predicciones de péptido señal*: TargetP 1.1 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)), ChloroP 1.1 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/)), Wolf P Sort ([psort.hgc.jp/](http://psort.hgc.jp/))
- *Predicción de sitios de fosforilación*: NetPhos 2.0 (Blom *et al.* 1999)

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abe, H. et al., 2002.** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(1), pp.63–78.
- Abelenda, J. et al., 2014.** Flowering and tuberization: a tale of two nightshades. *Trends in Plant Science*, 19(2), pp.115–122.
- Allen, G.J., Muir, S.R. y Sanders, D., 1995.** Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both InsP<sub>3</sub> and cyclic ADP-ribose. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), pp.735–737.
- Ambawat, S. et al., 2013.** MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants*, 19(3), pp.307–321.
- Asai, S. et al., 2013.** The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp.14332–14340.
- Asano, T. et al., 2005.** Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: Comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), pp.356–366.
- Asao, H. et al., 2003.** Wound-responsive cis-Element in the 5'-Upstream Region of Cucumber Ascorbate Oxidase Gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2), pp.271–277.
- Aversano, R. et al., 2015.** The *Solanum commersonii* Genome Sequence Provides Insights into Adaptation to Stress Conditions and Genome Evolution of Wild Potato Relatives. *The Plant cell*, 27(4), pp.954–68.
- Batistič, O. et al., 2010.** CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(2), pp.211–222.
- Batistič, O. y Kudla, J., 2012.** Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(8), pp.1283–1293.
- Benetka, W. et al., 2008.** Experimental testing of predicted myristoylation targets involved in asymmetric cell division and calcium-dependent signalling. *Cell Cycle*, 7(23), pp.3709–3719.
- Bensen, R. et al., 1988.** Water deficit induced changes in abscisic acid, growth, polysomes, and translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiol*, 88, pp.289–294.
- Berendzen, K.W. et al., 2012.** Screening for in planta protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry. *Plant methods*, 8(1), p.25.
- Bertani, G., 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, pp.293–300.
- Blanco, F.A., Zanetti, M.E. y Daleo, G.R., 2008.** Calcium-dependent protein kinases are involved in potato signal transduction in response to elicitors from the oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal of Phytopathology*, 156(1), pp.53–61.
- Blatt, M.R., 1987.** Electrical characteristics of stomatal guard cells: The contribution of ATP-dependent, “Electrogenic” transport revealed by current-voltage and difference-current-

- voltage analysis. *The Journal of Membrane Biology*, 98(3), pp.257–274.
- Blatt, M.R., Thiel, G. y Trentham, D.R., 1990.** Reversible inactivation of K<sup>+</sup> channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 346(6286), pp.766–769.
- Blom, N. et al., 1999.** Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294(5), pp.1351–1362.
- Bologna, G. et al., 2004.** N-terminal Myristoylation Predictions by Ensembles of Neural Networks. *Proteomics*, 4(6):1626-32.
- Boudsocq, M. et al., 2012.** Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? *The Biochemical journal*, 447(2), pp.291–299.
- Boudsocq, M. y Sheen, J., 2010.** Differential innate immune signalling via Ca<sup>(2+)</sup> sensor protein kinases. *Nature*, 464(7287), pp.418–422.
- Boudsocq, M. y Sheen, J., 2013.** CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science*, 18(1), pp.30–40.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brandt, B. et al., 2012.** Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), pp.10593–10598.
- Braunewell, K. y Klein-Szanto, A., 2009.** Visinin-like proteins (VSNLs): interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins. *Cell Tissue Res.*; 335(2), pp.301–316.
- Cai, H. et al., 2015.** Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase genes in *Capsicum annuum*. *Frontiers in plant science*, 6(September), p.737.
- Callis, J. et al., 1987.** Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes & Development*, 1(10), pp.1183–1200.
- Camoni, L., Harper, J.F. y Palmgren, M.G., 1998.** 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS letters*, 430(3), pp.381–384.
- Campo, S. et al., 2014.** Overexpression of a Calcium-Dependent Protein Kinase Confers Salt and Drought Tolerance in Rice by Preventing Membrane Lipid Peroxidation. *Plant Physiol.* 165(2), pp.688–704.
- Cantos de Ruiz, S. et al., 1989.** Rendimiento potencial del cultivo de papa en Balcarce, causas que limitan la productividad real. *Rev. Latinoam. la Papa*, v. 2.
- Cavalier-Smith, T. 1991.** Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends in Genetics*, 7(5), pp.145–148.
- Champion, A. et al., 2004.** AtSGP1, AtSGP2 and MAP4K $\alpha$  are nucleolar plant proteins that can complement fission yeast mutants lacking a functional SIN pathway. *Journal of cell science*, 117(Pt 18), pp.4265–4275.
- Chandran, V. et al., 2006.** Structure of the Regulatory Apparatus of a Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK): A Novel Mode of Calmodulin-target Recognition. *Journal of Molecular Biology*, 357(2), pp.400–410.

