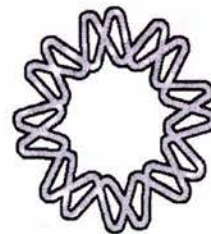


00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Determinación de la localización subcelular de la proteína
PvLEA18 de frijol mediante la fusión con la Proteína Verde Fluorescente**

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Bioquímicas

Presenta

Lic. en Ciencias Rosa Estela Quiroz Castañeda

Director de Tesis

Dr. Francisco Campos Álvarez

Noviembre 2005

M:350075



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Comité Tutorial, cuya guía y dedicación fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Dra. Patricia León Mejía

Dr. Mario Rocha Sosa

Dr. Francisco Campos Álvarez

A los miembros del Jurado del examen para la Obtención de Grado, por sus comentarios críticos y correcciones en el manuscrito de la tesis.

PRESIDENTE Dr. Omar Pantoja Ayala

SECRETARIO Dr. Francisco Campos Álvarez

VOCAL Dr. Jorge Luis Folch Mallol

SUPLENTE Dr. Arturo Guevara García

SUPLENTE Dr. Ernesto Ortiz Suri

A la Dra. Alejandra Covarrubias Robles por su interés en el desarrollo de este trabajo, por la crítica constructiva y los buenos momentos que nos ha hecho compartir en el grupo.

Al Dr. Francisco Campos Álvarez por su dedicación y confianza durante la realización de este trabajo, por hacerme ver lo mejor en mis errores y siempre motivarme hacia el éxito.

A mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo, confianza y entendimiento a lo largo de mi vida, especialmente en los momentos más difíciles de mi trabajo y animarme a seguir siempre adelante.

A mis compañeros del laboratorio, Sonia, Rosy, Marina, Pepe, Adriana, Erika, Yadira, Caty, Jose Luis y Chuy, por todos sus comentarios y valiosa ayuda en el trabajo experimental.

Al Dr. Enrique Murillo Reyes de la Unidad de Cultivo de Tejidos y Crecimiento Vegetal por su valiosa ayuda y contribución en el proceso de bombardeo de tejidos.

A Andrés Saralegui Amaro de la Unidad de Microscopía Confocal/IBT por la obtención de las imágenes presentadas en este trabajo.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas por la síntesis de los oligonucleótidos empleados en la realización de este trabajo.

Esta tesis de Maestría se llevó a cabo dentro del Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas en el Laboratorio a cargo de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
 NOMBRE: Pasa Estela Quiroz Castañeda
 FECHA: 3/10/05
 FIRMA: [Firma]

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.A Estrés hídrico	
I.A.1 Genes inducidos por déficit hídrico	
I.B Proteínas abundantes de embriogénesis tardía (Proteínas LEA)	6
I.B.1 Características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas LEA	
I.B.2 Clasificación de las proteínas LEA	
I.B.2.1 Proteínas LEA del grupo 6: PvLEA18	
I.B.2.2 Localización celular de la proteína PvLEA18	
I.B.2.3 Regulación de la expresión del gen <i>PvLEA18</i>	
I.B.3 Posibles funciones de las proteínas LEA	
I.B.4 Ejemplos de plantas transgénicas que expresan proteínas LEA	
I.C El transporte de proteínas al núcleo	13
I.C.1 Complejo del poro nuclear (NPC)	
I.C.2 Mecanismos de importación al núcleo	
I.D Proteínas de fusión	29
I.D.1 Proteína verde fluorescente (GFP)	
I.D.2 Marcado de epítipo (HA)	
Hipótesis	35
Objetivos Generales	35
Objetivos Particulares	36
II. MATERIALES Y MÉTODOS	37
II.A Material Biológico	
II.B Obtención de plantas transgénicas	
II.C Microscopía	
II.D Construcciones	
II.D.1 Obtención de las construcciones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA	
II.D.2 Obtención de las construcciones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS	
II.E Aislamiento de RNA	
II.F Aislamiento y análisis de proteínas solubles	
II.G Aislamiento de núcleos	
II.H Análisis bioinformático	

III. RESULTADOS	51
III.A Predicción de posibles señales de localización subcelular de la proteína PvLEA18	51
III.B Obtención de plantas transgénicas expresando las fusiones de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con el epítipo de hemaglutinina (HA)	54
III.B.1 Obtención de las fusiones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA	
III.B.2 Selección de plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA	
III.B.3 PCR de plantas transgénicas	
III.B.4 Ensayo histoquímico de GUS (<i>β-Glucuronidasa</i>)	
III.B.5 Determinación de los patrones de acumulación de transcrito en plantas transgénicas	
III.B.6 Detección de la proteína PvLEA18 y PvLEA18DEL en plantas transgénicas	
III.C Expresión transitoria en epidermis de cebolla de las proteínas PvLEA18 y PvLEA18DEL fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP)	64
III.C.1 Obtención de las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS	
III.C.2 Transformación de epidermis de cebolla por bombardeo	
III.C.3 Análisis por microscopía confocal	
III.C.4 Efecto de ABA en la localización subcelular	
III.D Obtención de plantas transgénicas que expresan de manera estable la fusión de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con la proteína verde fluorescente (GFP)	71
III.D.1 Selección de plantas transgénicas	
III.D.2 PCR de plántulas transgénicas	
III.D.3 Ensayo histoquímico de GUS	
III.D.4 Determinación de los patrones de acumulación de transcrito en las plantas transgénicas	

III.E Detección de las proteínas de fusión PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS en plantas transgénicas.....	77
III.E.1 Detección de fluorescencia de GFP en pelos radiculares de plantas transgénicas	
III.E.2 Microscopía confocal de raíces de plantas transgénicas	
III.F Localización de la proteína PvLEA18 en semillas de frijol.....	87
IV. DISCUSIÓN.....	90
IV.A LOCALIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE GFP EN EPIDERMIS DE CEBOLLA Y EN PLANTAS TRANSGÉNICAS	92
IV.B ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GUS EN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA	96
V. CONCLUSIONES.....	97
VI. PERSPECTIVAS	98
VII. REFERENCIAS.....	99

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas frecuentemente se encuentran bajo condiciones ambientales fluctuantes que pueden afectar su crecimiento, desarrollo y viabilidad. El estrés causado por un déficit o exceso de las condiciones químicas o físicas ambientales se denomina estrés abiótico. Las condiciones ambientales de tipo abiótico que dañan a la planta son: la sequía, las temperaturas extremas, la salinidad del suelo, el exceso de agua y la cantidad de luz, entre otras (Bray *et al*, 2000).

I.A. Estrés hídrico

La planta sufre déficit hídrico cuando el proceso de la transpiración excede a la entrada de agua en la célula. Este fenómeno es un componente común en varios estreses ambientales como son la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas (Bray, 1997). La desecación es un proceso normal durante algunas fases del desarrollo de la planta como son: la formación de la semilla y del polen (McCue, 1990; Thomashow, 1993). Como es el caso de la mayoría de las angiospermas, que en las últimas etapas de formación de las semillas pueden tolerar una deshidratación de los tejidos del embrión en niveles de alrededor del 95% (Bray, 1997). Este mecanismo le permite a las semillas tolerar factores ambientales adversos hasta que se presenten las condiciones adecuadas para su germinación.

El estrés hídrico afecta el estado fisiológico y metabólico de las plantas causando modificaciones bioquímicas, celulares y moleculares, que van desde el cerrado de estomas en las hojas, la inhibición del crecimiento, el aumento en la concentración de la fitohormona ABA (ácido abscísico), hasta cambios en la concentración de solutos en la célula, lo cual tendrá como resultado un cambio en su forma. Si la deshidratación continúa, se empiezan a afectar los componentes celulares, el volumen celular y la forma de la membrana plasmática cambian, hay un aumento en la concentración de solutos, ruptura de los gradientes de potencial hídrico, pérdida de turgencia, pérdida de la integridad de las membranas, separación de la membrana plasmática de la pared celular, desnaturalización de proteínas, cambios en la actividad de enzimas, así como daños en las estructuras subcelulares (Bray, 1997).

El estrés por sequía induce la producción de altos niveles de la hormona ABA, cuyos niveles endógenos aumentan no sólo durante la embriogénesis tardía sino también durante el crecimiento vegetativo en condiciones de estrés hídrico (Busk and Pagès, 1998), lo que a su vez induce la activación de un conjunto de genes de respuesta al déficit hídrico (Bray, 1993).

Dentro de las funciones de ABA se encuentra regular del balance de agua y la tolerancia al estrés osmótico, además de promover el cerrado de los estomas, inhibe la germinación de la semilla, ya que evita que el embrión entre a la fase de crecimiento manteniéndolo en una fase de latencia que se caracteriza por la ausencia de divisiones celulares (Bewley, 1997, Filkenstein *et al.*, 2002, Koornneef *et al.*, 2002).

Dentro de la respuesta adaptativa para tolerar la falta de agua, en las plantas se han seleccionado dos principales mecanismos: el escape y la tolerancia. Un ejemplo del escape al déficit hídrico se presenta en las plantas que se desarrollan rápidamente en la estación lluviosa y producen semillas antes del período de sequía, como es el caso de las plantas anuales que habitan en los desiertos. Otro ejemplo lo presentan las plantas suculentas que previenen la pérdida de agua a través de adaptaciones morfológicas y fisiológicas como la formación de cutículas gruesas, el cerrado y hundimiento de estomas, la reducción del área foliar, la presencia de tejidos almacenadores de agua y el uso del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Ramanjulu and Bartels, 2002).

La tolerancia a la desecación es la capacidad que tienen algunas plantas de mantener su desarrollo en condiciones de déficit hídrico, es el resultado de un conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas a nivel celular y molecular, tales como cambios en las propiedades físicas de la pared celular, la síntesis de enzimas y metabolitos antioxidantes, la síntesis de proteínas protectoras de la maquinaria celular, la compartimentalización de iones y el ajuste osmótico (Ingram and Bartels, 1996). Por ejemplo, la inducción de transferasas de lípidos en partes aéreas de la planta permite el engrosamiento de la cutícula para reducir la pérdida de agua en condiciones de estrés, como la transferasa de lípidos TSW12 de tomate que se expresa en respuesta a sal (Torres- Schuman *et al.*, 1992) y la PvLTP-24 de frijol, en respuesta a sequía y ácido abscísico (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

El balance osmótico de una planta en condiciones de estrés salino está controlado por los transportadores de iones. En *Arabidopsis* el transportador HKT1 regula la entrada de Na⁺ mientras que los antiportadores Na⁺ / H⁺ regulan su expulsión, por su parte, el antiportador AtNHX1 de la membrana de tonoplasto promueve el almacenamiento de Na⁺ dentro de la vacuola (Gaxiola *et al.*, 1999). En condiciones de estrés es muy importante la protección y reparación de la maquinaria fotosintética, en *Cratogeomys plantagineum*, las proteínas DSP22 y DSP34 (**D**esiccation **S**tress **P**rotein) inducidas por desecación se localizan en los tilacoides del cloroplasto, y la DSP21 se encuentra en el estroma. De acuerdo a su localización es posible que su papel en respuesta a sequía sea la estabilización de las membranas tilacoidales y la participación en mecanismos de reparación y protección de proteínas (Schneider *et al.*, 1993).

La resistencia o la sensibilidad al estrés depende de varios factores, entre ellos, la especie, el genotipo, la etapa del desarrollo de la planta, así como la duración y la severidad del estrés (Bray *et al.*, 2000). Aunque a nivel molecular la síntesis de proteínas disminuye durante el estrés, existe un grupo de genes cuya expresión se induce bajo estas condiciones y se ha hipotetizado que la función de este grupo de genes tendría un papel adaptativo de la planta al déficit hídrico (Ingram and Bartels, 1996).

I.A.1. Genes inducidos por déficit hídrico

El primer paso en la regulación de la respuesta al déficit hídrico es la percepción de una señal la cual desencadena su transducción y amplificación que finaliza con la activación de un conjunto de genes implicados en la respuesta al estrés. Existen varios estímulos por los cuales una célula vegetal puede sentir la pérdida de agua: la disminución o pérdida del turgor, los cambios en el volumen celular, la pérdida de la tensión de la membrana, el aumento en la concentración intracelular de solutos y las alteraciones en las conexiones entre la membrana plasmática y la pared celular (Bray, 1997). Los cambios en el metabolismo y en el desarrollo inducidos por el estrés son producto de una serie de procesos que se desencadenan a partir de una alteración en la expresión génica (Ingram and Bartels, 1996).

Se han llevado a cabo análisis moleculares que han permitido identificar algunos de los genes que son inducidos o regulados por estrés hídrico (Ingram and Bartels, 1996; Bray, 1997; Zhu *et al.*, 1997).

El uso de microarreglos ha permitido identificar y analizar de manera global los genes regulados por condiciones que implican un déficit hídrico, como deshidratación, frío o concentraciones altas de sal, (Bohnert and Bressan, 2001; Kawasaki *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2001). Algunos de los genes que se inducen por déficit hídrico son los que codifican para proteínas altamente hidrofílicas como *RD29A*, *RD29B* y proteínas tipo LEA como *ERD10*, *COR47* y *RAB18* (Seki *et al.*, 2002).

Muchos estudios se han enfocado en la activación transcripcional de genes, sin embargo, existen evidencias que indican que los productos finales de la expresión génica están influenciados por mecanismos a nivel post-transcripcional que incrementan la cantidad de RNA mensajero, promueven la traducción y estabilización de proteínas y alteran la actividad de enzimas o una combinación de éstos (Bray *et al.*, 2000).

Los productos de los genes inducibles por estrés hídrico incluyen a proteínas que participan en la tolerancia al estrés y protegen directamente a la planta contra el estrés ambiental, como son: a) canales de agua, los cuales estarían involucrados en el movimiento de agua a través de la membrana, b) enzimas requeridas para la biosíntesis de osmolitos protectores, p.ej. azúcares, prolina y glicina-betaina, c) proteínas que podrían proteger macromoléculas y membranas tales como las proteínas LEA, osmotina, proteínas anticongelantes, chaperonas y proteínas de unión a mRNA, d) enzimas de detoxificación, p.ej. glutatión S-transferasa, catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa. También se incluyen proteínas reguladoras, las cuales estarían involucradas en la regulación génica y en la transducción de señales en respuesta al estrés, como: cinasas de proteínas, factores de transcripción con sitios de unión a DNA (DREB/CBF, bZip, MYC, MYB y "dedos de Zinc"), fosfolipasa C y proteínas señalizantes 14-3-3 (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

A nivel de regulación, los elementos de respuesta que actúan en *cis* en los promotores de genes que responden a estrés incluyen al elemento de respuesta a ácido abscísico (ABRE, ABA Responsive Element) y al elemento de respuesta a

deshidratación (DRE/CRT, **D**ehydratation-**R**esponsive **E**lement/**C**-Repeat) (Bray, 1997). El elemento ABRE es una secuencia de 8- 10 nucleótidos presente en los promotores de genes inducibles por ABA que comparten la secuencia consenso (C/T)ACGTGGC, la cual contiene el motivo palindrómico ACGT. Se ha demostrado que este motivo palindrómico está presente también en otros elementos reguladores, como la caja G, implicada en la regulación de genes regulados por luz, auxinas, ácido jasmónico y ácido salicílico. Se ha sugerido que los nucleótidos que flanquean el motivo palindrómico de la caja ABRE pueden ser importantes en la regulación de la respuesta (Ingram and Bartels, 1996). Los factores transcripcionales involucrados en la respuesta a ABA son los de tipo MYC y MYB, que se sintetizan después de la acumulación de ABA endógeno. En *Arabidopsis thaliana*, los factores AtMYC2 y AtMYB2 actúan como activadores transcripcionales en la inducción de la expresión génica en respuesta a ABA y su sobreexpresión incrementa la tolerancia a estrés osmótico (Abe *et al.*, 2003).

Aunque en muchos genes la presencia del elemento ABRE es suficiente para su expresión mediada por ABA, en algunos genes se han caracterizado elementos adicionales en *cis* denominados elementos acopladores (CE), que dan una mayor especificidad de la respuesta a través de la unión a diferentes factores transcripcionales (Bray, 1997). El gen de cebada *HVA22* requiere del elemento acoplador CE1 (TGCCACCGG) y de un elemento ABRE para su regulación por ABA; mientras que en el gen *HVA1*, cuyo producto es una proteína LEA del grupo 3, requiere del elemento CE3 (ACGCGTGTCTC) (Bray, 1997).

En el caso de los genes cuyos productos se acumulan en respuesta a estrés hídrico de manera independiente de ABA, se ha encontrado que la secuencia consenso TA/GCCGACAT del elemento DRE/CRT se localiza en sus promotores. El elemento DRE se identificó por primera vez en el promotor de un gen de respuesta a sequía (*RD29A*) en *Arabidopsis thaliana* que codifica para una proteína hidrofílica similar a las proteínas LEA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Shinozaki, 2003). Estos factores transcripcionales comparten una región de 60 a 70 aminoácidos (dominio AP2) el cual está compuesto de dos módulos, uno de 20 aminoácidos básicos e hidrofílicos en la región amino (elemento YRG) y una secuencia en el extremo carboxilo que puede formar una α -hélice anfipática (elemento RAYD) (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki,

2000). La sobreexpresión del factor transcripcional DREB1A, otorga una marcada tolerancia a deshidratación, salinidad y frío en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Kasuga *et al.*, 1999). Por el contrario, la sobreexpresión de las proteínas DREB2 que se inducen por deshidratación no resulta en una mayor tolerancia al estrés (Liu *et al.*, 1998) probablemente debido a que se requieren alteraciones postranscripcionales para que estas proteínas sean activas (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

I.B. Proteínas abundantes de embriogénesis tardía

Algunos de los genes cuya expresión es inducida durante déficit hídrico son los que codifican para las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía o proteínas LEA (del inglés: **L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant). Estas proteínas fueron caracterizadas por primera vez en algodón durante la etapa de desecación de la semilla y posteriormente, se aislaron de otras especies vegetales, agrupándolas en cinco familias de acuerdo a la similitud estructural y homología de secuencias (Dure, 1993; Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993).