- Chaudhuri, S. et al., 1999.** Autophosphorylation-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase from Groundnut. *Plant Physiology*, 120(3), pp.859–866.
- Chehab, E.W. et al., 2004.** Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant physiology*, 135(3), pp.1430–1446.
- Chen, S. et al., 2011.** Cloning of a Calcium-Dependent Protein Kinase Gene NtCDPK12, and Its Induced Expression by High-Salt and Drought in *Nicotiana tabacum*. *Agricultural Sciences in China*, 10(12), pp.1851–1860.
- Cheng, S. et al., 2002.** Update on Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family 1. *Plant Physiology*, 129(June), pp.469–485.
- Chinnusamy, V. et al., 2004.** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 395, pp. 225–236.
- Choi, H. et al., 2005.** Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* 139, pp.1750–1761.
- Chow, C. et al., 2019.** PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, pp.D1155–D1163.
- Christodoulou, J. et al. 2004.** Evidence for Differing Roles for Each Lobe of the Calmodulin-like Domain in a Calcium-dependent Protein Kinase. *The journal of biological chemistry*. Vol. 279, No. 28, pp. 29092–29100.
- Chung, H.J. et al., 2016.** EF-Hand Mimicking Calcium Binding Polymer. *Biomacromolecules*, 17(3), pp.1075–1082.
- CIP.** International Potato Center. <http://cipotato.org/>
- Coca, M. y San Segundo, B., 2010.** AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, pp.526–540.
- Dammann, C. et al., 2003.** Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 132(4), pp.1840–1848.
- DeFalco, T.A., Bender, K.W. y Snedden, W.A., 2010.** Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling. *The Biochemical journal*, 425(1), pp.27–40.
- de la Casa, A. et al., 2014.** Estimación del rendimiento potencial de papa en Córdoba, Argentina, a partir de la eficiencia en el uso de la radiación y de la productividad del agua. *AGRISCIENTIA*, VOL. 31 (2): pp.75–91
- Delormel, T. y Boudsocq, M., 2019.** Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in Arabidopsis *thaliana*. *New Phytologist*, 224, pp.585–604.
- Downie, J., 2014.** Legume nodulation. *Current Biology*, 24(5), pp.R184–R190.
- Drøbak, B.K. y Ferguson, I.B., 1985.** Release of Ca<sup>2+</sup> from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochemical and biophysical research communications*, 130(3), pp.1241–1246.
- Duan, J., Li, J., Guo, S. y Kang, Y., 2008.** Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in

- salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Plant Physiol.* 165, pp.1620–1635.
- Dudev, M. y Lim, C., 2007.** Discovering structural motifs using a structural alphabet: Application to magnesium-binding sites. *BMC Bioinformatics*, 8:106.
- Edel, K. y Kudla, J., 2016.** Integration of calcium and ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, pp.83–91
- Edel, K. et al., 2017.** The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology*, 27, R667–R679.
- Elhiti, M. y Stasolla, C., 2009.** Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 4:2, pp.86–88.
- Eyal, Y. et al., 1995.** Pollen Specificity Elements Reside in 30 bp of the Proximal Promoters of Two Pollen-Expressed Genes. *The Plant Cell*, 7(3), 373.
- Fantino, E. et al. 2017.** Analysis of the potato calcium-dependent protein kinase family and characterization of StCDPK7, a member induced upon infection with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Rep*, 36:1137–1157.
- FAOSTAT.** *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* Rome.
- Faried, H.N. et al., 2016.** Salinity impairs ionic, physiological and biochemical attributes in potato. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 53(1), pp.17–25.
- Felcher, K.J. et al., 2012.** Integration of two diploid potato linkage maps with the potato genome sequence. *PloS one*, 7(4), p.e36347.
- Flores-Vieyra, R. et al. 2005.** Proteínas cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>: características y activación. *REB* 24(3,4), pp.74–80.
- Friedberg, F., 1988.** Calcium Binding Protein Families: The 'EF-Hand' Family. *BIOCHEMICAL EDUCATION*, 16(1), pp.35–36.
- Gallegos, J.E. y Rose, A.B., 2015.** The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci.* 237, 8–15.
- Gargantini, P.R. et al., 2009.** Genomic and functional characterization of StCDPK1. *Plant Molecular Biology*, 70(1–2), pp.153–172.
- Gasteiger, E. et al., 2005.** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, pp.571–607.
- Geiger, D. et al., 2011.** Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Science Signaling*, 4(173), pp.ra32–ra32.
- Giammaria, V. et al., 2011.** StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. *Planta*, 233(3), pp.593–609.
- Gilbert, W. 1978.** Why genes in pieces? *Nature*, 271(5645), pp.501–501.
- Gilroy, S., Read, N.D. y Trewavas, A.J., 1990.** Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346(6286), pp.769–771.
- Giuliano, G. et al., 1988.** An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), pp.7089–7093.
- Gorham, J. et al., 1990.** Partial characterization of the trait for enhanced K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> discrimination in the D genome of wheat. *Planta*, 180, pp.590–597.