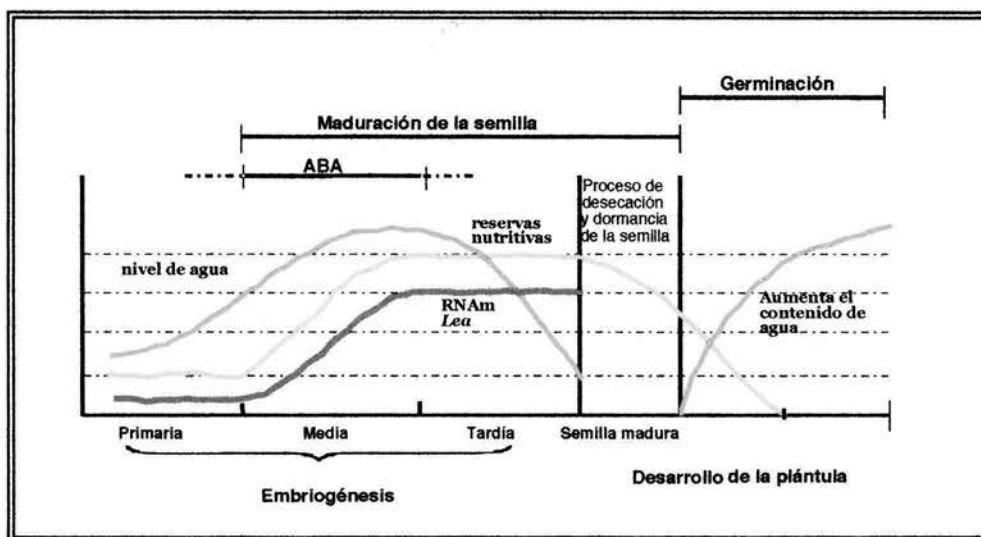


Fig. 1. Eventos que ocurren durante las diferentes etapas del desarrollo de la semilla. Los altos niveles de ABA están temporalmente correlacionados con el inicio de maduración y con la prevención de la germinación precoz durante la mitad del desarrollo del embrión. El transcrito de los genes *LEA* correlaciona con los niveles de ABA (Skriver and Mundy, 1990; Ross and Quatrano, 1994; Arroyo, 2003).

Estas proteínas no sólo se acumulan durante la última etapa de la maduración de semilla (Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993), sino que también se expresan en tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación (Bray, 1997; Ingram and Bartels, 1996), en algunos casos, tanto los RNA mensajeros como las proteínas pueden ser inducidas mediante la incubación de semillas inmaduras y tejido vegetativo con ABA (Galau *et al.*, 1986; Ingram and Bartels, 1996; Close, 1997). La acumulación del mRNA de las proteínas desaparece una vez iniciada la etapa de germinación (Galau *et al.*, 1986) (Fig.1). Durante el desarrollo normal de la semilla, la mayoría de las proteínas LEA se localizan en todos los tipos celulares del embrión (Close and Bray, 1993; Roberts *et al.*, 1993; Goday *et al.*, 1994).

En cuanto a su localización subcelular, las proteínas LEA se han encontrado predominantemente en el citoplasma y núcleo de células meristemáticas, vasculares y provasculares, en cloroplastos, en cuerpos proteicos y amiloplastos, en mitocondrias de cereales en condiciones de estrés y en vacuolas (Mundy and Chua, 1988; Close and Lambert, 1993; Goday *et al.*, 1994; Houde *et al.*, 1995; Niogret *et al.*, 1996; Artus *et al.*, 1996, Ndong *et al.*, 2002; Rinne *et al.*, 1999; Grelet *et al.*, 2004; Borovskii *et al.*, 2000; Heyen *et al.*, 2002).

Actualmente se propone que las proteínas LEA son ubicuas en el reino vegetal, incluso se han detectado proteínas LEA en helechos, musgos y algas como *Chlorella vulgaris* (Oliver and Wood, 1997; Joh *et al.*, 1995). Además se han detectado proteínas tipo LEA en organismos no fotosintéticos como en algunos nemátodos, hongos y bacterias (Browne *et al.*, 2002; Goyal, *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1988; White and Yanofsky, 1993; Dure, 2001; Battista *et al.*, 2001).

I.B.1 Características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas LEA

Las proteínas LEA son altamente hidrofílicas, con un alto contenido de aminoácidos cargados como lisina, ácido glutámico, además de treonina y glicina, no poseen una estructura globular, pero sí regiones con estructura flexible ("random coil"), por lo que son resistentes a la precipitación por efecto de altas temperaturas, además, carecen o presentan porcentajes muy bajos de cisteína y triptofano (Dure *et al.*, 1993a).

En organismos como bacterias, levaduras (Garay-Arroyo *et al.*, 2000) y nemátodos (Browne *et al.*, 2002), se han encontrado proteínas con características fisicoquímicas similares a las LEA, por lo que se ha propuesto que las proteínas LEA forman parte de un grupo más general denominado "hidrofilinas" que incluye proteínas de organismos eucariontes y procariontes con las características de poseer un alto contenido de glicina (> 6 %) y un alto índice de hidrofilicidad (> 1.0) (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Se ha propuesto que algunas proteínas del tipo "hidrofilinas" podrían haber sido seleccionadas como parte de un mecanismo adaptativo que ayuda a mantener una maquinaria traduccional funcional en un medio limitado de agua.

Existen numerosos estudios donde se han observado transiciones estructurales en proteínas con estructuras flexibles por efecto de la temperatura, el pH y la presencia de iones (Uversky, 2002). Se ha comprobado por métodos espectroscópicos que una proteína de soya de la familia LEA1 presenta transiciones de estructura flexible a una conformación de α -hélice en presencia de algunos solventes, así como un incremento en la conformación de hélice extendida conforme disminuye la temperatura (Soulages *et al.*, 2002). En otros organismos, también se han detectado transiciones en la conformación de proteínas en respuesta a estrés, una proteína similar a las LEA de la familia 3 (AavLEA1) en el nemátodo anhidrobiótico *Aphelenchus avenae* cambia de su estado nativo (sin plegamiento) a una estructura ordenada de α -hélice y posiblemente forma estructuras tipo "coiled coil" en respuesta a la desecación (Goyal *et al.*, 2003).

Tanto el patrón de expresión de las proteínas LEA en las fases de desecación de la semilla, su inducción en tejidos vegetativos expuestos a deshidratación y sus características estructurales sugieren que pueden participar en la adquisición de la tolerancia a la desecación al mantener estructuras celulares específicas o disminuir los efectos de estrés manteniendo un requerimiento hídrico mínimo (Dure, 1993; Cuming, 1999).

I.B.2 Clasificación de las Proteínas LEA

Las proteínas LEA se agrupan en 6 familias o grupos de acuerdo a la homología en sus secuencias de aminoácidos (Buchanan *et al.*, 2000). A pesar de no compartir una homología de secuencia significativa entre los diferentes miembros de las familias

de proteínas LEA, destaca la característica en cada familia de ser altamente hidrofílicas y de tener un alto porcentaje de glicinas.

Proteínas LEA del Grupo 1 (familia D-19)

Las proteínas LEA del grupo 1 se han encontrado en plantas y bacterias como *Bacillus subtilis* (Stacy and Aalen, 1998). Estas proteínas tienen un peso molecular bajo (9.9 -12.1 kDa) con la característica de ser altamente homólogas entre sí. Se distinguen por ser más hidrofílicas que el resto (Fig. 2) y altamente conservadas a lo largo de la secuencia proteica, poseen un dominio interno conservado de 20 aminoácidos: **GGQTRKEQLGEEGYREMGHK** que puede estar repetido hasta cuatro veces en la secuencia de la proteína (Esperlund *et al.*, 1992).

La mayor parte de la conformación de estas proteínas LEA es flexible con la predicción de pequeñas α -hélices, lo que ha llevado a proponer que podrían desempeñarse como proteínas de unión a moléculas de agua, minimizando así la pérdida de ésta (Fig. 2) (McCubbin and Kay, 1985; Roberts *et al.*, 1993), como amortiguadores de hidratación para regular los niveles de agua (Dure, 1993), o interactuando con la superficie de macromoléculas para protegerlas de la desnaturalización (McCubbin and Kay, 1985). También se propone que este tipo de proteínas mantiene la mayor parte de su superficie disponible para la interacción con los solventes, lo que constituye la base de la función de las proteínas LEA durante el congelamiento, desecación y estrés osmótico (Soulages *et al.*, 2002). Algunas proteínas representativas de este grupo son Em1 y Em2 de trigo y sus homólogos en *Arabidopsis thaliana*, AtEm6 y AtEm1 (Gaubier *et al.*, 1993).

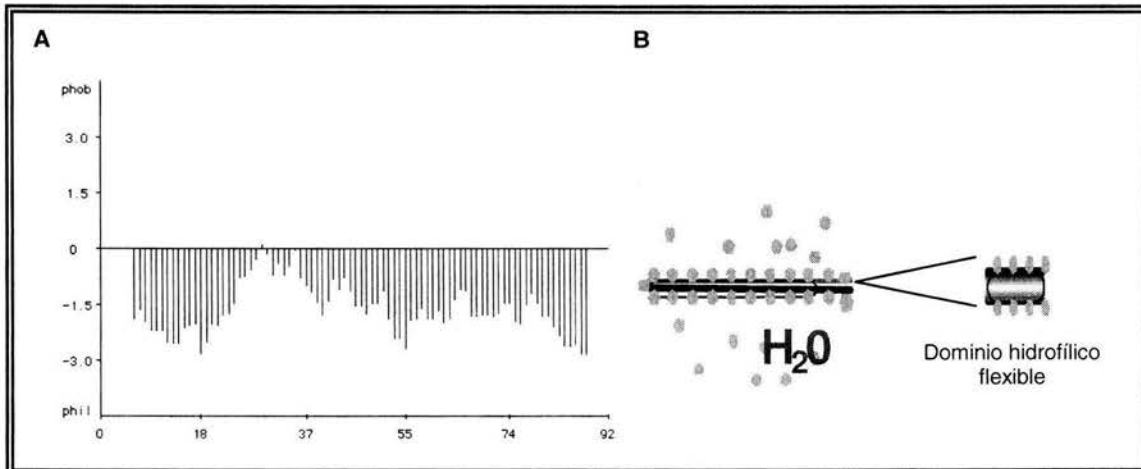


Fig. 2. A) Perfil de hidropatía representativo para una proteína LEA del grupo 1 donde se aprecia el carácter hidrofílico. **B)** Estructura secundaria flexible predicha de acuerdo a la secuencia de aminoácidos, lo que ha llevado a proponer que dichas proteínas podrían desempeñarse como proteínas de unión a moléculas de agua.

Proteínas LEA del Grupo 2 o dehidrinas (familia D-11)

Las proteínas de este grupo se han encontrado sólo en plantas, incluyen miembros que responden a sequía, salinidad y a bajas temperaturas. Presentan tamaños variables (14-150 kDa) y se caracterizan por tener una secuencia consenso muy conservada de 15 aminoácidos rica en lisina **EKKGIMDKIKELPG** (segmento K), que se localiza en el extremo C-terminal (Close, 1997). Se propone que esta secuencia consenso les permite formar estructuras de α -hélices anfipáticas que pueden tener interacciones hidrofóbicas con proteínas parcialmente desnaturalizadas y membranas.

Pueden contener regiones ricas en serinas fosforilables (segmento S) a lo largo de su secuencia (Close, 1996). Algunas dehidrinas presentan como dominio conservado el motivo (V/T)DEYGNP o segmento Y, el cual está localizado cerca del extremo N-terminal (Fig. 3). Mediante experimentos de inmunolocalización y fraccionamiento celular se ha mostrado que las proteínas de este grupo se localizan en núcleo y citoplasma (Goday *et al.*, 1994). También se ha propuesto que estas proteínas pudieran estabilizar macromoléculas bajo condiciones de estrés (Bray *et al.*, 2000), algunas de estas proteínas pueden participar en el transporte de iones a través del floema, con preferencia por el Fe^{3+} y por complejos de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} *in vitro* (Krüger *et al.*, 2002). En *Arabidopsis thaliana* existen 9 miembros de este tipo de proteínas.

Algunas proteínas representativas de este grupo son RAB17 (**R**esponsive **A**bscicic **A**cid) de maíz (Godoy *et al.*, 1994) y la proteína D11 de algodón (Galau and Close, 1993).

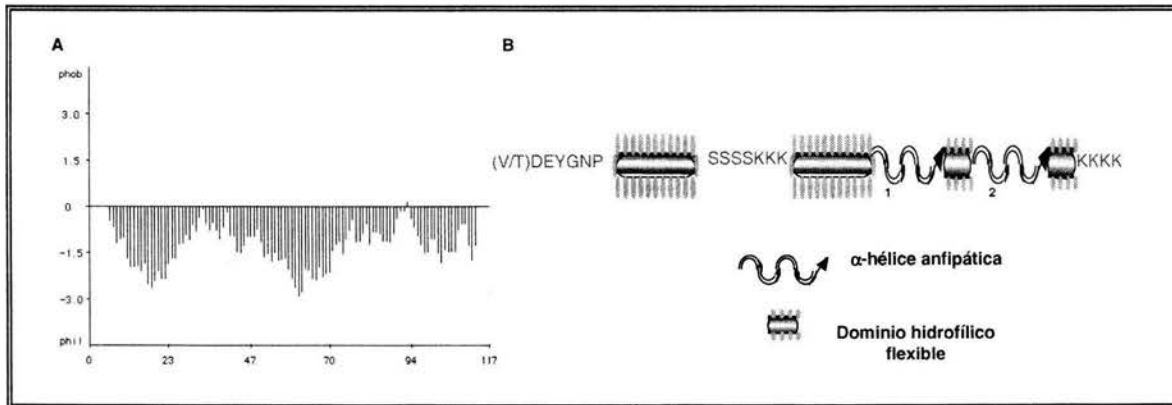


Fig. 3. A) Perfil de hidropatía representativo para una proteína LEA del grupo 2 donde se muestra su carácter hidrofílico. **B)** Estructura secundaria predicha para las proteínas de este grupo que se caracterizan por tener una secuencia consenso rica en lisina la cual se propone que forma estructuras de α -hélices anfipáticas y regiones ricas en serinas fosforilables a lo largo de su secuencia.

Proteínas LEA del Grupo 3 (familia D-7)

Se caracterizan por tener dominios repetidos en tándem de 11 aminoácidos con la secuencia consenso **TAQAAKEKAGE**, la cual puede estar repetida varias veces (entre 5 y 13 veces) en la proteína, lo que hace que los miembros de esta familia tengan tamaños variables (Dure *et al.*, 1993b). Se ha predicho que la secuencia consenso puede formar α hélices anfipáticas y probablemente estas hélices formarían dímeros intramoleculares que se unan a cationes y aniones como protección para la célula en el estrés (Fig. 4) (Bray *et al.*, 2000) y cuya existencia impediría la precipitación/cristalización de sales dentro de las células de tejidos que están destinados a desecarse hasta tener el 5% de agua (Dure *et al.*, 1993a). Se ha hipotetizado que la secuencia consenso podría contrarrestar los efectos dañinos del aumento en la fuerza iónica en el citoplasma durante la deshidratación mediante la formación de puentes salinos con los aminoácidos de las proteínas altamente cargadas (Baker *et al.*, 1988). Un miembro de esta familia, la proteína WCS19, se han identificado en el estroma del cloroplasto en trigo y centeno (Ndong *et al.*, 2002).

La secuencia consenso de 11 aminoácidos fué reconocida primero en plantas, y se ha observado en una gran variedad de organismos, como los nemátodos *Caenorhabditis elegans*, *Steinernema feltiae* y *Aphelenchus avenae*, en las eubacterias *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* y *Deinococcus radiodurans* (Dure, 2001; Browne *et al.*, 2002). En *Arabidopsis thaliana* existen por lo menos 11 miembros de este tipo de proteínas (Quiroz, 2003).

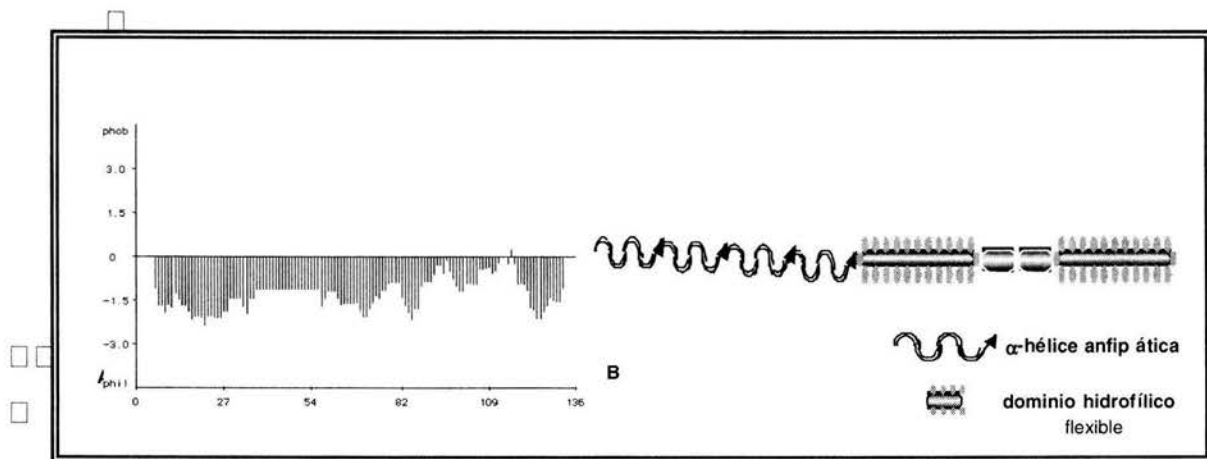


Fig. 4. A) Perfil de hidropatía representativo para una proteína LEA del grupo 3 donde se muestra su carácter hidrofílico. **B)** Estructura secundaria predicha para este tipo de proteínas, se predicen dominios repetidos en tándem de 11 aminoácidos con la secuencia consenso TAQAAKEKAGE, la cual podría formar α -hélices anfipáticas.

Proteínas LEA del Grupo 4 (familia D-113)

Son proteínas ricas en glicinas, treoninas y alaninas (11 – 20 %) con un tamaño variable de entre 88–175 aminoácidos. En su extremo C-terminal se predice una estructura flexible de longitud y secuencia variable, mientras que en su extremo N-terminal se propone la existencia de una secuencia característica conservada de 60 a 80 aminoácidos con una estructura ininterrumpida de α hélice (Fig. 5) (Dure *et al.*, 1993a).

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 3 miembros de este tipo de proteínas, AtLEA4-1, AtLEA4-2 y AtLEA4-5, cuyo transcrito se acumula por aplicación de ABA, sequía, NaCl, PEG y frío (Olvera, 2005). En cuanto a sus funciones, por homologías

con otras secuencias, se propone que podrían unirse a membranas o a proteínas para mantener su integridad estructural (Bray *et al.*, 2000).

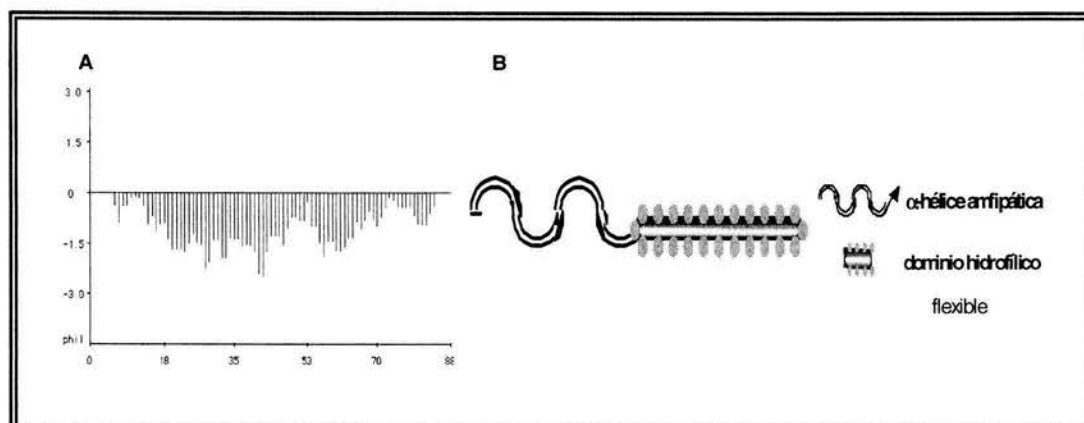


Fig. 5 A) Perfil hidropático representativo de una proteína LEA del grupo 4. B) Se predice que las proteínas de esta familia tienen una estructura secundaria flexible en el extremo C-terminal y una α -hélice en su extremo N-terminal.

Proteínas LEA del Grupo 5

Son clasificadas como proteínas atípicas ya que no pertenecen a ninguna de las familias antes descritas y no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a los otros grupos de proteínas LEA (Galau *et al.*, 1993). En sus perfiles de hidropatía presentan aminoácidos hidrofóbicos, de aquí que se les catalogue como atípicas y su posible función no ha sido determinada (Bray *et al.*, 2000). Dentro de esta familia se encuentran las proteínas de algodón LEA5 y LEA14 y otras proteínas relacionadas a éstas en otras especies. Son proteínas que pueden acumularse abundantemente en las hojas de plantas estresadas.

I.B.2.1 Proteínas LEA del grupo 6: PvLEA18

En frijol se ha encontrado una proteína de 82 aminoácidos con un peso molecular de 8.8 kDa con características similares a las de las proteínas LEA, a la que se ha denominado **PvLEA18** (No. de acceso U72764). Colmenero-Flores *et al* (1997) aislaron el cDNA de esta LEA de un banco de cDNA obtenido a partir del mRNA de plantas de frijol sometidas a tratamiento con ABA y deshidratación. El cDNA de la PvLEA18 codifica para una proteína altamente hidrofílica que presenta una estructura

en su mayoría de “random coil” (Fig. 6). El transcrito y la proteína PvLEA18 se acumulan en altos niveles durante la fase de desecación de la semilla de frijol y presentan una disminución a niveles no detectables durante la germinación; también se detectan en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y en respuesta a la aplicación de ABA en plantas bajo condiciones normales de irrigación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). En *Arabidopsis thaliana* se conocen tres proteínas que pertenecen a esta familia.

A pesar de que las proteínas LEA han sido asociadas con la deshidratación y el desarrollo de la semilla, la proteína PvLEA18 y su transcrito presentan una acumulación en las regiones de crecimiento de plántulas de frijol bien irrigadas, particularmente en las células de la región de elongación del hipocotilo (Colmenero-Flores *et al.*, 1999), en donde los potenciales hídrico y osmótico son más negativos debido a la acumulación de osmolitos (azúcares, hormonas, iones). Dicha acumulación es importante para el mantenimiento del crecimiento celular en las zonas apicales que se están desarrollando (Meyer and Boyer, 1972; Creelman *et al.*, 1990; Nonami and Boyer, 1993). Estos valores negativos están relacionados con la generación de un potencial hídrico que asegura un flujo de agua a lo largo del hipocotilo (Nonami and Boyer, 1983).

El patrón de expresión se asemeja al de algunos genes de acuaporina de plantas, los cuales se expresan principalmente en zonas de división y elongación celular, así como también en la epidermis y las porciones más jóvenes del xilema (Yamada *et al.*, 1995; Barrieu *et al.*, 1998; Chaumont *et al.*, 1998).

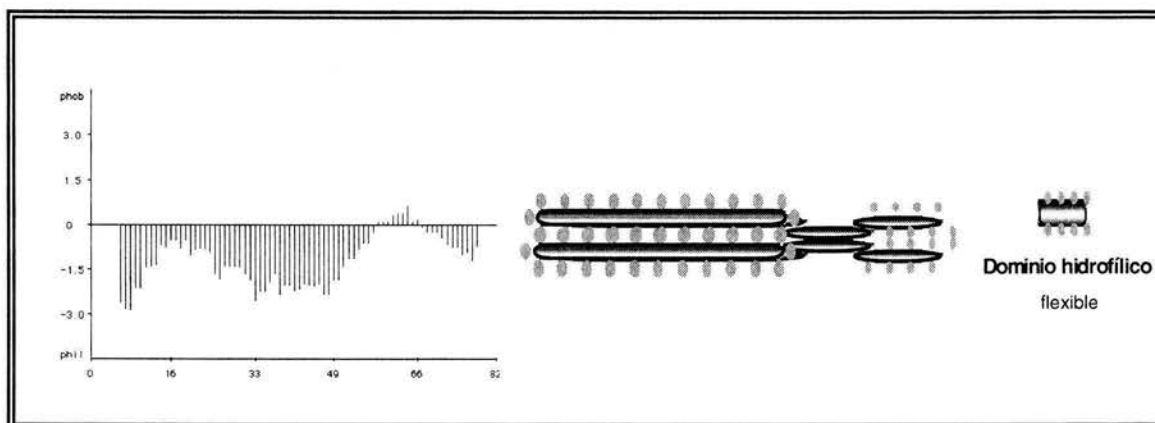


Fig. 6 A) Perfil hidropático representativo de una proteína LEA del grupo 6. B) La estructura secundaria predicha para las proteínas de este grupo es en su mayoría de “random coil”.

I.B.2.2 Localización celular de la proteína PvLEA18

Experimentos de localización inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra la PvLEA18 mostraron que esta proteína está presente en el núcleo y el citoplasma de diferentes tipos celulares a lo largo del hipocotilo, incluso en condiciones favorables de riego, aunque su mayor acumulación se ha detectado bajo condiciones de estrés hídrico (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). La mayor acumulación de la proteína se detectó en el cilindro vascular y tejidos epidermales, que son tejidos que pudieran presentar valores más negativos de potencial hídrico debido a que están más expuestos a los cambios ambientales (Nonami and Boyer, 1983; Davies, 1986). Los experimentos también mostraron que la proteína PvLEA18 se acumula en mayor cantidad en el núcleo respecto a su localización en el citoplasma (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

La PvLEA18 se detectó en células de tejido inmaduro de xilema y de raíz, en particular, células de protoxilema y tejidos meristemáticos de raíz. A pesar de que se desconoce el papel de esta proteína durante la xilogénesis, se piensa que su acumulación podría estar relacionada con el estado osmótico de este tipo celular, ya que se ha propuesto que se requieren de altas concentraciones de azúcares, auxinas y citocininas para inducir el desarrollo del xilema (Aloni, 1987).

Se ha visto que la proteína PvLEA18 es ubicua en plantas superiores ya que se han encontrado secuencias homólogas a la PvLEA18 en plantas gimnospermas y angiospermas. Dado que la PvLEA18 presenta una secuencia proteica distinta al resto de los grupos de proteínas LEA se ha clasificado como miembro de una nueva familia que constituye al grupo 6 (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). El hecho de que la proteína PvLEA18 pertenezca a una familia distinta de proteínas LEA, indica que podría presentar una función diferente a las conocidas, aunque su patrón de expresión y localización de la proteína durante condiciones de déficit hídrico es muy similar al de otros genes *LEA* reportados (Mundy and Chua, 1988; Close and Bray, 1993; Godoy *et al.*, 1994; Houde *et al.*, 1995; Ingram and Bartels, 1996; Niogret *et al.*, 1996), ninguna otra proteína LEA se había encontrado durante el establecimiento de la semilla y en crecimiento bajo condiciones óptimas de riego (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

I.B.2.3 Regulación de la expresión del gen *PvLEA18*

Moreno-Fonseca and Covarrubias analizaron el patrón de expresión del gen *PvLEA18* durante el desarrollo de la plántula en respuesta a déficit hídrico y tratamiento con ABA en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando fusiones de las regiones no traducidas del gen *PvLEA18* al gen reportero *GUS*. Se observó que la expresión de *PvLEA18* en respuesta a deshidratación es independiente de ABA y que la región 3' no traducida presenta un efecto incrementador de la expresión del gen durante el desarrollo y deshidratación, pero no en respuesta a ABA (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001).

Una ligera disminución en la expresión de *PvLEA18* se observa cuando las plantas transgénicas tratadas con fluoridona (un inhibidor de la biosíntesis de ABA) son sometidas a deshidratación, lo cual sugiere que la respuesta del gen *Pvlea18* por deshidratación es predominantemente independiente de ABA (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001). También se determinó que la región promotora de 2058 pb, usada en las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, permite la expresión del gen durante el desarrollo, en respuesta a deshidratación y en respuesta a ABA (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001).

I.B.3 Posibles funciones de las Proteínas LEA

A pesar de que se han descrito algunas posibles funciones para las proteínas LEA mediante su comparación con proteínas de función conocida, la evidencia experimental no ha permitido precisar sus funciones y papeles fisiológicos.

Algunas de las funciones propuestas para las proteínas LEA son el transporte de metales a través del floema durante la etapa de desarrollo, el secuestro de iones, la formación de medios de hidratación, la actividad molecular de chaperona y la protección de proteínas y membranas celulares de los efectos dañinos debido a la pérdida de agua (Dure, 1993; Close, 1996; Cuming, 1999; Bray, 1993, Danyluk *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 2002).

También se ha sugerido que su conformación no globular y el marcado número de aminoácidos polares dentro de su estructura, permitirían la formación de cubiertas de agua alrededor de las macromoléculas o bien, que en condiciones de mayor

deshidratación, estarían formando una capa de "solvatación" con sus grupos hidroxilo que interactuarían con los grupos de la superficie de otras proteínas, actuando como reemplazadores de agua en tejidos sujetos a estrés hídrico (McCubbin and Kay, 1985; Hoekstra *et al.*, 2001).

La estructura flexible que presentan las proteínas LEA podría estar relacionada con diversas funciones encontradas en proteínas no estructuradas que presentan zonas de reconocimiento molecular de proteínas, de ligandos o de ácidos nucleicos; como regiones que estabilizan y regulan complejos multiproteicos o bien como secuestradores de ligandos (Tompa, 2002).

Algunas proteínas LEA se comportan como crioprotectores en condiciones *in vitro* (Kazuoka and Oeda, 1994; Houde *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 2003), como en el caso de la proteína LEA de chícharo, PsLEAm, que actúa como protector estructural de enzimas de la matriz mitocondrial (Grelet *et al.*, 2004). La proteína LEA de maíz, DHN1, experimenta cambios conformacionales cuando se une específicamente a vesículas lipídicas, lo que sugiere un papel en la estabilización de membranas durante el estrés (Koag *et al.*, 2003). Recientemente se ha observado que una proteína LEA del grupo 2 se une a calcio mediante un mecanismo regulado por fosforilación (Alsheikh *et al.*, 2003). La proteína de trigo tipo LEA WCS19 es inducida en estrés por frío, se localiza en el estroma de cloroplasto y sus niveles de acumulación correlacionan con la tolerancia a la congelación que presentan diferentes cultivares de trigo (Ndong *et al.*, 2002). Danyluk *et al.* (1998) reportaron la acumulación de una dehidrina cerca de la membrana plasmática en condiciones de aclimatación a frío en trigo, sugiriendo que podría tener un papel estabilizador de la estructura de membrana.

Investigaciones recientes se han enfocado en estudiar el papel de estas proteínas en el citoplasma deshidratado, en donde estarían confiriendo estabilidad mediante la unión con algunos azúcares y la formación de redes de puentes de hidrógeno (Wolkers *et al.*, 2001). Se han realizado ensayos *in vitro* de pérdida de agua y se ha observado que las proteínas LEA tipo 2: DSP16 de *Craterostigma plantagineum* y ERD10 de *Arabidopsis thaliana* son capaces de proteger las actividades de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y malato deshidrogenasa (MDH) durante la pérdida parcial de agua (Reyes *et al.*, 2005).

La correlación entre los patrones de acumulación de transcritos y proteínas en condiciones de déficit hídrico y en particular, su acumulación en fases del desarrollo de la planta tolerantes a la deshidratación como durante la formación de semillas, sugieren un papel en la tolerancia a la desecación (Ingram and Bartels, 1996).

I.B.4 Ejemplos de plantas transgénicas que expresan proteínas LEA

Mediante el uso de plantas transgénicas se ha obtenido evidencia experimental que confirma el papel protector de las proteínas LEA en presencia del estrés hídrico, ya que permiten la expresión de los genes relacionados con sequía *in vivo* y por lo tanto, han sido un excelente sistema para poder determinar la función y la tolerancia conferida por las proteínas codificadas (Wu *et al.*, 1999).

En plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan la proteína WCS19 de trigo se observó un incremento significativo en la tolerancia al congelamiento de lo que se sugiere un papel crioprotector de la proteína (Ndong *et al.*, 2002). Por microscopía electrónica se ha observado que la proteína LEA tipo 2 de trigo, WCOR410, se acumula en la vecindad de la membrana plasmática de la célula en condiciones de congelamiento y déficit hídrico, lo que permite sugerir un papel crioprotector previniendo la desestabilización de la membrana plasmática que ocurre en condiciones de deshidratación (Danyluk *et al.*, 1998).

La sobreexpresión de la proteína de cebada HVA1, una proteína LEA del grupo 3, da resistencia a salinidad y sequía en plantas transgénicas de arroz (Xu *et al.*, 1996), mientras que al sobreexpresarla en trigo, incrementa la productividad en biomasa y eficiencia en el uso de agua bajo condiciones de estrés hídrico (Sivamani *et al.*, 2000).

De manera semejante, la sobreexpresión en levadura de una proteína del grupo 2 (LE4) y de una proteína del grupo 4 (LE25) de tomate, le confieren resistencia a altas concentraciones de NaCl y KCl respectivamente, mejorando la tolerancia al congelamiento (Imai *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000).