- Grandellis, C. et al., 2012.** The novel *Solanum tuberosum* calcium dependent protein kinase, StCDPK3, is expressed in actively growing organs. *Planta*, 236(6), pp.1831–1848.
- Grandellis, C. et al., 2016.** StCDPK3 Phosphorylates *In Vitro* Two Transcription Factors Involved in GA and ABA Signaling in Potato: StRSG1 and StABF1. *Plos One*, 11(12), p.e0167389.
- Grossi, C. et al., 2020.** Methylobacterium sp. 2A Is a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Has the Potential to Improve Potato Crop Yield Under Adverse Conditions. *Front. Plant Sci.* 11:71.
- Gutermuth, T. et al., 2013.** Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20. *The Plant cell*, 25(11), pp.4525–4543.
- Hamel, L.P., Sheen, J. y Séguin, A., 2014.** Ancient signals: Comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in Plant Science*, 19(2).
- Hamilton, J.P. et al., 2011.** Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm. *BMC genomics*, 12, p.302.
- Han, H. et al., 2013.** Molecular characterization and analysis of a novel calcium-dependent protein kinase from *Eimeria tenella*. *Parasitology*, 140(6), pp.746–755.
- Harmon, A.C., Yoo, B. y Mccaffery, C., 1994.** Pseudosubstrate Inhibition of CDPK, a Protein Kinase with a Calmodulin-Like Domain. *Biochemistry*, 33, pp.7278–7287.
- Harmon, A.C., et al., 2000.** CDPKs - A kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? *Trends in Plant Science*, 5, pp.154–159.
- Harmon, A.C. et al., 2001.** The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, 151(1), pp.175–183.
- Harmon, A.C., 2003.** Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravitational and space biology bulletin: publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 16(2), pp.83–90.
- Harper, J.F., Binder, B.M. y Sussman, M.R., 1993.** Calcium and lipid regulation of an Arabidopsis protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 32(13), pp.3282–3290.
- Harper, J.F., Huang, J.F. y Lloyd, S.J., 1994.** Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, 33(23), pp.7267–77.
- Harper, J.F., Breton, G. y Harmon, A., 2004.** Decoding Ca<sup>(2+)</sup> signals through plant protein kinases. *Annual review of plant biology*, 55, pp.263–288.
- Harper, J.F. y Harmon, A., 2005.** Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(7), pp.555–566.
- He, T., y Cramer, G., 1996.** Abscisic acid concentrations are correlated with leaf area reductions in two salt-stressed rapid-cycling Brassica species. *Plant and Soil*, 179(1), pp.25–33.
- Hegeman, A. et al., 2006.** A phyloproteomic characterization of *in vitro* autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *PROTEOMICS*, 6(12), pp.3649–3664.
- Hernández, J., 2019.** Salinity Tolerance in Plants: Trends and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 2408.
- Hmida-Sayari, A. et al., 2005.** Identification of Salt Stress-Induced Transcripts in Potato Leaves by cDNA-AFLP. *Molecular Biotechnology*, 30(1), pp.031–040.
- Hoang, X. et al., 2017.** Transcription Factors and Their Roles in Signal Transduction in Plants



- under Abiotic Stresses. *Current Genomics*, 18, pp.483–497.
- Hobo, T. et al., 1999.** ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), pp.679–689.
- Hrabak, E. M., 2000.** Calcium-dependent protein kinases and their relatives. *En M Kreis, JC Walker, eds, Advances in Botanical Sciences, Plant Protein Kinases, Vol 32. Academic Press, New York*, pp.185–223.
- Hrabak, E. M., et al., 2003.** The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132(2), pp.666–680.
- Hu, Z. et al., 2016.** Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Calcium-dependent Protein Kinase in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), pp.1–11.
- Huang, H. et al., 1995.** The Arabidopsis MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Molecular Biology*, 28(3), pp.549–567.
- Huarte, M., e Inchausti, M., 1994.** La producción de papa en la República Argentina y su relación con el MERCOSUR. *III Simposio de Integración Frutihortícola del Cono Sur*. Montevideo, Uruguay.
- Huarte M., y Capezio S., 2013.** Cultivo de papa. En: *Agricultura y ganadería pampeanas. 1a edn.* EUDEM, Mar del Plata, pp.172–202.
- Ingram, J. et al., 2015.** Allosteric activation of apicomplexan calcium-dependent protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), pp.E4975–E4984.
- Ito, T. et al., 2010.** Alteration of Substrate Specificity: The Variable N-Terminal Domain of Tobacco Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase Is Important for Substrate Recognition. *the Plant Cell Online*, 22(5), pp.1592–1604.
- Ito, T. et al., 2017.** Autophosphorylation Affects Substrate-Binding Affinity of Tobacco Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase1. *Plant Physiology*, 174(4), pp.2457–2468.
- Itoh, T. et al., 2011.** The mechanism of substrate recognition of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases. *Plant Signaling & Behavior*, 6:7, pp.924-926.
- Iwataki, N. et al.,1997.** Restoration of TATA-dependent transcription in a heat-inactivated extract of tobacco nuclei by recombinant TATA-binding protein (TBP) from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 34, pp.69–79.
- Jauregui, E. et al., 2017.** Autophosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK) at S343 or S344 generates an intramolecular interaction blocking the CaM-binding. *Plant Signaling & Behavior*, 12(7), e1343779.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. y Thornton, J.M., 1992.** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8, pp.275–282.
- Kanchiswamy, C. et al., 2010.** Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling. *BMC plant biology*, 10, p.97.
- Kanchiswamy, C. et al., 2014.** Calcium Imaging Perspectives in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, pp.3842–3859.
- Kang, L. et al., 2013.** Cloning and Expression of Calcium-dependent Protein Kinase 15 (NtCDPK15) in *Nicotiana tabacum*. *Chinese Tobacco Science*, 34, pp.48–54
- Kaouther, Z. et al., 2012.** Impact of salt stress (NaCl) on growth, chlorophyll content and fluorescence of Tunisian cultivars of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Stress Physiol.*