Se ha observado la presencia de la proteína LEA del grupo 1 (Em) de trigo en plántulas resistentes a desecación (Ried and Walker-Simmons, 1993) y se ha visto que cuando esta proteína se sobreexpresa en células de levadura confiere resistencia a concentraciones altas de NaCl, KCl y sorbitol (Swire-Clark and Marcotte, 1999). Otros

ejemplos de sobreexpresión de proteínas LEA incluye a las proteínas de trigo PMA80 y PMA1959, que confieren una mayor integridad a las membranas sometidas a estrés por alta salinidad, así como una acumulación de biomasa y una mejor recuperación después de estar expuestas a tratamientos de sequía y alta salinidad (Cheng *et al.*, 2002). La expresión de otros genes de respuesta a estrés como el de respuesta a desecación, *RD29A*, el factor de transcripción *COR66* y el de respuesta a frío *COR15A*, cuando son activados por la sobreexpresión de un factor de transcripción (CBF1/DREB1A, CBF3), correlacionan con la tolerancia a sequía, salinidad y congelamiento en *Arabidopsis* (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999, Gilmour *et al.*, 2000), así como con la tolerancia a sequía en trigo (Pellegrineschi *et al.*, 2004).

Los ejemplos de sobreexpresión de proteínas LEA y su papel de protección ante el estrés, sugieren que los productos de los genes *LEA* podrían actuar de manera conjunta para incrementar la tolerancia al déficit hídrico de las plantas.

I.C El transporte de proteínas al núcleo

Dado que la localización inmunohistoquímica indica que la PvLEA18 se localiza en el núcleo, es importante conocer como se da la comunicación entre el núcleo y el citoplasma. La compartimentalización es una característica de las células eucariontes que permite concentrar macromoléculas y metabolitos, así como separar los diferentes procesos celulares, creando microambientes específicos útiles para controlar el tráfico de macromoléculas y la regulación de la transducción de señales dentro de los compartimentos celulares (Merkle, 2001).

La división de las células eucariontes en compartimentos nuclear y citoplasmático presenta el problema de establecer como es que las macromoléculas son selectivamente transportadas entre ambos compartimentos (Stewart *et al.*, 2001).

La existencia de dos compartimentos implica que muchas macromoléculas deben ser intercambiadas rápida y constantemente entre el núcleo y el citoplasma, de manera que se garantice la regulación y los posteriores eventos celulares (Merkle, 2001). Por ejemplo, todas las proteínas nucleares que son sintetizadas en los ribosomas en el citoplasma deben ser importadas al núcleo, en tanto que los mRNAs, tRNAs y subunidades ribosomales deben ser exportadas del núcleo (Merkle, 2004).

El núcleo es el organelo característico de las células eucariontes que contiene a los cromosomas y es el sitio donde ocurren actividades metabólicas fundamentales como la replicación del DNA, la transcripción de genes, el procesamiento del RNA y la maduración y ensamblaje de las subunidades ribosomales (Stewart *et al.*, 2001). Se encuentra rodeado por la envoltura nuclear la cual está formada por dos membranas: la externa y la interna, las cuales presentan distinta composición proteica. La envoltura nuclear es atravesada por miles de complejos de poros nucleares y es continua con la membrana del retículo endoplasmático (Stewart *et al.*, 2001).

Mediante estudios bioquímicos y genéticos se ha mostrado que el mecanismo de transporte nucleocitoplasmático se ha conservado a lo largo de la evolución (Görllich and Mattaj, 1996; Powers and Forbes, 1994; Koepp and Silver, 1996), desde levaduras hasta plantas y mamíferos (Merkle, 2001).

I.C.1 Complejo del Poro Nuclear (NPC)

La comunicación entre el núcleo y el citoplasma es un proceso selectivo bidireccional que ocurre a través de una estructura proteica llamada complejo del poro nuclear o NPC (**Nuclear Pore Complex**), la cual se encuentra embebida en la envoltura nuclear. El NPC media el transporte entre el citoplasma y el núcleo (Feldherr and Akin, 1990) a través de la formación de canales de ~9 nm de diámetro (Stewart *et al.*, 2001).

Cada NPC consta de una estructura octagonal de un anillo citoplásmico (dirigido hacia el citoplasma) y un anillo nuclear (dirigido hacia el interior del núcleo), los cuales están compuestos de ocho fibrillas y una estructura semejante a un cesto que se mantiene unida al anillo nuclear.

El NPC de eucariontes superiores tiene un peso de 125MDa y 120nm de diámetro en los anillos citoplásmico y nuclear (Stewart *et al.*, 2001, Reichelt *et al.*, 1990; Stoffler *et al.*, 1999). Se estima que están compuestos de múltiples copias de proteínas llamadas nucleoporinas (Nups) con un número aproximado de 500-1000 moléculas de estas proteínas por cada NPC (Fig.7) (Peters, 2005; Rout and Blobel, 1993; Yang *et al.*, 1998), que actúan no sólo como componentes estructurales del NPC, sino también como sitios de anclaje e interacción para los factores que transportan al núcleo (Görllich and Kutay, 1999).

Cerca de un tercio de las nucleoporinas contienen dominios repetidos de aminoácidos como fenilalanina y glicina: FG, FXFG ó GLFG los cuales interactúan con los receptores del transporte nuclear permitiendo su translocación al interior del núcleo (Peters, 2005).

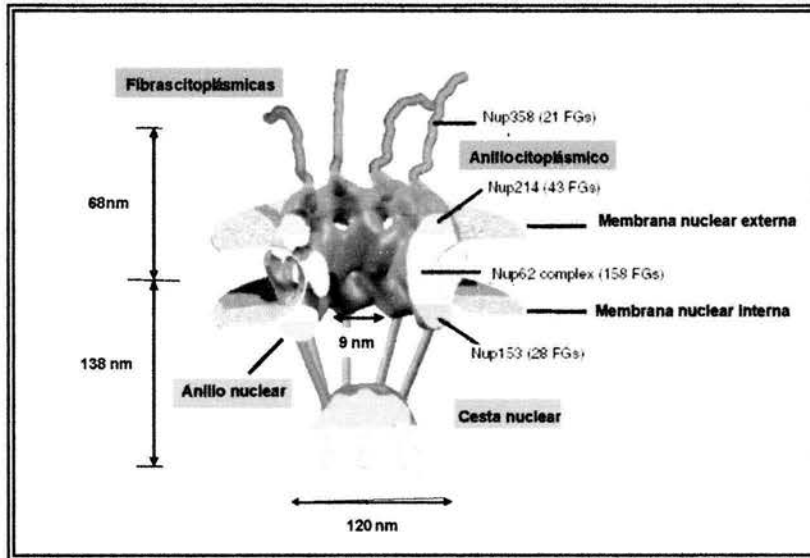


Fig. 7 Estructura del complejo del poro nuclear (NPC). Se ilustran las estructuras que conforman el NPC, así como algunas de sus proteínas ricas en dominios de fenilalanina y glicina (FG) los cuales interactúan con los receptores del transporte nuclear (modificado de Peters, 2005).

I.C.2 Mecanismos de importación nuclear

Los receptores de transporte nuclear son miembros de la superfamilia de carioferinas- β (también conocida como importinas y exportinas de acuerdo a la dirección en la cual los receptores transporten la proteína) encargadas del transporte de proteínas y ribonucleoproteínas entre el núcleo y citoplasma (Mosammaparast and Pemberton, 2004). La interacción de la proteína que es transportada al núcleo con las importinas está mediada por GTPasas Ran de la familia Ras (Görlich and Kutay, 1999; Bayliss *et al.*, 2000; Melchior and Gerace, 1998).

La GTPasa pequeña, Ran, actúa como un switch molecular que modula las interacciones carioferinas-proteína blanco, y con ello provee direccionalidad al transporte nucleocitoplásmico (Weis, 2002). Ran es una proteína soluble que se localiza

en el núcleo y citoplasma de células vegetales y de mamíferos intercambiándose continuamente entre ambos compartimentos permitiendo la liberación de la proteína transportada (Merkle, 2004).

Un ciclo de importación requiere que las importinas se unan a su proteína blanco en el citoplasma, la liberen en el núcleo y regresen al citoplasma para iniciar otro ciclo de importación (Chi *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996; Izaurre *et al.*, 1997; Jäkel and Görlich, 1998; Rexah and Blobel, 1995, Siomi *et al.*, 1997; Hieda *et al.*, 1999). Las exportinas operan en sentido contrario.

Todas las carioferinas interaccionan de manera transitoria con las nucleoporinas conforme se mueven a través del NPC por medio de interacciones con dominios ricos en fenilalanina y glicina de las nucleoporinas (Peters, 2005).

Existen dos mecanismos básicos de transporte de proteínas al núcleo: difusión pasiva y transporte mediado por señales de localización nuclear (NLS) que son secuencias cortas ricas en aminoácidos básicos (Bednenko *et al.*, 2003).

El **transporte por difusión** permite el paso de pequeñas moléculas como metabolitos, agua, iones y proteínas de bajo peso molecular (pesos moleculares menores a 30kDa) (Fig. 8). La difusión pasiva puede ser ineficiente conforme aumenta el tamaño de la molécula, es extremadamente lenta para el caso de la albúmina de suero bovino (~7nm de diámetro, 68kDa), menos lenta para la ovalbúmina (~6nm de diámetro, 46kDa) y razonablemente rápida para proteínas de <20-30kDa.

Las proteínas "pequeñas", menores a 30kDa y ricas en aminoácidos básicos pueden difundir fácilmente a través del NPC, mientras que las moléculas de 60kDa presentan una difusión ineficiente, su translocación debe ser facilitada y por lo tanto selectiva (Gasiorowski and Dean, 2003; Rabut and Ellenberg, 2001).

Contrastando con el transporte por difusión de moléculas pequeñas, las histonas y los tRNAs son proteínas menores a 20-30kDa que normalmente atraviesan el NPC mediados por transporte activo y por señales de localización nuclear (Goldfarb and Breeuwer, 1990; Jäkel *et al.*, 1999; Gasiorowski and Dean, 2003; Arts *et al.*, 1998; Kutay *et al.*, 1998; Zasloff, 1983).

El transporte mediado por señales de localización nuclear, está mediado por miembros de la familia de transportadores de moléculas importina. El primer paso en la importación de una proteína que contiene una señal NLS clásica es la unión específica con el receptor citoplasmático de la NLS, la importina α , la cual reconoce la secuencia básica PKKKRKV y actúa como una molécula adaptadora uniendo a la NLS de la proteína que será importada con la proteína receptora importina β la cual se une al NPC y media la translocación a través del poro nuclear.

Estas señales de localización no se eliminan una vez que han sido importadas al núcleo, como sucede en el transporte a cloroplasto, mitocondria y vacuola además de que no dependen de una posición determinada y puede haber un número variado de ellas dentro de una secuencia proteica (Keegstra, 1989; Hartl and Neupert, 1990; Chrispeels and Raihkel, 1992; Hicks and Raihkel, 1993, 1995).

El transporte mediado por NLS involucra su interacción con los receptores nucleocitoplasmáticos de la familia de las importinas que las translocan a través del NPC (Fig. 8) (Bednenko *et al.*, 2003).

El NPC puede transportar selectivamente partículas hasta de 26-28nm de diámetro por el mecanismo mediado por señales de localización nuclear, como las subunidades de la DNA y RNA polimerasa (100kDa y 200kDa), las subunidades ribosomales (1.4MDa y 2.8MDa) y algunas partículas virales (Pantè and Aebi, 1995; Davis, 1995; Whittaker and Helenius, 1998).

Pantè and Kann caracterizaron estructuralmente partículas de oro recubiertas con complejos de receptores de transporte-proteína transportada y las utilizaron en ensayos de importación para determinar el diámetro funcional del NPC, encontraron que las partículas de oro recubiertas con el complejo nucleoplasmina-importina α , con un tamaño de 165kDa y un diámetro de ~39nm, son transportadas a través del NPC (Pantè and Kann, 2002).

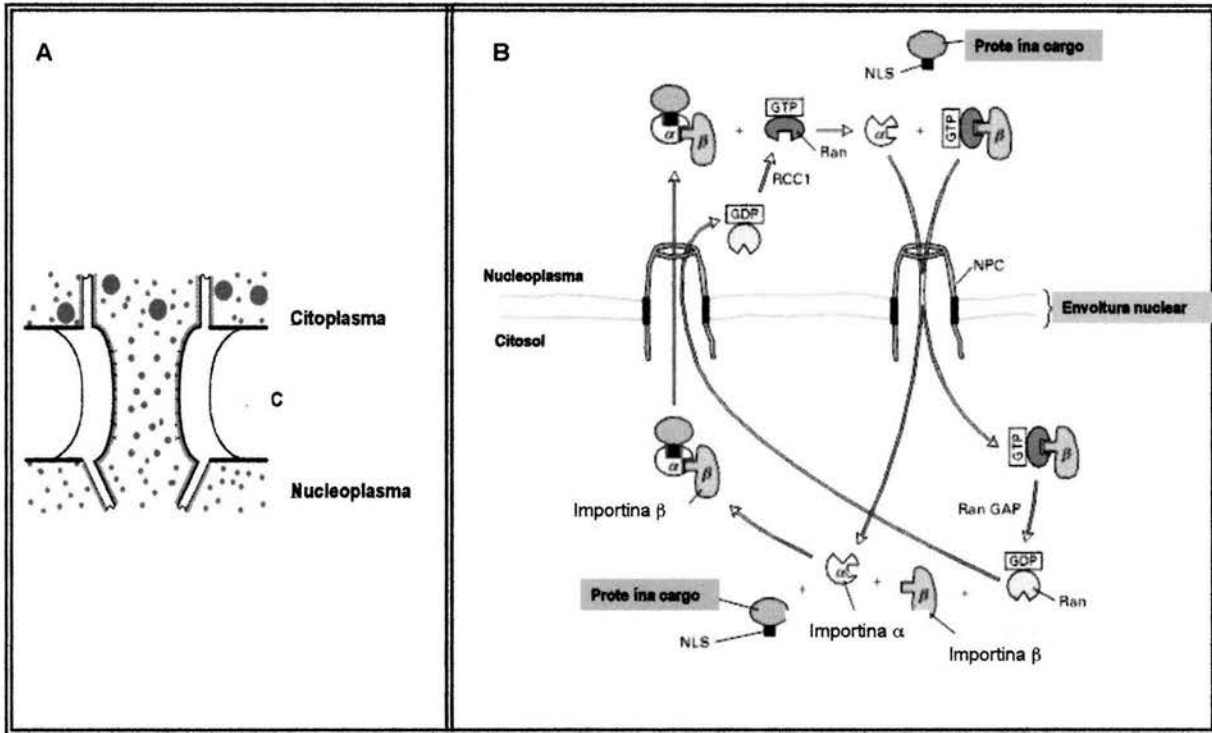


Fig. 8 Mecanismos básicos de transporte de proteínas al núcleo. A) Difusión pasiva, este transporte permite el paso de moléculas pequeñas como metabolitos, agua, iones y proteínas de bajo peso molecular (pesos moleculares menores a 30 kDa); **B) Transporte mediado por señales de localización nuclear (NLS)** donde participan secuencias cortas ricas en aminoácidos básicos que permiten el paso a través del NPC, este tipo de transporte involucra la interacción de las NLS de las proteínas o RNAs con los receptores nucleocitoplasmáticos de la familia de las importinas que las translocan a través del NPC (Modificado de Merkle, 2001).

Las NLS identificadas hasta ahora se clasifican en dos categorías: 1) NLS del tipo del antígeno T del virus SV40 que posee la secuencia de aminoácidos básicos **PKKKRKV** (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford and Butel, 1984); y que se conoce como NLS clásica, 2) NLS del tipo bipartita, que se caracterizan por poseer la secuencia **KRPAAIKKAGQAKKKK** de la proteína nucleoplasmina de *Xenopus laevis*, que consiste de 2-3 aminoácidos cargados separados por un grupo espaciador de 5 a 20 aminoácidos (Robbins *et al.*, 1991). Se ha sugerido que la señal bipartita podría ser considerada una NLS canónica (Dingwall and Laskey, 1991).

Las proteínas que poseen tanto la NLS bipartita de nucleoplasmina como la NLS tipo SV40 utilizan el mismo tipo de maquinaria de importación mediado por la importina α / importina β (Gasiorowski and Dean, 2003). Para ambos tipos de NLS se han encontrado variantes en muchas proteínas nucleares (Gasiorowski and Dean, 2003).

Dentro de los ejemplos de proteínas con NLS en plantas se encuentran el factor de transcripción R de maíz que posee tres tipos de NLS (entre ellas una secuencia tipo SV40 y tres residuos de arginina continuos) necesarias para una localización nuclear en ensayos transitorios en células de epidermis de cebolla (Shieh *et al.*, 1993) y el factor de transcripción de maíz, Opaco 2 (OP2) que consiste de una secuencia bipartita y cuya localización se ha observado en el núcleo de maíz y células de tabaco transformados transitoriamente (Varagona *et al.*, 1992). La proteína de choque térmico Hsp70 (Imamoto *et al.*, 1992) y componentes proteicos involucrados en el procesamiento de RNA también son transportados al núcleo mediante NLS (Shi and Thomas, 1992).

Las proteínas ribosomales que participan en el procesamiento del mRNA, como la snRNP U2, son transportadas al núcleo por NLS y de manera semejante ocurre con el transporte de la histona H1 (Jäkel *et al.*, 1999). Se han identificado NLS tipo bipartita en la proteína N1a (Nuclear Insertion) del virus de papa, este mismo tipo de señales se encontraron en las proteínas de *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 y VirE2 (Howard *et al.*, 1992; Citovsky *et al.*, 1994; Carrington *et al.*, 1991).

Además de estas secuencias, muchas otras NLS se han identificado, pero los mecanismos de transporte de ellas no se han elucidado (Gasiorowski and Dean, 2003).

Por ejemplo, se ha identificado la secuencia M9 en la proteína heterogénea nuclear RNP (hnRNP) A1, **GNYNNDSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYPAKPR NQGGY**, la cual no es una secuencia rica en aminoácidos básicos, pero funciona tanto como señal de importación, como de exportación nuclear (Siomi and Dreyfuss, 1995).

Existen también proteínas que son importadas al núcleo que no poseen ni dominios de unión a importinas α , ni señales de localización nuclear pero que son reconocidas por miembros de la familia de las importinas β (Görlich and Kutay, 1999), entre ellas se encuentran las proteínas virales HIV Rev (Henderson and Percipalle, 1997), HIV Tat (Truant and Cullen, 1999), las proteínas ribosomales L23a, S7 y L5

(Jäkel and Görlich, 1998) y las proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea (Lam *et al.*, 1999).

Algunas moléculas transductoras de señales como el factor nuclear de células T activadas (NF-AT), se transportan al núcleo mediante asociaciones directas con las proteínas del NPC, mientras que los transductores de señales como la β -catenina, SMAD2, SMAD3, SMAD4 y las cinasas ERK1 y ERK2, son transportadas al núcleo por un mecanismo independiente de importinas, esto se debe a su habilidad para interactuar directamente con las proteínas del NPC sin la necesidad de las importinas como proteínas transportadoras (Xu and Massague, 2004).

En la Tabla 1 se muestran diversas secuencias que actúan como NLS y los receptores que participan en el mecanismo de importación de proteínas al núcleo.

El segundo grupo de receptores, estructuralmente distinto a las carioferinas- β , lo forman las familia de los factores de exportación nuclear (NXFs) que participan en la exportación de muchos mRNAs a través de señales de exportación nuclear (NES) que son secuencias ricas en leucinas (Bednenko *et al.*, 2003).

Además de ser la estructura a través de la cual ocurre la importación de proteínas al núcleo, el NPC podría tener un papel en la regulación de este transporte, ya que la especificidad del importación y exportación de proteínas podría depender de una alteración en la expresión de las nucleoporinas, lo que permitiría tener diferentes interacciones entre el NPC y las carioferinas (Gasiorowski and Dean, 2003). Estudios *in vitro* han revelado que la fosforilación de las nucleoporinas regula la importación de proteínas pero no la exportación de las mismas (Kehlenbach and Gerace, 2000).

El transporte nucleocitoplasmático puede regularse de diversas maneras, tales como el enmascaramiento de las señales NLS y NES por modificaciones postraduccionales en las proteínas que serán transportadas (fosforilación, defosforilación, acetilación y ubiquitinación de residuos específicos) (Gasiorowski and Dean, 2003), el enmascaramiento de las NLS y NES puede ocurrir también debido a cambios conformacionales de la proteína (enmascaramiento intramolecular) o por interacciones con otra proteína (enmascaramiento intermolecular) (Merkle, 2004). El secuestro de la proteína que será transportada también es una manera de regular el

transporte al núcleo, así como la modificación estructural de las carioferinas y la modulación de la función del NPC (Mosammaparast and Pemberton, 2004).

Un ejemplo en la regulación del transporte nucleocitoplasmático se encuentra en el factor de transcripción NF- κ B de mamíferos (controla la respuesta inmune e inflamatoria, la diferenciación celular y la apoptosis) el cual se encuentra en un estado inactivo cuando está unido con la proteína inhibidora I κ B en el citoplasma, la unión con esta proteína enmascara la NLS del factor NF- κ B y evita que sea transportado al núcleo (Fagerlund *et al.*, 2005).

La importación al núcleo de algunos factores de transcripción está regulado por fosforilación más que por la asociación con proteínas inhibidoras, por ejemplo, el factor de transcripción SW15 de levadura se importa al núcleo sólo en etapas específicas del ciclo celular (G₁), ya que SW15 es retenido en el citoplasma como resultado de la fosforilación de residuos de serina adyacentes a la secuencia de localización nuclear. La defosforilación de estos sitios activa a SW15 en una etapa específica del ciclo celular y permite su translocación al núcleo (Moll *et al.*, 1991).

Tabla 1. Secuencias de localización nuclear (NLS) y receptores que participan en el mecanismo de importación de algunas proteínas y RNAs al núcleo. Se muestran diferentes tipos de secuencias que actúan como NLS y las proteínas que participan en su transporte.

NLS	FUNCIÓN	SECUENCIA	RECEPTOR DE TRANSPORTE	REFERENCIAS
Proteínas con NLS clásica Monopartita	Diversas funciones	Monopartita PKKKRKV	Complejo de importina alfa/ importina beta	Kalderon <i>et al.</i> ,1984 Shieh <i>et al.</i> ,1993
Proteínas con NLS bipartita	Diversas funciones	Bipartita KRPAAIKKAGQAKKKK y señales ricas en lisina	Complejo de importina alfa/ importina beta	Robbins <i>et al.</i> ,1991 Varagona <i>et al.</i> ,1992
U snRNA	"Splicing"	Cap m3G	Complejo Snurportina-importina beta	Palacios <i>et al.</i> , 1996 Huber <i>et al.</i> , 1998
Subunidad de 70 Kda de la proteína A de replicación	Replicación	No definida	Complejo RIP alfa/Imp beta	Jullien <i>et al.</i> ,1999
Histona H1	Estructura y función de cromosomas	Dominio rico en aa básicos	Complejo Imp7/Imp beta	Jakel <i>et al.</i> , 1999
HIV-Rev	Factores de exporte de	RQARRNRRRRWR	Importina beta	Palmeri and Malim,1999 Truant and Cullen, 1999
HTLV-1-Rex	RNA viral			
HIV-1 Tat	Factor viral de transcripción	Señales ricas en arginina	Importina beta	Palmeri and Malim,1999
Proteínas ribosomales	Traducción	Dominios ricos en arginina	Kap123p/Yrb4p Kap121p/Pse1p/Imp5 Importina beta, Imp7, TRN1	Rout <i>et al.</i> ,1999 Schlenstedt <i>et al.</i> , 1997 Jakel and Gorlich, 1998
Ciclina B1	Ciclo celular	aa entre 121-173 aa entre 1-161	Importina beta El importe <i>in vitro</i> no requiere factores solubles	Moore <i>et al.</i> , 1999 Haging <i>et al.</i> , 1999
rRNA 5S	Traducción	Proteína ribosomal L5	Posiblemente Imp beta	Murdoch and Allison, 1996
Proteínas SR	"Splicing"	Dominios SR	TRN-SR	Cáceres <i>et al.</i> , 1997
Lhp1p [Sc]	Biogénesis de los transcritos de la RNA pol III	Dominio de unión a RNA de 133 aa	Sxm1p/Kap108	Rosemblum <i>et al.</i> , 1998
Np13p [Sc]	Proteína hnRNP de levadura	Dominio de unión a RNA de 120 aa	Mtr10p/Kap111p	Pemberton <i>et al.</i> ,1997
Hog1p [Sc]	MAP cinasa	no caracterizada	Nmd5d/Kap119p	Ferrigno <i>et al.</i> ,1998
TFIIS [Sc]	Factor de elongación de la transcripción de la RNA pol II	no caracterizada		Albertini <i>et al.</i> ,1998
TBP [Sc]	Transcripción	no caracterizada	Kap114p	Pemberton <i>et al.</i> ,1999
TFIIA [Sc]	Transcripción	no caracterizada	Pdr6p/Kap122p [Sc]	Titov <i>et al.</i> ,1999
Beta-catenina	Regulación de la transcripción en la transducción de señales	no delimitada	El importe <i>in vitro</i> no requiere factores solubles	Fagotto <i>et al.</i> , 1998 Yokoya <i>et al.</i> , 1999

[Sc], *Saccharomyces cerevisiae*

I.D Proteínas de fusión

Para visualizar la localización y expresión de las proteínas dentro de la células usualmente son marcadas con proteínas reporteras, etiquetas antigénicas o detectadas por anticuerpos específicos. Las enzimas utilizadas como proteínas reporteras: β -glucuronidasa (GUS; Jefferson, 1987; Kertbundit *et al.*, 1991), no reflejan la localización subcelular de la proteína a alta resolución o en tiempo real debido a que son detectadas indirectamente a través de sus productos cromogénicos de reacción (Taylor, 1997).

Por el contrario, la proteína verde fluorescente no presenta estas limitaciones (Chalfie *et al.*, 1994) ya que debido a su autofluorescencia y a sus variantes espectrales es una herramienta sensible y conveniente para detectar moléculas en tiempo real en levaduras, animales y plantas (Cubbit *et al.*, 1995; Griesbeck *et al.*, 2001; Niedenthal *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 2003; Hanson and Kohler, 2001).

I.D.1 La Proteína Verde Fluorescente (GFP)

La proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* se ha convertido en un marcador muy efectivo como un reportero en sistemas heterólogos como *Xenopus* (Martínez-Torres and Miledi, 2001) *E.coli*, *Drosophila*, levadura (Burd, 2000) y mamíferos (Kanda *et al.*, 1998), así como en el monitoreo de la localización y transporte de proteínas en la célula (Stewart, 2001; Chalfie *et al.*, 1994; Wang and Hazelrigg, 1994; Olson *et al.*, 1995). GFP es una proteína de 238 aminoácidos con un peso molecular de 27kDa, que tiene la propiedad de emitir fluorescencia verde ($\lambda_{\text{max}}=509\text{nm}$), bajo la excitación de luz ultravioleta ($\lambda_{\text{max}}=395\text{nm}$) o luz azul ($\lambda_{\text{max}}=475\text{nm}$), existen además variantes naturales de la proteína (Heim *et al.*, 1994; Chalfie, 1995); la fluorescencia de GFP es el resultado de un cromóforo interno formado por la ciclización catalítica post-traducciona l de tres aminoácidos (Ser 65-Tyr 66-Gly 67) (Prasher *et al.*, 1992, Heim *et al.*, 1994). La GFP tiene como ventajas una alta estabilidad térmica y resistencia a detergentes, pH alcalino, solventes orgánicos y proteasas, además de que no requiere sustratos exógenos o cofactores para su fluorescencia, lo que permite monitorear su expresión en células vivas, lo que contrasta con la necesidad de

sustratos y cofactores para dar señales positivas como en el caso de β -glucuronidasa (*GUS*) (Jefferson, 1987) y luciferasa (*LUC*) (Ow *et al.*, 1986).

GFP no presenta ningún tipo de toxicidad en plantas (Stewart, 2001) y su característica para emitir fluorescencia verde se preserva aún cuando se fusione una proteína en su extremo amino o carboxilo terminal (Wang and Hazelrigg, 1994). Dentro de las limitaciones del uso de GFP se encuentra el requerimiento de oxígeno y ATP, la lenta formación post-traducciona del cromóforo y la dificultad de distinguir su fluorescencia del fondo fluorescente cuando no tiene una localización densa o es altamente expresada (Zimmer, 2002). El uso de la proteína verde fluorescente como un reportero en las plantas está ampliamente documentado (Leffel *et al.*, 1997; Haseloff and Siemering, 1998) visualizándose en gran cantidad de tejidos como protoplastos de naranja, *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, trigo, manzana, tabaco, epidermis de cebolla y tejidos de coníferas, así como en núcleos celulares de diversas especies vegetales como caña de azúcar, lechuga, maíz y tabaco (Niedz *et al.*, 1995; Sheen *et al.*, 1995; Haseloff *et al.*, 1997; Davis and Vierstra, 1998; Hu and Cheng, 1995; van der Geest and Petolino, 1998; Vain *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 1996; Maximova *et al.*, 1998; Chiu *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997; Elliot *et al.*, 1999).

La fusión del gen de la proteína LEA AtrAB28 con GFP permitió identificar su localización en el núcleo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de células transformadas de epidermis de cebolla (Borrel *et al.*, 2002). Mediante fusiones de la región codificante de GFP con *SPY* (*SPINDLY*, un represor de la vía de transducción de giberelinas), se logró determinar su localización celular dentro del núcleo en células de plantas (Swain *et al.*, 2002). Las fusiones de fotorreceptores con GFP han permitido determinar su translocación de citoplasma a núcleo en respuesta a la estimulación por luz, determinando su localización nuclear (Kircher *et al.*, 2002).

Sandepp *et al* identificaron en mamíferos una NLS en la proteína colina acetiltransferasa de 82kDa, la cual habían fusionado a la GFP y determinaron su localización en el núcleo (Sandepp *et al.*, 2003).

La detección basada en GFP tiene la ventaja de que las células pueden ser visualizadas *in vivo*, lo que permite una imagen en tiempo real y evita la formación de artefactos, mejor aún, muchos tejidos vegetales son fácilmente transformables y

presentan poca autofluorescencia que pudiera interferir con la fluorescencia de GFP (la autofluorescencia de la clorofila es roja), lo que permite detectar la fluorescencia de GFP con una alta sensibilidad ante la excitación con luz UV (Haseloff *et al.*, 1997). Las imágenes obtenidas a partir de la fusión de proteínas con GFP pueden ser interpretadas de manera más confiable que las que son obtenidas de tejidos teñidos por métodos inmunohistoquímicos, ya que no existe la incertidumbre de una penetración parcial o incompleta de los inmunoreactivos dentro del tejido (Ehrhardt, 2003).

El primer paso en la técnica que involucra el uso de GFP consiste en fusionar la región codificante de la GFP con el gen que codifica para la proteína de interés (Gerdes and Kaether, 1996), la GFP puede fusionarse al extremo amino o carboxilo de manera que no afecte el funcionamiento normal de la proteína de interés (Gerdes and Kaether, 1996). A pesar del gran tamaño de GFP (238 aa comparado con los 9 y 10 aa de los epítomos HA y myc respectivamente), se ha visto que las proteínas fusionadas con GFP son funcionales (Cubbit *et al.*, 1995). Más aún, cuando la GFP se ha sintetizado, la proteína fluoresce verde cuando se expone a luz UV (Kain *et al.*, 1995).

La proteína verde fluorescente permite monitorear la localización de una proteína de interés en la célula huésped *in vivo*, *in situ* y en tiempo real, de manera que es fácil determinar cuando la proteína viaja a través de la célula (Hazelrigg *et al.*, 1998).

I.D.2 Marcado de epítopo

Otra manera de marcar proteínas es mediante el uso de epítomos, moléculas antigénicas que son inmunoreactivas a un anticuerpo conocido. Se trata de una herramienta muy útil en la detección inmunológica y localización celular de proteínas *in vivo*, así como en la purificación, la manipulación y la detección de proteínas recombinantes (Jarvik and Telmer, 1998). La fusión de proteínas involucra la inserción en fase con el gen de interés de una secuencia corta específica que codifica para un epítopo conocido, posteriormente se expresa el gen fusionado en una célula huésped adecuada y de este modo se puede purificar la proteína recombinante mediante el uso de anticuerpos contra el epítopo (Bannon *et al.*, 2001).

Una proteína marcada con un epítipo es un tipo especial de proteína de fusión en la cual los aminoácidos agregados que oscilan entre 6-14 residuos, en principio, no alterarían la actividad biológica de la proteína y permitiría que se mantuviera su estructura normal y función (Jarvik and Telmer, 1998). Las características de un epítipo son el tamaño pequeño y el reconocimiento específico por un anticuerpo. Existe una amplia variedad de epítipos que son utilizados: c-myc, FLAG, Hemaglutinina (HA), Polihistidina (His6), proteína C de humano, proteína de la cápside del fago T7, y Virus de estomatitis vesicular (VSV-G), entre otros (Jarvik and Telmer, 1998). Algunas de sus características se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los epítipos más comunes. Se presenta el nombre y origen del epítipo y la secuencia reconocida por anticuerpos específicos (modificado de Jarvik and Telmer, 1998).

Nombre epítipo	No. de aa	Origen	Secuencia de aa
alfa tubulina	3	Secuencia C-terminal de proteína de levadura	EEF
B-tag	6	Proteína VP7 del virus "blue tongue"	QYPALT
E-tag	13		GAPVPYDPLEPR
c-myc	10	Péptido sintético proteína del gen c-myc de humano	EQKLISEEDL
FLAG	8	Péptido sintético	DYKDDDDK
HA	9	Péptido de la proteína hemaglutinina de influenza humana	YPYDVPDYA
His6 o His10	6 ó 10	Polihistidina, una ligandos metálicos por cromatografía de afinidad	His ₆₋₁₀
HSV	11	Péptido de la glicoproteína del virus simple del herpes	QPELAPEDPED
Pk-tag	9 ó 14	Proteínas P/V del paramixovirus SV5	GLPIPNLLGLDST
Proteína C	12		EDQVDPRLIDGK
T7	11	Proteína de la cápside del fago T7	MASMTGGQQMG
VSV-G	11	Glicoproteína del virus de estomatitis vesicular	YTDIEMNRLGK

Los anticuerpos reconocen estos epítipos ya sea que se encuentren en la secuencia interna de la proteína o en sus extremos, sin embargo, en muchas ocasiones el reconocimiento depende de una localización específica del epítipo (Jarvik and Telmer, 1998). La mayoría de los epítipos poseen aminoácidos cargados, lo que podría ser un inconveniente para la proteína blanco, ya que un epítipo con la carga inapropiada o con demasiada carga causaría problemas en la estabilidad de la proteína (Jarvik and Telmer, 1998).