- Biochem.* 8, pp.236–252.
- Kawamoto, N. et al., 2015.** Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific reports*, 5, p.8341.
- Kawasaki, H. y Kretsinger, R., 2017.** Structural and functional diversity of EFhand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Science*, Vol 26, pp.1898–1920.
- Kelley, L. et al., 2015.** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), pp.845–858.
- Khrustalev, V. et al., 2016.** Magnesium and manganese binding sites on proteins have the same predominant motif of secondary structure. *Journal of Theoretical Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.02.006i>.
- Klepikova, A. et al., 2016.** A high resolution map of the Arabidopsis *thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88, pp.1058–1070.
- Klimecka, M. y Muszyńska, G., 2007.** Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica Polonica*, 54(2), pp.219–233.
- Kline, K. et al., 2010.** In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *PNAS*, vol. 107, no. 36, pp.15986–15991.
- Knape, M. et al., 2015.** Divalent Metal Ions Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Have Distinct Effects on Protein Kinase A Activity and Regulation. *ACS Chem Biol.*; 10(10): pp.2303–2315.
- Knight, H. y Knight, M.R., 2000.** Imaging spatial and cellular characteristics of low temperature calcium signature after cold acclimation in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 51(351), pp.1679–1686.
- Knighton, D. et al., 1991.** Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science*, Vol. 253, pp.407–414.
- Kobayashi, M. et al., 2007.** Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant cell*, 19(3), pp.1065–1080.
- Kong, X. et al., 2013.** Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize. *BMC genomics*, 14, p.433.
- Kretsinger, R., 2013.** Magnesium in Biological Systems. *Encyclopedia of Metalloproteins*. pp.1250–1255.
- Kudla, J., Batistic, O. y Hashimoto, K., 2010.** Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant Cell*, 22(3), pp.541–563.
- Kumar, S., et al., 2018.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, pp.1547–1549.
- Lakatos, L., Hutvágner, G. y Bánfalvi, Z., 1998.** Potato protein kinase StCPK1: A putative evolutionary link between CDPKs and CRKs. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1442(2–3), pp.101–108.
- Lavado, E. et al., 2007.** La salinización de suelos en la Argentina. *Editorial EDUCC, Córdoba*, pp.1–136.
- Laxa, M., 2017.** Intron-Mediated Enhancement: A Tool for Heterologous Gene Expression in Plants? *Front. Plant Sci.*, 7:1977.
- Lemtiri-Chlieh, F. et al., 2003.** Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 100(17), pp.10091–10095.
- Leonhardt, N. et al., 2004.** Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant cell*, 16(3), pp.596–615.
- Lévy, J. et al., 2004.** A Putative Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science*, 303(5662), pp.1361–1364.
- Li, G. et al., 2015.** The calcium-dependent protein kinase CPK7 acts on root hydraulic conductivity. *Plant, Cell & Environment*, 38(7), pp.1312–1320.
- Li, X. et al., 2014.** Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 82, pp.34–43.
- Liang, C. et al., 2017.** Melatonin Regulates Root Architecture by Modulating Auxin Response in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Lin, X., Ayrapetov, M. y Sun, G., 2005.** Characterization of the interactions between the active site of a protein tyrosine kinase and a divalent metal activator. *BMC Biochem.* 6: 25.
- Lindsay, W. et al., 2002.** KAP-2, a protein that binds to the H-box in a bean chalcone synthase promoter, is a novel plant transcription factor with sequence identity to the large subunit of human Ku autoantigen. *Plant Molecular Biology*, 49(5), pp.503–514.
- Liu, W. et al., 2014.** Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in *Gossypium raimondii*. *PLoS ONE*, 9(6).
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–408.
- Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E. y Vendrell, M., 2002.** Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. *Journal of experimental botany*, 53(378), pp.2283–2285.
- Long, M., de Souza, S.J. y Gilbert, W., 1995.** Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, pp.774–778.
- López-Ochoa, L. et al., 2007.** Structural relationships between diverse *cis*-acting elements are critical for the functional properties of a *rbcS* minimal light regulatory unit. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), pp.4397–4406.
- Lu, S.X. y Hrabak, E.M., 2002.** An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant physiology*, 128(3), pp.1008–1021.
- Lu, S.X. y Hrabak, E.M., 2013.** The myristoylated amino-terminus of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase mediates plasma membrane localization. *Plant Molecular Biology*, 82(3), pp.267–278.
- Ludwig, A.A., Romeis, T. y Jones, J.D.G., 2004.** CDPK-mediated signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), pp.181–188.
- MacIntosh, G. et al., 1996.** Changes in Calcium-Dependent Protein Kinase Activity during *in Vitro* Tubertization in Potato. *Plant Physiology*, 112(4), pp.1541–1550.
- Madeira, F. et al., 2019.** The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47 (W1), W636-W641.