Las proteínas que han sido fusionadas a un epítipo son detectadas utilizando el mismo tipo de métodos que se emplean con los anticuerpos específicos para proteínas tales como: Western blot, inmunoprecipitación, ELISAs, inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica, entre otras (Harlow and Lane, 1988). Dentro de las

ventajas de esta técnica destaca el hecho de que la fusión del epítipo permite el estudio de la función original de esta proteína en el interior de la célula; permite obtener información acerca de proteínas difíciles de purificar o demasiado parecidas a otras proteínas para poder ser distinguidas *in vivo*; es una técnica rápida y fácil donde pueden utilizarse epítipos múltiples si es necesario, además el uso de anticuerpos específicos del epítipo evita que haya reacciones cruzadas; otra ventaja importante es que tanto las proteínas como los complejos proteicos formados pueden ser purificados (Jarvik and Telmer, 1998). El marcado de epítipo resuelve el problema de la redundancia genética, al permitir un estudio separado de los miembros de una familia de proteínas relacionados inmunológicamente (Ferrando *et al.*, 2000).

Una característica importante del marcado de proteínas con epítipos es que se trata de una forma específica para purificar a la proteína de interés; tanto la cromatografía de inmunoafinidad como la inmunoprecipitación son los dos métodos de purificación más empleados (Brown *et al.*, 1995; Koblan *et al.*, 1995; Laize *et al.*, 1997; Nillson *et al.*, 1997; Pathak and Imperiali, 1997; Connolly *et al.*, 1994; Dear *et al.*, 1997; Henis *et al.*, 1994; Le Maout *et al.*, 1997; Mende *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.* 1996; TerBush and Novick, 1995). Por inmunoprecipitación se han purificado proteínas como la chaperona BIP (immunoglobulin heavy-chain binding protein) del retículo endoplásmico lumenal (Murray *et al.*, 1995), el factor de inicio de la transcripción específico de la RNA Pol I, RRN5 (Keys *et al.*, 1996), factores asociados a la proteína de unión a la caja TATA (TAF) (Poon *et al.*, 1995) y la nucleoporina RAT2p (Heath *et al.*, 1995), entre otras.

Igualmente, se ha monitoreado el tráfico a través del Aparato de Golgi de la sintasa GD3 (Martina *et al.*, 1998), de PKC ϵ (Lehel *et al.*, 1996) y la fragmentación del Golgi (Yang and Storrie, 1999), así como los movimientos de muchas proteínas a través de los compartimentos celulares.

El uso del marcado de epítipo ha permitido determinar la localización subcelular de las bombas de protones AHA3 y AHA2 en *Arabidopsis* (De Witt *et al.*, 1996; De Witt and Sussman, 1995) y del gen de resistencia *Cf-9* en plantas de tabaco transgénico (Piedras *et al.*, 2000); monitorear la estabilidad de los productos de los genes de resistencia *RPM1* (Boyes *et al.*, 1998), purificar a la subunidad AtSKP1/ASK1 de los

complejos ligasa de ubiquitina implicados en el control de la señalización por auxina, en la determinación de la identidad de los órganos florales y en la meiosis en *Arabidopsis* (Gray *et al.*, 1999; Samach *et al.*, 1999; Yang and Storrie, 1999; Zhao *et al.*, 1999). Con esta técnica también se demostró la formación de complejos *in vivo* de AKIN β 2, un ortólogo de las subunidades β de las cinasas Snf1/AMPK, con las subunidades catalíticas de las cinasas AKIN10 y AKIN11 en *Arabidopsis* (Ferrando *et al.*, 2001).

En *C.elegans* se detectó el colágeno tipo IV en las membranas basales faríngeas, intestinales y de las gónadas mediante el marcado con epítipo del gen *emb-9* (Graham *et al.*, 1997); en *Drosophila* se determinó la función de los dominios individuales de la proteína DLG al expresarla fusionada con el epítipo FLAG en animales silvestres y en mutantes nulas (Hough *et al.*, 1997).

El análisis de los animales y plantas transgénicos que expresan proteínas fusionadas a epítopos permite conocer cuáles son los tejidos y los tipos celulares en los que se expresa la proteína de interés, así como también son un indicativo de dónde se localiza la proteína dentro de la célula (Jarvik and Telmer, 1998).

Experimentos de localización inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra la PvLEA18 mostraron que esta proteína se encuentra en el núcleo y el citoplasma de diferentes tipos celulares en el hipocotilo, en condiciones favorables de riego y con mayor acumulación bajo condiciones de estrés hídrico. Los experimentos también mostraron que la proteína PvLEA18 se acumula en mayor cantidad en el núcleo respecto a su localización en el citoplasma (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

Para profundizar en la caracterización de la PvLEA18 y en el análisis de su posible función se propone la siguiente:

HIPÓTESIS

La localización subcelular de la proteína PvLEA18 cambia en respuesta a la limitación de agua y su transporte depende de una posible señal de localización nuclear.

Para contrastar la hipótesis, se plantean los siguientes:

OBJETIVOS GENERALES

1. Corroborar la localización nuclear de la proteína PvLEA18 de frijol mediante una fusión con la proteína verde fluorescente.
2. Determinar si el estrés por deshidratación puede modular la localización subcelular de la proteína PvLEA18.
3. Evaluar el efecto de la fitohormona ABA sobre la localización subcelular de la proteína PvLEA18.
4. Identificar las regiones responsables en el transporte de la proteína PvLEA18 al núcleo.

Para alcanzar los objetivos generales descritos se pretende cumplir con los siguientes:

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Determinar la funcionalidad de la posible señal de localización nuclear contenida en la proteína PvLEA18 en el transporte al núcleo.

a) Construir fusiones de los genes *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* con la proteína verde fluorescente bajo control del promotor 35S.

b) Realizar ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla mediante introducción por biobalística de las fusiones PvLEA18::GFP-GUS, PvLEA18DEL::GFP-GUS y GFP-GUS.

c) Evaluar el efecto del ABA sobre la localización subcelular de la proteína PvLEA18 en epidermis de cebolla.

2) Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresen de manera estable las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS bajo regulación del promotor 35S.

a) Determinar la localización subcelular de la fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS mediante la detección de fluorescencia en raíces de plantas transgénicas.

b) Evaluar el efecto del ABA y el estrés osmótico sobre la localización subcelular de la PvLEA18 y PvLEA18DEL en plantas transgénicas.

3) Obtención de plantas transgénicas que expresen de manera estable las fusiones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA bajo control del promotor 35S.

a) Construir fusiones de los genes *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* con el epítipo de hemaglutinina (HA).

b) Determinar la localización celular de la PvLEA18 y PvLEA18DEL por fraccionamiento celular y detección inmunológica de las proteínas y del epítipo HA.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.A MATERIAL BIOLÓGICO

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia crecidas a 24°C durante cuatro semanas en el sustrato Metro-Mix (Metro-mix 200, Scotts) estéril, con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Las plantas se regaron una vez por semana con solución nutritiva conteniendo por litro [10ml de KNO₃ 1M, 5ml de KH₂PO₄ 1M, 4ml de MgSO₄ 1M, 4ml de Ca(NO₃)₂ 1M, 5ml de Fe-EDTA {etilendiaminotetracetato de hierro} y 2ml de solución de micronutrientes (H₃BO₃ 70µM, MnCl₂ 14µM, CuSO₄ 0.5µM, ZnSO₄ 1µM, NaMoO₄ 0.2µM, NaCl 10µM, CoCl₂ 0.01µM] (Somerville and Ogren,1982).

Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Para el crecimiento de plantas en condiciones estériles 20mg de semillas se incubaron en 600µl de agua estéril en un tubo eppendorf a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, las semillas se centrifugaron 20s a 14,000 rpm y se trataron con 200µl de etanol absoluto por 1 minuto; nuevamente se centrifugaron los tubos por 20s para quitar el etanol y a cada tubo se le añadió 200µl de una solución de cloro comercial al 40% (Clorex, Goza Comercial) y tritón 0.02% (Sigma-Aldrich), las semillas se agitaron durante 5-10 minutos y se centrifugaron por 20s para quitar la solución. Las semillas se lavaron seis veces con 600µl de agua estéril y con el agua del último lavado se estratificaron a 4°C durante toda la noche, antes de sembrarlas.

Tratamiento de plántulas transgénicas utilizando polietilenglicol (PEG) y ácido abscísico (ABA)

Para el tratamiento con PEG o ABA las plantas se crecieron en medio MS (sales MS 4.3g/l [Murashige and Skoog, 1962], sacarosa 10g/l, MES 0.5g/l, fitoagar 6.5g/l; a pH 5.7) sólido por dos semanas, posteriormente se transplantaron de 20 a 25 plántulas

a placas de microtitulación de 2cm de diámetro que contenían 3ml de medio MS líquido en cada pocillo, las condiciones utilizadas fueron PEG al 25% (PEG-8000, Research Organics) ó 50µM de ABA (Sigma-Aldrich) y como control se usó medio MS.

Las cajas contenían un soporte de tela plástica para mantener el contacto de la raíz con el medio líquido. Se incubaron en el cuarto de crecimiento a 25°C y con agitación constante durante 24 horas (Van der Weele *et al.*, 2000).

El PEG se utiliza en estudios de déficit hídrico en plantas para inducir deshidratación al disminuir el potencial hídrico de la solución nutritiva en la que se encuentran; en tanto que la aplicación exógena de ABA imita los efectos de la deshidratación.

Cepas bacterianas

En todos los experimentos se utilizó la cepa de *E. coli* XL1 Blue, los plásmidos se introdujeron por transformación por el método de calcio (Mandel and Higa, 1970) y las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB adicionado con 100µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) a 37°C.

Para la transformación de las plantas se usó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260. Esta cepa se transformó mediante electroporación con los plásmidos binarios pCambia 1301 y 1304 (Hajdukiewicz *et al.*,1994) y las fusiones PvLEA18::HA, PvLEA18DEL::HA, PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS. Las bacterias transformadas se seleccionaron a 28°C, en medio LB adicionado con 100µg/ml de rifampicina (marcador cromosomal) y 50µg/ml de kanamicina (marcador del plásmido Ti). La integridad de las construcciones en *Agrobacterium tumefaciens* fueron confirmadas por digestiones enzimáticas de cada plásmido.

II.B OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Preparación de las Plantas para la Transformación

Para los experimentos de transformación se usaron 5 macetas con 5 plantas cada una de *Arabidopsis thaliana* de 5 a 6 semanas de edad que fueron decapitadas para originar más inflorescencias. Cada una de las macetas se cubrió con una malla

para sostener el sustrato durante la infiltración. Terminada la infiltración, las plantas se llevaron al cuarto de crecimiento, sin ser regadas y protegidas de la evaporación mediante una cubierta de plástico durante 3 días.

Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el Método de Infiltración

Se seleccionó una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con cada uno de los plásmidos (pC1301, pC18HA, pC18DELHA, pC1304, pCH18GFP y pCH18DELGFP) con la cual se inocularon 1.5L de medio de cultivo LB con kanamicina (50µg/ml) y rifampicina (100µg/ml), se incubó durante 16 horas a 28°C en agitación (300 rpm). Cuando el cultivo alcanzó una densidad entre 1.2–2.0 unidades de densidad óptica (D.O. 600nm) (Spectrophotometer DU 640, Beckman), se centrifugó a 10,000 rpm (rotor JA-14, Beckman) durante 15 minutos, la pastilla se resuspendió en 1L de una solución estéril de sacarosa 5% y detergente silwet L-77 0.05% a temperatura ambiente. Esta suspensión bacteriana se vació en un recipiente de acrílico especialmente diseñado para la transformación por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, donde se colocaron las macetas en posición invertida, de manera que las plantas quedaran sumergidas en el medio de infiltración durante 5 minutos con aplicación de vacío (Clough and Bent, 1998).

Después de la infiltración las plantas se lavaron con agua estéril para quitar el exceso de medio y se colocaron en charolas de la manera descrita anteriormente para conservarse con riego continuo hasta la producción de semilla (**generación T₀**).

Selección de Plantas Transgénicas

Las plantas transgénicas de la generación T₀ se seleccionaron en medio MS complementado con higromicina (agente selector de los plásmidos empleados) (Sigma-Aldrich, 50µg/ml), para evitar contaminación por *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó una solución comercial del antibiótico claforan (400µg/ml).

La primera cosecha de las plantas transformadas por infiltración se denominó semilla T₀. Las semillas estériles T₀ de cada transformación se distribuyeron sobre el medio de selección utilizando 100µl de agarosa 0.1% con higromicina y claforán. Las

cajas de selección se mantuvieron tres días a 4°C para romper el estado de latencia de la semilla y después se transfirieron al cuarto de cultivo a 24°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Después de dos semanas en medio selectivo, las plántulas resistentes a higromicina (plantas T₁) se trasplantaron al sustrato metromix para su crecimiento y producción de semillas que se cosecharon individualmente (semilla T₁). Las semillas T₁ se sembraron en medio de selección a razón de 3 cajas con 100 semillas cada una. De las plantas resistentes a higromicina (plantas T₂) obtenidas de esta siembra se trasplantaron 15 plantas al sustrato metromix para su crecimiento y posterior cosecha de la semilla T₂. El resto de las plántulas fué congelado y pulverizado en presencia de nitrógeno líquido antes de ser guardado a -70°C para su posterior utilización en experimentos subsecuentes.

PCR de las plántulas transgénicas

La presencia del transgén en las plantas T₂ y planta silvestre se analizó mediante una reacción de PCR. El tejido pulverizado de 5 plantas de 2 semanas de edad se homogenizó en 400µl de buffer de extracción (Tris 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0.5%), se centrifugó por 1 minuto a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El DNA se recuperó por precipitación con 300µl de isopropanol y centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, la pastilla recuperada se lavó con etanol al 70%, se secó en presencia de vacío por 5 minutos y se resuspendió en 25µl de agua bidestilada. Se tomaron 2µl de muestra y se hizo una reacción de PCR en un volumen final de 20µl utilizando los oligos **MEX5**: 5'-CCTTCTAGATGGAGAAGGAGAAAAAG-3', **MEX5DEL**: 5'-CCCTCTAGAATGACAGAGAGTGAACAA-3' y **MEX3**: 5'-TTTCCATGGACTTGTGATTAGTGGCACC-3' para amplificar la secuencia de los genes *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* y los oligos **GUS1**: 5'-AATGCGGGCAACGTCTGGTATCA-3' y **GUS2**: 5'-GGTGTTCGGCGTGGTGTAGAGC-3' para la amplificación del gen *GUS*.

II.C MICROSCOPIA

Microscopía de fluorescencia

Para la visualización de la actividad de GFP, los tejidos de cebolla y de las plántulas transgénicas se colocaron sobre portaobjetos con agua y se examinaron al microscopio con óptica de Nomarsky DIC y fluorescencia (Nikon Eclipse E600, Japan) utilizando el filtro GFP-LP (Chroma Technology Corp.), con un paso de luz de excitación de 480/40nm, un espejo dicromático de 505nm y un filtro barrera de 510nm, la luz ultravioleta fué provista por una lámpara de mercurio de 100W (Nikon, Japan).

Microscopía confocal

Los tejidos de cebolla y las plántulas transgénicas se colocaron sobre portaobjetos con agua y se observaron en el microscopio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany) de la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Biotecnología/UNAM, utilizando una longitud de onda de 488nm y el objetivo PlanNeofluar 40X.

Ensayo de viabilidad de epidermis de cebolla

Se colocaron 10 secciones de 1cm² de epidermis sobre medio MS y se monitoreó su integridad a las 0, 24 y 48 horas después de ser colocadas en medio MS o MS complementado con ABA 50µM.

Las epidermis se tiñeron con azul de tripano para detectar células muertas por coloración azul, y con diacetato de fluoresceína (FDA), para detectar células vivas por fluorescencia verde.

Transformación de epidermis de cebolla por biobalística

La epidermis de cebolla se cortó en fragmentos de 1cm² que se colocaron en medio MS sólido en cajas de Petri. Se utilizaron 3µl de DNA (5µg/µl) de los plásmidos pC1304, pCH18GFP y pCH18DELGFP se precipitó sobre 50µl de partículas de tungsteno (Bio-Rad, 1.1µm de diámetro) utilizando 50µl de CaCl₂ (Baker) 2.5M y 20µl de espermidina 0.1M (Sigma). La mezcla se centrifugó 10s a 10,000 rpm, se eliminó el

sobrenadante y se hicieron 2 lavados de la pastilla con 500µl de etanol absoluto. Por último, la pastilla se resuspendió en 60µl de etanol y se sonicó por 10s antes de aplicar la muestra sobre las membranas acarreadoras (Klein *et al.*, 1988).

El bombardeo se realizó en la Unidad de Cultivo y Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología/UNAM utilizando un acelerador de partículas bajo condiciones de vacío de 28 mm de Hg, presión de helio de 700psi y 6cm de distancia al blanco.

Después del bombardeo, los tejidos fueron incubados a 24°C durante 48 horas y analizados por microscopía. Se bombardearon dos cajas de cada construcción y cada una de ellas recibió dos disparos como medida para aumentar la eficiencia de transformación.

Tratamiento de epidermis de cebolla utilizando ABA 50µM

Después de ser bombardeadas, las epidermis fueron colocadas sobre medio MS durante 24 horas, para después ser tratadas durante otras 24 horas en medio MS adicionado con ABA 50µM. Después del tratamiento, las epidermis se colocaron en agua sobre el portaobjetos y fueron observadas en el microscopio confocal.

Tinción de núcleos con DAPI

Los núcleos de las células de la raíz de las plántulas transgénicas se visualizaron mediante tinción con 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich). Las plántulas se incubaron durante 5 minutos en 2ml de una dilución 1:300 de una solución de DAPI a 10 mg/ml, posteriormente se colocaron en agua sobre un portaobjeto y se observaron al microscopio de fluorescencia usando el filtro UV-2A (Chroma Technology Corp.), con un paso de luz de excitación de 330-380nm, un espejo dicromático de 400nm y un filtro barrera de 420nm.

Ensayo histoquímico de GUS

Se siguió el protocolo descrito por Jefferson (1987). Brevemente, plantas silvestres y plantas T₂ de cada una de las líneas transgénicas se colocaron en el buffer de reacción de GUS (NaH₂PO₄ 100mM pH 7.0, EDTA 10mM pH 8.0, K₄Fe(CN)₆ 0.5mM, K₃Fe(CN)₆ 0.5mM, Tritón X-100 0.1%, 50mg/ml de X-Gluc (Research Organics) en

DMSO) por 3 minutos en presencia de vacío (para permitir una mejor penetración de la solución) y se incubaron en oscuridad a 37°C toda la noche.

Al otro día, se retiró la solución y se hicieron dos lavados de las plantas con agua destilada estéril, posteriormente se agregó una solución para fijar la actividad de GUS (ácido acético:formaldehído:etanol 40%, 5:5:90) y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Para quitar la clorofila del tejido se hicieron varios lavados de 20 minutos cada uno con una serie de diluciones de etanol desde el 50% hasta el 90%, finalmente se añadió glicerol 50% a las muestras y se observaron al microscopio estereoscópico (Nikon, Japan).

II.D CONSTRUCCIONES

II.D.1 Obtención de la construcción PVLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA

Se amplificó la región codificante del cDNA de la PvLEA18 con los oligonucleótidos **MEX5**: 5'-CCT-TCTAGA-TGGAGAAGGAGAAAAAG y **MEX3**: 5'-TTT-CCATGG-ACTTGTGATTAGTGGCACC-3', usando una clona del cDNA de la PvLEA18 como templado. La versión de la PvLEA18 sin los primeros seis aminoácidos (MEKEKK) se obtuvo mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos **MEX3**: 5'-TTT-CCATGG-ACTTGTGATTAGTGGCACC-3' y **MEX5DEL**: 5'-CCC-TCTAGAATGACAGAGAGTGAACAA. El oligonucleótido MEX3 posee un sitio de corte para *NcoI* y 3 nucleótidos de protección que ayudan a mantener la integridad del sitio de corte de la enzima durante la reacción de PCR, los oligonucleótidos MEX5 y MEX5DEL tienen un sitio de corte *XbaI* además de 3 nucleótidos de protección.

Los productos de la amplificación de la *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* se clonaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pBluescript KS+ (Stratagene) generándose los plásmidos pLEA18 y pLEA18DEL, el pKS+ posee un sitio de clonación múltiple (MCS), un promotor de β -galactosidasa y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

El DNA de estos plásmidos se aisló (Birnboim, 1983) y se verificó el mapa de restricción de cada uno con digestiones *EcoRI-HindIII* y *HindIII-NcoI*. Posteriormente,

ambos plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología/UNAM.

Para la fusión de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con el epítipo de Hemaglutinina (HA) se usó el plásmido pPILY (Ferrando *et al.*, 2000), que posee duplicado el promotor de expresión constitutivo y fuerte del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S; un sitio de clonación múltiple; la secuencia de HA; la secuencia del intrón IV2, que impide el procesamiento del vector por *Agrobacterium tumefaciens*; el terminador de nopalina sintasa (Nos) y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacteria (Fig.11). Los plásmidos pLEA18 y pLEA18DEL se clonaron en el sitio *HindIII-NcoI* del plásmido pPILY para generar las construcciones p18HA y p18DELHA, confirmándose su identidad por digestión con *XbaI* y *NofI*. Para la generación de plantas transgénicas se usó el plásmido binario pCambia 1301 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), que cuenta con las secuencias específicas del borde izquierdo y del borde derecho del T-DNA necesarias para la integración del gen en las células vegetales, posee también el promotor 35S; el promotor de β -galactosidasa; un sitio de clonación múltiple; el terminador de nopalina sintasa (Nos) y el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección en planta. Fuera de la región del T-DNA hay otro marcador para selección de bacteria en kanamicina, además el gen *GUS* que sirve como un marcador adicional de selección.

Los cDNAs de la PvLEA18 y PvLEA18DEL de los plásmidos p18HA y p18DELHA se subclonaron como un fragmento *KpnI* en el plásmido binario pC1301 obteniéndose los plásmidos pC18HA y pC18DELHA, cuya identidad y orientación de los fragmentos se confirmó por digestión con *HindIII* y *EcoRI* (Fig.12).

II.D.2 Obtención de las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS

Se amplificó la región codificante del cDNA de la PvLEA18 usando los oligonucleótidos **HOS1:5'-CCTCCATGAGAAGGAGAAAAAGAC-3'** y **HOS2:5'-TATAGATCCTTTGTGATTAGTGGCACCA-3'**, que llevan en los extremos los sitios de corte para las enzimas *NcoI* y *BglII* respectivamente, además de 3 nucleótidos de protección.

Para obtener una versión de la PvLEA18 sin los primeros seis aminoácidos (**MEKEKK**), se utilizaron los oligonucleótidos **HOS3**:5'-CCTCCATGGCAGAGAGTGAAC AAGGGAAAG-3', que lleva un sitio de corte para *NcoI* y **HOS2**: 5'-TATAGATCTTTGTGATTAGTGGCACCA-3'. Los productos de la amplificación se clonaron en el sitio *EcoRV* del plásmido Bluescript KS+ (Stratagene) y la integridad de la secuencia se comprobó mediante las digestiones con *BglII-EcoRI* de los plásmidos obtenidos pH18 y pH18DEL (Fig.17). Finalmente, la identidad se confirmó por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología/UNAM.

Para la expresión en epidermis de cebolla y en plantas, los plásmidos pH18 y pH18DEL se cortaron y clonaron en el sitio *NcoI-BglII* del plásmido binario pCambia 1304 (Hajdukiewicz *et al.*,1994), el cual posee la región codificante de GFP (mGFP5) (Siemering *et al.*,1996) en fase con el gen reportero *GUS*, además, posee las secuencias específicas del borde izquierdo y borde derecho del T-DNA necesarias para la integración del gen en las células vegetales, el promotor CaMV 35S; el promotor de β -galactosidasa; un sitio de clonación múltiple (MCS), el terminador de nopalina sintasa (Nos) y el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección de planta, fuera de la región del T-DNA hay otro marcador para selección de bacteria en kanamicina.

Los plásmidos quiméricos obtenidos pCH18GFP y pCH18DELGFP tienen el extremo amino de la región codificante de GFP fusionado al extremo carboxilo de la PvLEA18 o PvLEA18DEL bajo la regulación del promotor 35S. Los plásmidos se analizaron por digestión enzimática con *EcoRI-BglII* y *EcoRI-NcoI* y se confirmó que no existieron rearrreglos o modificaciones después de la clonación (Fig. 18).

II.E AISLAMIENTO DE RNA

Se extrajo RNA total de 20 plántulas transgénicas T₂ de 4 semanas de edad crecidas en medio MS-higromicina las cuales fueron pulverizadas en mortero en presencia de nitrógeno líquido. El pulverizado se homogenizó en 1ml de Trizol (TRIzol, Life Technologies) y el homogenizado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente,

se agregaron 200µl de cloroformo y se mezcló vigorosamente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C para recuperar la fase acuosa que se colocó en un tubo eppendorf, para precipitar el RNA se agregaron 500µl de isopropanol y se incubó toda la noche a -20°C.

Al otro día se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se recuperó la pastilla y se lavó con etanol al 75%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20µl de agua bidestilada. La cantidad de RNA se cuantificó por su absorbancia a 260 y 280nm en espectrofotómetro.

Análisis del RNA por "Northern-Blot"

Para analizar los niveles de RNA mensajero se utilizó la técnica de Northern-blot (Lehrach *et al.*, 1977). Se separaron aproximadamente 15µg de RNA total en geles de agarosa al 1.2% en presencia de formaldehído (2.2% final). Se hicieron dos lavados de los geles de 30 minutos cada uno utilizando SSC 10X (NaCl 1.5M, citrato de sodio 150 mM). Posteriormente el RNA fué transferido por capilaridad en condiciones semi-secas (Kempter *et al.*, 1991) a membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). El RNA se fijó a las membranas con luz ultravioleta (UV Stratalinker 1800, Stratagene) antes de teñirse con azul de metileno 0.03% (BioRad) en acetato de sodio 0.5M pH 5.2, para verificar la transferencia realizada. La membrana se prehibridó a 55°C con buffer PSE (SDS 7%, fosfato sódico a pH 7.2 0.3M y EDTA 1mM) (Church and Gilbert, 1984) y posteriormente se agregó la sonda marcada en 10 ml de PSE y se dejó hibridando toda la noche a la misma temperatura. Los lavados se hicieron a 55°C con una solución de SDS 0.1% y SSC 0.1X. Por último, las membranas marcadas se usaron para exponer una película Kodak X-Omat a -70°C.

Marcaje de la sonda

El fragmento de DNA de la sonda de interés (*PvLEA18*, *PvLEA18DEL* o *GUS*) se separó en geles de agarosa al 2% y se aisló siguiendo las instrucciones de Gene Clean (Stratagene). El DNA se marcó radioactivamente usando el método descrito por Feinberg and Vogelstein (1983) utilizando (α -³²P) dCTP. Este método se basa en la utilización de una mezcla al azar de hexanucleótidos que actúan como iniciadores para

la acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa lo que resulta en una incorporación de nucleótidos radioactivos en la sonda de manera más eficiente.

II.F AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES

Extracción de proteínas solubles

La extracción de proteínas solubles de semilla de frijol y de plantas transgénicas de 4 semanas de edad se realizó utilizando ácido tricloroacético (TCA). El tejido de 20 plantas se congeló en nitrógeno líquido, se homogenizó en un mortero frío usando el buffer Tris 20mM pH 7.5 y NaCl 10mM y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se añadió TCA hasta una concentración final del 10% y se dejó precipitar a 4°C toda la noche. Al otro día se centrifugó a 14,000 durante 15 minutos a 4°C, se recuperó la pastilla y se le hicieron dos lavados con acetona al 100% fría, dos lavados con acetona al 80% y dos lavados con agua bidestilada. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20µl de buffer de Laemmli (Laemmli, 1970). La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford (BioRad) utilizando como referencia una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Se separaron 20µg de proteínas de cada muestra por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% (Laemmli, 1970). Las proteínas separadas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (R-250, Research Organics) al 0.25%.

Con la finalidad de impedir que la proteína PvLEA18 (~20kDa) se saliera del gel durante la electroforesis, el extracto de semilla de frijol se colocó en el gel de manera desfasada en tiempo respecto a los extractos de las plantas transgénicas que poseen la proteína de fusión (102kDa), es por esto que el peso detectado de la proteína PvLEA18 en el Western blot no corresponde con su peso esperado.

Inmunodetección de la PvLEA18 y PvLEA18DEL por ensayos tipo "Western- Blot"

Para la inmunodetección de la proteína PvLEA18 y PvLEA18DEL se hicieron ensayos tipo Western blot (Towbin *et al.*, 1979). Después de la electroforesis, las

proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) por el método de transferencia semi-seca (Towbin *et al.*, 1979) durante 1 hora a 200 mA, con buffer de transferencia (glicina 0.19M, Tris-HCl 25mM, metanol 20%). La transferencia se verificó por tinción reversible con rojo de Ponceau S (0.2 % en ácido acético) (Aebersold *et al.*, 1987). Las membranas se bloquearon en TBS (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) con bloqueador (Boehringer) al 0.5% por 2 horas a temperatura ambiente con agitación basculante. La membrana bloqueada se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo de conejo policlonal dirigido contra la proteína PvLEA18 a una dilución de 1:500. Al día siguiente se hicieron 3 lavados de la membrana de 5 minutos cada uno con TBS-bloqueador al 0.5%. Posteriormente, la membrana se incubó durante dos horas con un anticuerpo (dilución 1:2000) de cabra dirigido contra las IgG's de conejo acoplado a fosfatasa alcalina o peroxidasa (ZYMED) en el caso de revelar por luminiscencia. Terminada la incubación con el segundo anticuerpo, la membrana se sometió a 3 lavados de 5 minutos con TBS. Finalmente, se hizo un lavado de la membrana con el buffer de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0.1M pH 9.0, MgCl₂ 5mM, NaCl 0.1 M) por 5 minutos, para el revelado se usó un sistema con una solución con el sustrato para la fosfatasa alcalina (ZYMED) BCIP 10X y NBT 10X. La reacción se detuvo lavando con agua destilada. El tratamiento que se le dió a la membrana para revelar por luminiscencia fué agregar 1ml del sustrato de la peroxidasa (SuperSignal West Pico, Pierce) e inmediatamente exponer una película Kodak X-Omat a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 1, 3 y 5 minutos antes del revelado.

II.G AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

Se aislaron núcleos de ejes embrionarios de semilla de frijol utilizando el método descrito por Goday *et al* (1994). Se molieron 300mg de ejes embrionarios en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, el pulverizado fué homogenizado en el buffer de aislamiento (Tris-HCl 20mM pH 7.8, sacarosa 500mM, MgCl₂ 5mM, KCl 5mM, glicerol 50%, Tritón X-100 0.1%, β-mercaptoetanol 7mM, PMSF 0.5mM). Los restos celulares se removieron por filtración a través de una membrana de nylon de 100nm, posteriormente los núcleos fueron recuperados por centrifugación (120-140g, 10min. 4°C) y resuspendidos en 400 µl de buffer de aislamiento. En el segundo paso de

purificación se agregaron a los núcleos resuspendidos 4 volúmenes de un buffer con Percoll (Sigma) (Percoll 80%, sacarosa 0.44M, Tris-HCl 25mM pH 7.6, MgCl₂ 10mM) y se centrifugaron a 120-140g por 30 min a 4°C sobre un colchón de sacarosa 2M (Fig. 35).

La integridad de los núcleos aislados se confirmó mediante tinción con DAPI y observación al microscopio de fluorescencia a 350nm. Durante el proceso de purificación de núcleos se tomaron alícuotas de la fracción soluble o citoplasmática (fracción S1), de la primera pastilla de núcleos (pastilla N1), de la fracción enriquecida de núcleos (fracción N2) y de la fracción de los núcleos recuperados después de los lavados (fracción N3). De estas fracciones se obtuvieron extractos proteicos mediante precipitación con TCA hasta una concentración final del 20%. Estos extractos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo inmunopurificado dirigido contra la PvLEA18.

II.H ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Detección de posibles señales de localización nuclear (NLS) en la proteína PvLEA18

Para detectar señales potenciales de transporte a núcleo se utilizó el programa PSORT (<http://www.psort.org>). Este programa toma la información de la secuencia de aminoácidos para analizarla y reportar la posibilidad de que dicha proteína se localice en determinado compartimiento celular. PSORT utiliza tres algoritmos distintos para detectar posibles NLS. El primero de ellos hace una búsqueda en la secuencia para detectar NLS clásicas como la del antígeno T de SV40 (**PKKKRKV**) o la NLS bipartita (**KRPAAIKKAGQAKKKK**). Para identificar una NLS tipo SV40 se buscan patrones de 4 residuos básicos (K o R), de 3 residuos básicos (K o R o H), o de una prolina seguida de 3 residuos básicos; para las señales bipartitas, se hacen búsquedas de 2 residuos básicos, 10 residuos espaciadores y otra región con al menos 3 residuos básicos (Nakai and Kanehisa, 1992). El segundo de los algoritmos hace una discriminación entre proteínas nucleares y proteínas citoplásmicas de acuerdo al porcentaje de aminoácidos

básicos en la secuencia, el algoritmo considera que las proteínas nucleares son generalmente ricas en aminoácidos básicos y que si la suma de argininas y lisinas es mayor al 20%, entonces la proteína tiene altas posibilidades de ser nuclear (Reinhardt and Hubbard, 1998).

El tercer algoritmo se basa en clasificar a la proteína de acuerdo al criterio del vecino más cercano ("k nearest neighbor classifier") en donde se hace una comparación de la proteína con una base de datos de proteínas nucleares de levadura de acuerdo a su composición de aminoácidos y reporta un determinado porcentaje de probabilidad de que la proteína sea nuclear (Horton and Nakai, 1997).