- Maniatis, T., y Tasic, B., 2002.** Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418, 236–243.
- Martín, M.L. y Busconi, L., 2000.** Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant Journal*, 24(4), pp.429–435.
- McAinsh, M.R. et al., 1995.** Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium. *The Plant cell*, 7(8), pp.1207–1219.
- McClendon, C. et al., 2014.** Dynamic architecture of a protein kinase. *PNAS*, pp.E4623–E4631
- Mehlmer, N. et al., 2010.** The Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 63(3), pp.484–498.
- Miedema, H. et al., 2001.** Calcium uptake by plant cells-channels and pumps acting in concert. *Trends in Plant Science*, 6(11), pp.514–519.
- Mittal, S. et al., 2017.** Genomic Selection for Drought Tolerance Using Genome-Wide SNPs in Maize. *Front. Plant Sci.*, 8:550.
- Mohanta, T. et al., 2019.** Molecular Players of EF-hand Containing Calcium Signaling Event in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1476.
- Mosciaro, M., 2011.** Caracterización de la Producción y Comercialización de Papa en Argentina. *Boletín INTA. Área de Economía y Sociología INTA – Balcarce.*
- Mudgal, V., Madaan, N., y Mudgal, A., 2010.** Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review. *Int J. Bot.* 6(2), pp.136–143.
- Munns, R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), pp.239–250.
- Muñiz García, M.N. y Capiati, D.A., 2011.** Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. *Revista Química Viva*, Número 3, año 10, pp.187–199.
- Muñiz García, M.N. et al., 2012.** Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 *in vitro*. *Planta*, 235(4), pp.761–778.
- Murashige, T., y Skoog, F., 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497.
- Navazio, L. et al., 2000.** Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), pp.8693–8698.
- Nicot, N. et al., 2005.** Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), pp.2907–2914.
- Ouwerkerk, P. et al., 1999.** Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the Tdc gene from Madagascar periwinkle: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(4-5), pp.610–622.
- Parra, G., et al., 2011.** Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic Acids Res.* 39, pp.5328–5337.
- Patil, S. et al., 1995.** Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a

- neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 92, pp.4897–4901.
- Podell, S. y Gribskov, M., 2004.** Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC genomics*, 5(1), p.37.
- Rademacher, E. H., y Offringa, R., 2012.** Evolutionary Adaptations of Plant AGC Kinases: From Light Signaling to Cell Polarity Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 3.
- Raíces, M. et al., 2001.** Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Molecular Biology*, 46(5), pp.591–601.
- Raíces, M., et al., 2003.** Regulation of CDPK isoforms during tuber development. *Plant Mol Biol*, 52, pp.1011–1024.
- Ramachandiran, S. et al., 1997.** Functional Domains of Plant Chimeric Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase: Regulation by Autoinhibitory and Visinin-Like Domains. *J. Biochem.* 121, pp.984–990.
- Rattan, A., Kapoor, N., y Bhardwaj, R., 2012.** Role of brassinosteroids in osmolytes accumulation under salinity stress in *Zea mays* plants. *Int. J. Sci. Research.* 3(9), pp.1822–1827.
- Ray, S. et al., 2007.** Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Molecular genetics and genomics : MGG*, 278(5), pp.493–505.
- Real-time PCR handbook, 2014.** *Life technologies.* Thermo Fisher Scientific. CO010759 0914.
- Reddy, M. y Rajasekharan, R., 2006.** Role of threonine residues in the regulation of manganese-dependent Arabidopsis serine/threonine/tyrosine protein kinase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 455, pp.99–109.
- Ren, J. et al., 2008.** CSS-Palm 2.0: An updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Engineering, Design and Selection*, 21(11), pp.639–644.
- Resh, M.D., 2006.** Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(359), p.re14.
- Reynolds, C.R. et al., 2018.** EzMol: A web server wizard for the rapid visualisation and image production of protein and nucleic acid structures. *J Mol Biol*, Vol. 430.
- Rodriguez Milla, M.A. et al., 2006.** The Arabidopsis AtDi19 gene family encodes a novel type of Cys2/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant molecular biology*, 61(1–2), pp.13–30.
- Romeis, T. et al., 2000.** Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *The Plant cell*, 12(5), pp.803–816.
- Romeis, T. et al., 2001.** Calcium-dependent protein kinases play an essential role in plant defense response. *The EMBO Journal*, vol. 20, n° 20, pp.5556–5567.
- Ronzier, E. et al., 2014.** CPK13, a noncanonical Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase, specifically inhibits KAT2 and KAT1 shaker K<sup>+</sup> channels and reduces stomatal opening. *Plant physiology*, 166(1), pp.314–26.
- Routray, P. et al., 2013.** Phosphorylation of S344 in the calmodulin-binding domain negatively affects CCaMK function during bacterial and fungal symbioses. *The Plant Journal*, 76, pp.287–296.
- Russell, J. 2011.** Imaging calcium signals *in vivo*: a powerful tool in physiology and

- pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 163, pp.1605–1625.
- Rutschmann, F. et al., 2002.** LeCPK1, a Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization. *Society*, 129(May), pp.156–168.
- Saha, P., y Singh, M., 1995.** Characterization of a winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) protein kinase with calmodulin-like domain: regulation by autophosphorylation. *Biochemical Journal*, 305(1), pp.205–210.
- Saijo, Y. et al., 2000.** Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*, 23(3), pp.319–327.
- Sambrook, J., 1977.** Adenovirus amazes at cold spring harbor. *Nature* 268, pp.101–104.
- Sánchez, R. et al., 2015.** Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y/o sodicidad en Argentina. *INTA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina*.
- Sanders, D., Brownlee, C. y Harper, J., 1999.** Communicating with calcium. *The Plant cell*, 11(4), pp.691–706.
- Sanders, D. et al., 2002.** Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant cell*, 14 Suppl, pp.S401–S417.
- Santin, F. et al., 2016.** *Solanum tuberosum* StCDPK1 is regulated by miR390 at the posttranscriptional level and phosphorylates the auxin efflux carrier StPIN4 *in vitro*, a potential downstream target in potato development. *Physiologia plantarum*. 159(2), pp.244–261.
- Saylor, P., Wang, C., Hirai, T. y Adams, J., 1998.** A second magnesium ion is critical for ATP binding in the kinase domain of the oncoprotein v-Fps. *Biochemistry*. 37 (36), pp.12624–12630.
- Scherzer, S. et al., 2012.** Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels. *Molecular Plant*, 5(6), pp.1409–1412.
- Schulz, P., Herde, M. y Romeis, T., 2013.** Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant physiology*, 163(2), pp.523–530.
- Schumaker, K.S. y Sze, H., 1987.** Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *The Journal of biological chemistry*, 262(9), pp.3944–3946.
- Schwechheimer, C. et al., 1998.** Plant transcription factor studies. *Plant Mol. Biol.* 49, pp.127–50.
- Scrase-Field, S.A.M.G. y Knight, M.R., 2003.** Calcium: Just a chemical switch? *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), pp.500–506.
- Sheen, J., 1996.** Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. *Science*. Vol. 274, pp.1900–1902.
- Sheshadri, S. et al., 2016.** Stress-Mediated *cis*-Element Transcription Factor Interactions Interconnecting Primary and Specialized Metabolism in planta. *Front. Plant Sci.* 7:1725.
- Shi, S. et al., 2018.** The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1900.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997.** Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 115, pp.327–334.
- Sibénil, Y. et al., 2001.** Plant bZIP G-box binding factors. *European Journal of Biochemistry*, 268(22), pp.5655–5666.

- Sies, H., 1991.** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69(21-23), 965–968.
- Sigrist, C.J.A. et al., 2013.** New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp.1–4.
- SINAVIMO.** Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/solanum-tuberosum>.
- Širl, M. et al., 2020.** At-Hook Motif Nuclear Localised Protein 18 as a Novel Modulator of Root System Architecture. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1886.
- Spud DB** <http://potato.plantbiology.msu.edu>.
- Stael, S. et al., 2012.** Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 4, pp.1525–1542.
- Steichen, J. et al., 2012.** Structural Basis for the Regulation of Protein Kinase A by Activation Loop Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), pp.14672–14680.
- Sun, C. et al., 2003.** A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the iso1 Promoter. *The Plant Cell*, Vol. 15, pp.2076–2092.
- Sun, G. y Budde, R.J., 1997.** Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases. *Biochemistry*, 36, pp.2139–2146.
- Swatek, K. et al., 2014.** Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochem. J.*, 459, pp.15–25.
- Szczegieliński, J. et al., 2005.** A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. *Plant physiology*, 139(4), pp.1970–1983.
- Tanaka, K. et al., 2010.** Extracellular nucleotides elicit cytosolic free calcium oscillations in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154 (October), pp.705–19.
- Tang, S. y Yang, J., 2013.** Magnesium Binding Sites in Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins*. pp.1243–1250.
- Tanksley, S.D. et al., 1992.** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), pp.1141–1160.
- Taylor, S. et al., 2019.** Evolution of a Dynamic Molecular Switch. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 71, Number 6, pp.672–684.
- Taylor, S. y Kornev, A., 2011.** Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends Biochem Sci.* 36(2), pp.65–77.
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR).** <https://www.Arabidopsis.org>.
- The UniProt Consortium,** UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, pp.D506–D515.
- Tilly, J. et al., 1998.** The CARG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects. *Development* 125, pp.1647–1657.
- Ulloa, R.M. et al., 2002.** Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiologia plantarum*, 115(3), pp.417–427.
- Valmonte, G.R. et al., 2014.** Calcium-dependent protein kinases in plants: Evolution, expression and function. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), pp.551–569.
- Vardhini, B.V., 2012.** Application of brassinolide mitigates saline stress of certain metabolites of

- sorghum grown in Karaikal. *J. Phytol.* 4, pp.1–3.
- Wan, B., Lin, Y. y Mou, T., 2007.** Expression of rice Ca<sup>(2+)</sup>-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS letters*, 581(6), pp.1179–1189.
- Wang, J. et al., 2015.** Cadmium Induces Apoptosis in Freshwater Crab *Sinopotamon henanense* through Activating Calcium Signal Transduction Pathway. *PLoS one*, 10(12), p.e0144392.
- Waterhouse, A. et al., 2018.** SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), pp.W296-W303.
- Webb, T.E. et al., 1996.** A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Molecular pharmacology*, 50(2), pp.258–265.
- Webb, A., 2013.** Focus Issue: Calcium Signaling. *Plant Physiol*, Vol. 163, pp.457–458.
- Wei, C. et al., 2019.** Comparative Analysis of Calcium-Dependent Protein Kinase in Cucurbitaceae and Expression Studies in Watermelon. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2527.
- Wen, F. et al., 2020.** Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase (CDPK) in grass *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*, 21, 53.
- Wernimont, A. et al., 2010.** Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol.* 17(5), pp.596–601.
- White, P., y Broadley, M., 2003.** Calcium in Plnats. *Annals of Botany*, 92, pp.487–511.
- Witte, C.P. et al., 2010.** Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated *in vivo* as part of a kinase cascade that regulates stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), pp.9740–9748.
- Wong, M. et al., 2019.** Phosphoproteomics of Arabidopsis Highly ABA-Induced1 identifies AT-Hook-Like10 phosphorylation required for stress growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 116(6), pp.2354–2363.
- Xie, F. y Zhang, B., 2010.** Target-align: a tool for plant microRNA target identification. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(23), pp.3002–3003.
- Xu, X. et al., 2011.** Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), pp.189–195.
- Yamauchi, S. et al., 2010.** The consensus motif for N-myristoylation of plant proteins in a wheat germ cell-free translation system. *FEBS Journal*, 277(17), pp.3596–3607.
- Yin, Y., y Beachy, R., 1995.** The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Journal*, 7(6), pp.969–980.
- Yoshioka, H. et al., 2009.** Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. *Molecules and cells*, 28(4), pp.321–329.
- Yu, X.-C. et al., 2007.** Expression of a grape calcium-dependent protein kinase ACPK1 in *Arabidopsis thaliana* promotes plant growth and confers abscisic acid-hypersensitivity in germination, postgermination growth, and stomatal movement. *Plant Molecular Biology*, 64(5), pp.531–538.
- Zdobnov, E. M. y Apweiler, R., 2001.** InterProScan: an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17, pp.847–848.
- Zhang, X.S. y Choi, J.H., 2001.** Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *Journal of molecular evolution*, 53(3), pp.214–224.



- Zhao, L. et al., 2013.** Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase 1 and 24 Modulate the Activity of the Inward Rectifying K<sup>+</sup> Channels in Arabidopsis Pollen Tubes. *The Plant Cell*, Vol. 25, pp.649–66.
- Zhou, L. et al., 2014.** A Calcium-Dependent Protein Kinase Interacts with and Activates A Calcium Channel to Regulate Pollen Tube Growth. *Molecular Plant*, Vol. 7, No. 2, pp.369–376.
- Zhou, Y. et al., 2009.** Viral calciomics: Interplays between Ca<sup>2+</sup> and virus. *Cell Calcium*, 46(1), pp.1–17.
- Zhu, S.-Y. et al., 2007.** Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(10), pp.3019–3036.
- Zhuang, J. et al., 2010.** Isolation and characterization of an AP2/ERF-RAV transcription factor BnaRAV-1-HY15 in *Brassica napus* L. HuYou15. *Molecular Biology Reports*, 38(6), pp.3921–3928.
- Zou, J.-J. et al., 2010.** Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant physiology*, 154(3), pp.1232–43.
- Zou, J.-J. et al., 2015.** Arabidopsis CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 Function in Abscisic Acid-Mediated Signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Homeostasis in Stomatal Guard Cells under Drought Stress. *The Plant Cell*, 27(5), pp.1445–1460.
- Zulawski, M. et al., 2014.** The Arabidopsis Kinome: phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. *BMC genomics*, 15, p.548.

## ANEXO 1

Sitios de palmitoilación y miristoilación de las AtCPKs del grupo III.

Homólogo papa	ID	Posición	<sup>a</sup> Palmitoilación			<sup>b</sup> Miristoilación	
			Péptido	Score	Cutoff	Predicción	Score
StCDPK23/24	At7	4	****MGNC <b>C</b> GNPSSA	16,768	2,412	RELIABLE	1,416
		5	***MGNC <b>C</b> GNPSSAT	43,068	3,717		
		160	VILYILL <b>C</b> GVPPFWA	3,752	3,717		
	At8	4	****MGNC <b>C</b> CASPGSE	16,364	2,412	RELIABLE	2,058
		5	***MGNC <b>C</b> CASPGSET	45,019	3,717		
		138	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	4,549	3,717		
StCDPK21	At10	4	****MGNC <b>C</b> NACVSRPD	39,887	3,717	TWILIGHT ZONE	-0,861
		7	*MGNC <b>C</b> NACVSRPDSKE	38,392	3,717		
		144	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	4,545	3,717		
		178	IAEVVMM <b>C</b> HSNGVMH	4,569	3,717		
StCDPK27	At13	4	****MGNC <b>C</b> CRSPAAV	15,901	2,412	NO	ND
		5	***MGNC <b>C</b> CRSPAAVA	44,277	3,717		
		135	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	3,91	3,717		
StCDPK22	At14	4	****MGNC <b>C</b> CGTAGSL	19,547	2,412	RELIABLE	1,766
		5	***MGNC <b>C</b> CGTAGSLI	43,545	3,717		
		135	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	4,822	3,717		
	At32	4	****MGNC <b>C</b> CGTAGSL	17,385	2,412	RELIABLE	1,386
		5	***MGNC <b>C</b> CGTAGSLA	43,216	3,717		
		144	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	4,923	3,717		
StCDPK20	At24	4	****MGSC <b>V</b> SSPLKG	20,374	10,722	RELIABLE	4,212
		261	VILYILL <b>C</b> GVPPFWA	3,752	3,717		
StCDPK21	At30	4	****MGNC <b>I</b> ACVKFD	15,13	10,722	NO	ND
		7	*MGNC <b>I</b> ACVKFDPDN	38,013	3,717		
		140	VHIVMEL <b>C</b> EGGELFD	4,552	3,717		

Datos obtenidos a partir de <sup>a</sup>CSS-Palm - Palmitoylation Site Prediction y <sup>b</sup>Myristoylator.

## ANEXO 2

Número de acceso de las isoformas del grupo III de *Arabidopsis*, arroz, papa y tomate incluídas en el análisis filogenético.

Espece	Isoforma	Número de acceso
<b>Arabidopsis</b>	AtCPK7	At5g12480
	AtCPK8	At5g19450
	AtCPK10	At1g18890
	AtCPK13	At3g51850
	AtCPK14	At2g41860
	AtCPK24	At2g31500
	AtCPK30	At1g74740
	AtCPK32	At3g57530
<b>Arroz</b>	OsCPK3	AP004366
	OsCPK8	AC135595
	OsCPK9	AC097277
	OsCPK16	AC108503
	OsCPK20	AP003866
	OsCPK21	AP003948
	OsCPK22	AC108755
	OsCPK29	BX842241
<b>Papa</b>	StCDPK20	PGSC0003DMT400069175
	StCDPK21	PGSC0003DMT400034291
	StCDPK22	PGSC0003DMT400021055
	StCDPK23	PGSC0003DMT400027809
	StCDPK24	PGSC0003DMT400083474
	StCDPK27	PGSC0003DMT400077747
		NW_006239715.1
		XM_006367453.2
CCaMK	PGSC0003DMP400047866	
<b>Tomate</b>	<i>SICDPK1</i>	Solyc01g008440.2.1
	<i>SICDPK3</i>	Solyc03g113390.2.1
	<i>SICDPK6</i>	Solyc06g073350.2.1
	<i>SICDPK9</i>	Solyc09g005550.2.1
	<i>SICDPK10</i>	Solyc10g079130.1.1
	<i>SICDPK11</i>	Solyc11g065660.1.1

Se incluye la CCaMK de papa.

## ANEXO 3

Péptidos fosforilados experimentalmente en StCDPK22/24.

Isoforma+tratamiento	Dominio	Parte del péptido	Veces que aparece	Número de veces fosforilado	%
St22+EGTA	NTV	HKSYVL	1	1	100
	KD	YACKSIS	2	2	100
		DPSKRL	1	1	100
	AD	APNVSL	13	2	15,4
		GETVKA	13	3	23,1
CTV	DGSLQS	12	4	33,3	
St24+Ca <sup>2+</sup>	NTV	TQASGG	20	3	15
	AD	VSLGETV	54	5	9,3
		VSLGETV	54	4	7,4
	CLD	AFSVFD	6	1	16,7
		DQSGYI	8	1	12,5
CTV	DGSIQV	7	4	57,1	
St24+EGTA	NTV	TQASGG	5	1	20
	AD	APNVSL	14	3	21,4
		GETVKA	14	2	14,3
	CTV	DGSIQV	3	1	33,3

En rojo se resalta el residuo fosforilado.

A continuación, se listan los péptidos obtenidos de las digestiones. Se indican los que aparecieron para las dos condiciones ensayadas en ambas isoformas y luego en cada una por separado. Subrayado figura el *tag* de histidinas.

### Péptidos compartidos por ambas

Con Ca<sup>2+</sup>:

VSDNAKDLVKK

Con EGTA:

DTYEDDNAVHIVMELCEGGELFDR

### Péptidos sólo en St22

Con Ca<sup>2+</sup>:

GEFGVTYLSTDKVSGDVYACK

HSNIVTLK

DLKPENFLFENKK

Con EGTA:

GKNKPNPFSVDYAHGNGHKSIVLDNPTGTDIEATYELGRELGRGEFGVTYLSTDKVSGDVYACKSISKK

TIVEVIQMCHK

DLKPENFLFENKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKR

VSDNAKDLVKKMLNPDPSKRLTAQEVLDPWIQNAKKAPNVSLGETVKAR  
 VIAEHLTVDEVAGIKEGFQLMDIGNK  
 LGHQIPESDVQILMDVGDVVK  
 KAFDFFDRNQNGYIEIELR  
 ISYDEFSTMMK  
 LMKDGSLSVEHHHHH

### **Péptidos sólo en St24**

*Con Ca<sup>2+</sup>:*

GNCCGTPGNSENK  
 KNKPNPFALDYGATQASGGDGNKLVVLKDPTRHNIQEKYDLGCELGRGEFGVTYLCTDVDTGDKYACK  
 LRTAVDIDDVRR  
 HLPKHPNIVTLKDTYEDDNAVHIVMELCEGGELFDR  
 TIVEVQMCHMHGVMHRDLKPENFLFGNKKEAAPLKAIDFGLSVFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKR  
 VSDNAKDLVKKMLDPDPTRRRLTAQQVLEHTWLQNIKKAPNVSLGETVKARLKQFSVMNK  
 GKINLGELR  
 AFSVFDRDQSGYIEIELRSALSDEDGGNSEEVINAIMHDVDTDKDGRISYEEFAVMMK  
 DGSIQVGKEEGRLEHHHHH

*Con EGTA:*

NKPNPFALDYGATQASGGDGNKLVVLKDPTRHNIQEKYDLGCELGRGEFGVTYLCTDVDTGDKYACK  
 LRTAVDIDDVRR  
 HPNIVTLK  
 DLKPENFLFGNKKEAAPLKAIDFGLSVFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKR  
 VSDNAKDLVKKMLDPDPTRRRLTAQQVLEHTWLQNIKKAPNVSLGETVKARLKQFSVMNK  
 AFSVFDRDQSGYIEIELRSALSDEDGGNSEEVINAIMHDVDTDKDGRISYEEFAVMMK  
 DGSIQVGKEEGR

# ANEXO 4

Niveles de expresión de las *AtCPK7/8/14/32*. Fuente: TAIR, basado en el mapa de alta resolución del transcriptoma de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Klepikova *et al.* 2016).