III. RESULTADOS

III.A PREDICCIÓN DE POSIBLES SEÑALES DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA PvLEA18

Se llevó a cabo un análisis bioinformático de la proteína PvLEA18 utilizando el programa de predicción celular PSORT (www.psort.org) para determinar si en su secuencia existen señales de localización subcelular que permitieran explicar la localización en núcleo y citoplasma reportada por Colmenero-Flores *et al* (1999).

Al llevar a cabo este análisis se encontró que:

(1) Debido al porcentaje de aminoácidos básicos que posee la proteína PvLEA18 (13.4%) no puede ser catalogada como una posible proteína nuclear ya que para esto se necesita un contenido de aminoácidos básicos de por lo menos el 20%.

(2) No se detecta ningún tipo de secuencia de localización nuclear (NLS) canónica.

(3) Sin embargo, el programa detecta un valor significativo (65%) de probabilidad de una posible localización nuclear cuando se compara la PvLEA18 contra una base de datos de proteínas nucleares de levadura (Horton and Nakai, 1997).

A pesar de que la proteína PvLEA18 no posee una NLS canónica, al llevar a cabo una inspección de la secuencia proteica, se detectó que en los primeros 6 aminoácidos de su extremo amino, hay una secuencia con características de una NLS (**MEKEKK**). Esta secuencia es similar a la encontrada en la DNA topoisomerasa I de humano y levadura (**PKKIKTE**), la cual se ha demostrado es la responsable de dirigir a esta proteína al núcleo (Alsner *et al.*, 1992).

Para probar la hipótesis de que la secuencia MEKEKK podría corresponder a un tipo de NLS y ser la responsable del transporte al núcleo de la proteína PvLEA18, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

- a) La expresión y localización subcelular de la proteína completa (PvLEA18) y una versión truncada de sus primeros 6 aminoácidos (PvLEA18DEL), ambas fusionadas al epítipo de hemaglutinina (HA) en plantas transgénicas.

- b) La expresión y localización subcelular de la proteína PvLEA18 y su forma truncada fusionada a la proteína GFP en plantas transgénicas y en epidermis de cebolla.

- c) Determinación de la localización de la proteína PvLEA18 mediante anticuerpos dirigidos contra esta proteína en fracciones subcelulares.

En las Figuras 9A y B se resume la estrategia desarrollada para la obtención de las fusiones de la forma silvestre y truncada de la proteína PvLEA18 con GFP-GUS (Fig. 9A) y con el epítipo de hemaglutinina (Fig. 9B).

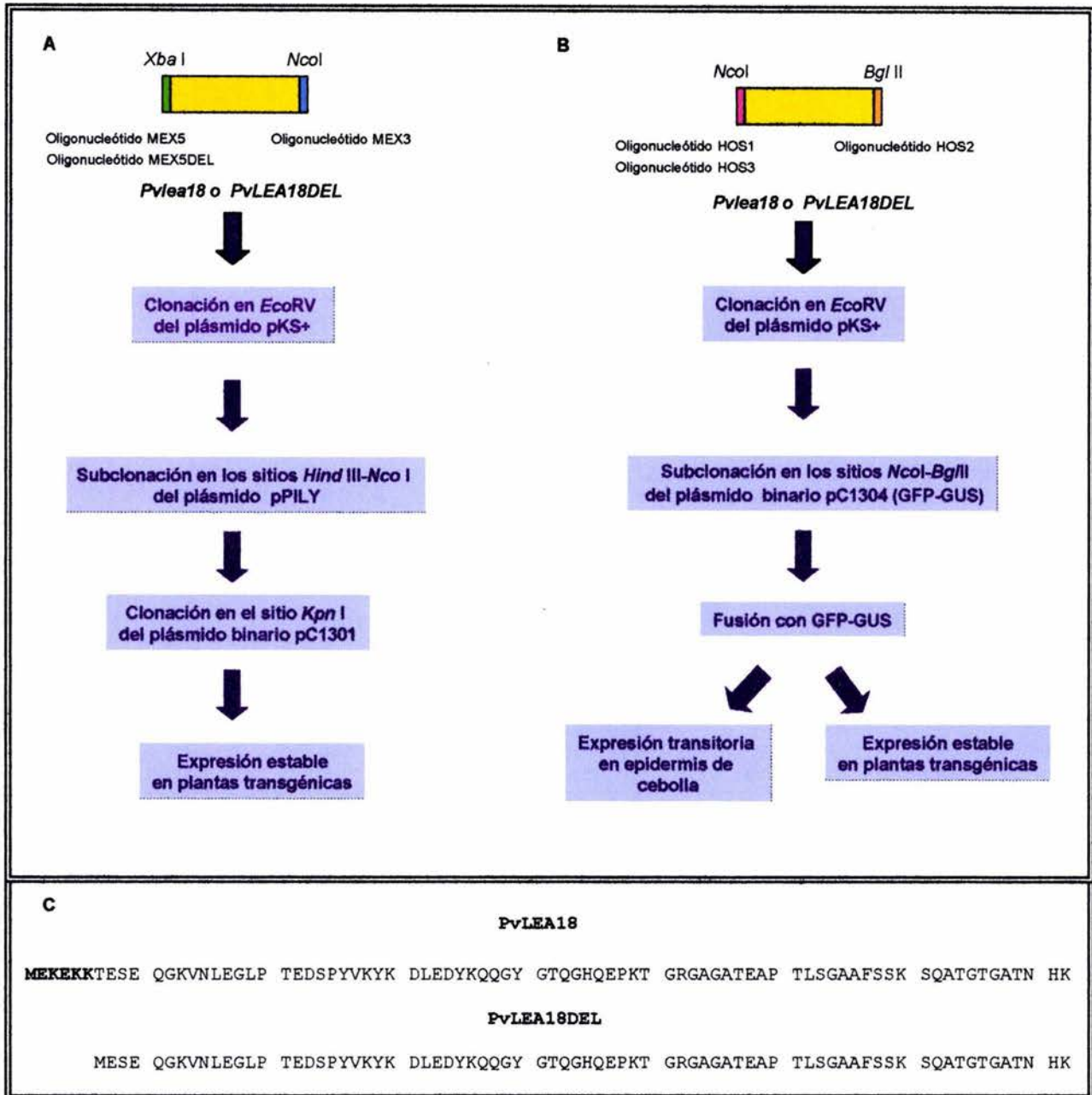


Fig. 9 Diagrama general de la estrategia para la obtención de las construcciones usadas en este trabajo.

A) Obtención de las fusiones de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con el epítipo HA, **B)** Obtención de las fusiones de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con la Proteína Verde Fluorescente (GFP-GUS). **C)** La secuencia completa de la PvLEA18 consta de 246 pb que codifican para una proteína de 82 aminoácidos. La NLS propuesta se muestra resaltada. La secuencia PvLEA18DEL no posee la posible NLS y consta de 228 pb que codifican para una proteína de 76 aminoácidos, esta clona se obtuvo a partir del diseño de oligonucleótidos que permitieron iniciar la traducción de la secuencia en un codón de metionina sustituyendo a la treonina adyacente a la última lisina.

III.B OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS EXPRESANDO LAS FUSIONES DE LA PvLEA18 Y PvLEA18DEL CON EL EPÍTOPO DE HEMAGLUTININA (HA)

III.B.1 Obtención de las fusiones *PvLEA18::HA* y *PvLEA18DEL::HA*

Para la obtención de la fusión de la región codificante *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* con el epítipo de hemaglutinina se amplificaron los marcos de lectura abierta que codifican para la proteína *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* por PCR con los oligonucleótidos indicados (ver Materiales y Métodos). Los fragmentos de DNA obtenidos se clonaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pKS+ para obtener las clonas pLEA18 y pLEA18DEL respectivamente. La construcción de estos plásmidos se comprobó mediante un análisis de restricción con las enzimas *EcoRI-HindIII* y *HindIII-NcoI*; cuando los plásmidos se cortaron con las enzimas *EcoRI-HindIII* se detectó un fragmento de 250 pb y la doble digestión con *HindIII-NcoI* liberó un fragmento de 260 pb, los dos fragmentos obtenidos corresponden al tamaño esperado del inserto predicho por el mapa de restricción para ambos plásmidos (Fig. 10). Además, se secuenció el inserto de los plásmidos pLEA18 y pLEA18DEL para verificar su identidad.

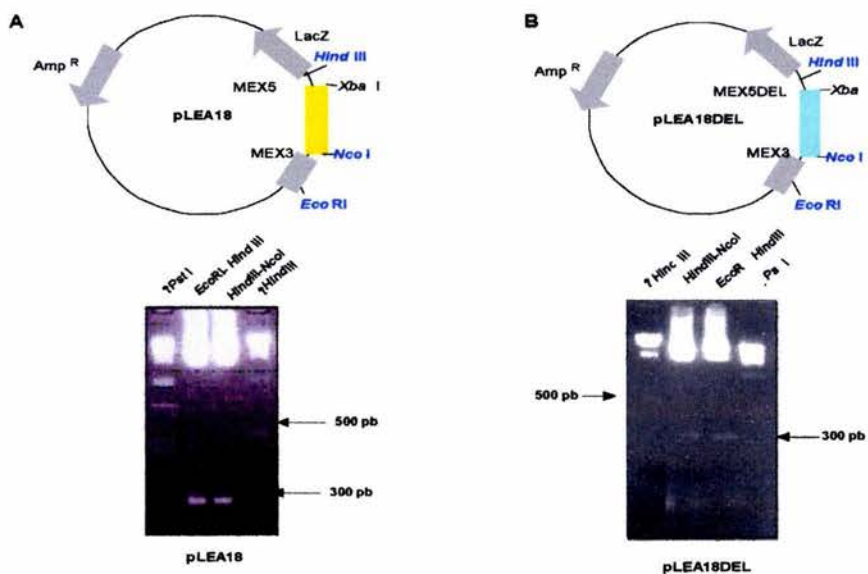


Fig. 10 Mapas de restricción de los plásmidos pLEA18 y pLEA18DEL

Los plásmidos se obtuvieron de la clonación del cDNAs de la *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* en el sitio *EcoRV* del plásmido pKS+. Las digestiones enzimáticas con *EcoRI-HindIII* y *HindIII-NcoI* liberan un fragmento de 250 pb y uno de 260 pb respectivamente, los fragmentos obtenidos corresponden al tamaño esperado predicho en el mapa de restricción para ambos plásmidos. Las flechas indican los tamaños de los fragmentos obtenidos y el de un marcador de peso molecular.

Los cDNAs *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* se clonaron en el sitio *HindIII-NcoI* del plásmido pPILY (Ferrando *et al.*, 2000) para obtener la fusión en fase con el epítipo de hemaglutinina (HA), generándose los plásmidos p18HA y p18DELHA (Fig. 9A y 11A).

Las construcciones de los plásmidos p18HA y p18DELHA se verificaron mediante digestiones enzimáticas con *XbaI* y *NotI*. La digestión con la enzima *XbaI* liberó un fragmento de 260 pb que corresponde con el tamaño de los cDNAs de la *PvLEA18* y *PvLEA18DEL*. La digestión con la enzima *NotI* liberó un fragmento aproximado de 1.7 kb que abarca la región desde el doble promotor 35S, el cDNA de la *PvLEA18* (o *PvLEA18DEL*) fusionado al epítipo HA y el terminador Nos (Fig. 11B, C.)

El casete que contiene el doble promotor 35S, el cDNA de la *PvLEA18::HA* o *PvLEA18DEL::HA* y el terminador Nos (Fig. 11B), se transfirió como un fragmento *KpnI* al plásmido binario pCambia1301 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), generándose los plásmidos pC18HA y pC18DELHA (Fig.12A y B) que se utilizaron para transformar por electroporación la cepa *A. tumefaciens* empleada en la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por infiltración.

Las construcciones de los plásmidos binarios se verificaron mediante las digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *HindIII*. La digestión del plásmido pC18HA con la enzima *EcoRI* liberó un fragmento de 1.5 kb que corresponde al tamaño del promotor doble 35S, la secuencia de la *PvLEA18* y la secuencia del epítipo HA. La digestión con *EcoRI* del plásmido pC18DELHA liberó un fragmento de ~300 pb que corresponde a la secuencia del terminador Nos. La digestión de ambos plásmidos con *HindIII* liberó un fragmento de 900 pb (Fig.12C).

Los plásmidos binarios contenidos en *Agrobacterium tumefaciens* se aislaron y con ellos se realizó un análisis de restricción para confirmar su integridad, posteriormente se utilizaron para la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

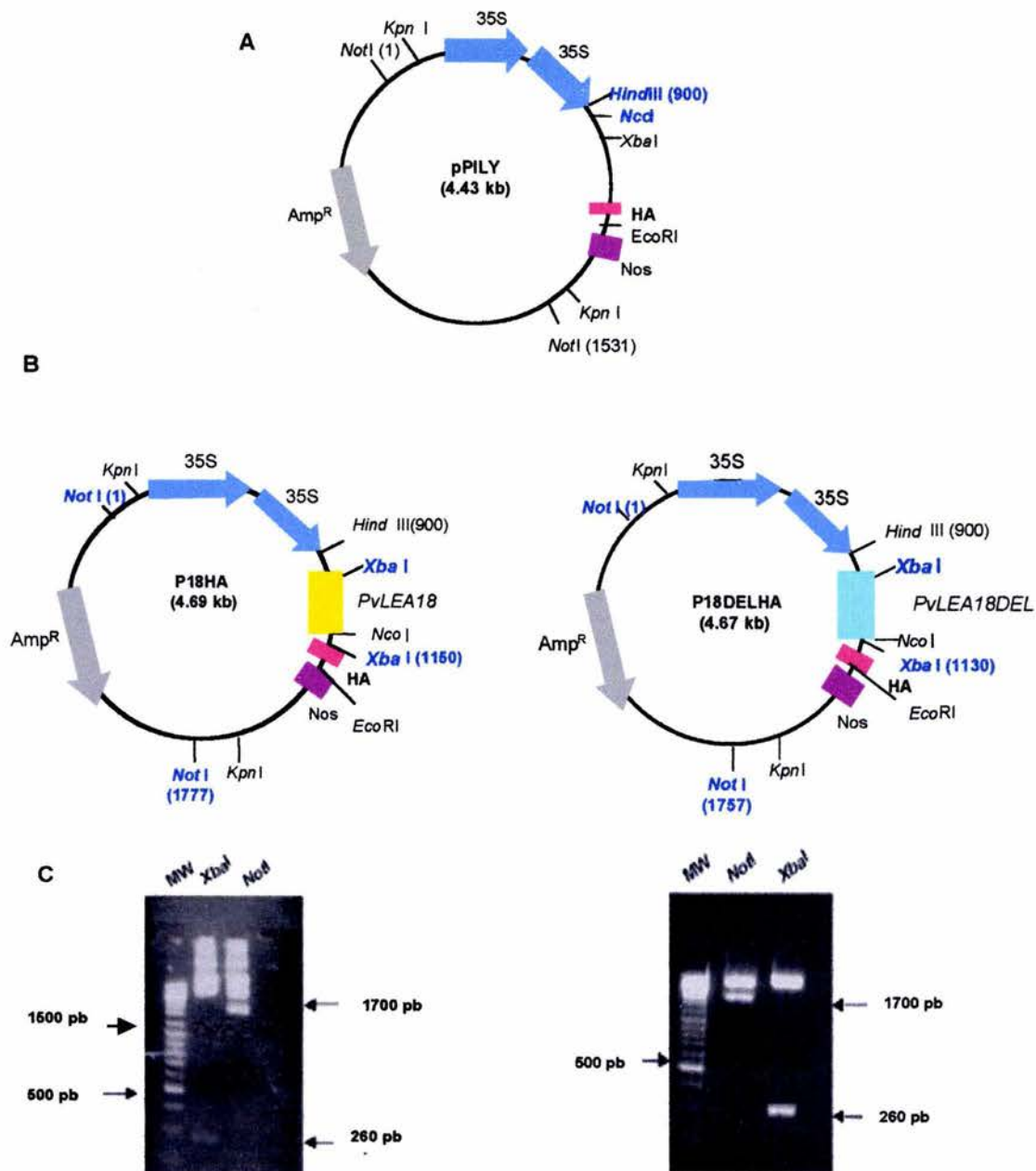


Fig. 11 Mapas de restricción de los plásmidos pPILY, p18HA y p18DELHA

- A)** Plásmido pPILY. Este vector posee el promotor constitutivo fuerte del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S repetido dos veces, la secuencia nucleotídica del epítipo HA; el terminador de nopalina sintasa (Nos) y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacteria. Los sitios de corte de las enzimas se indican en el mapa.
- B)** Los plásmidos p18HA y p18DELHA se obtuvieron de la clonación del cDNA de la PvLEA18 y PvLEA18DEL en los sitio *HindIII-NcoI* del plásmido pPILY.
- C)** Los productos de las digestiones enzimáticas con *XbaI* y *NotI* liberaron fragmentos de 260 pb y 1700 pb respectivamente, el tamaño de los fragmentos corresponde al predicho en el mapa de restricción para ambos plásmidos.

Las flechas a la izquierda indican los tamaños del marcador de peso molecular (MW) y las flechas a la derecha indican el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática.

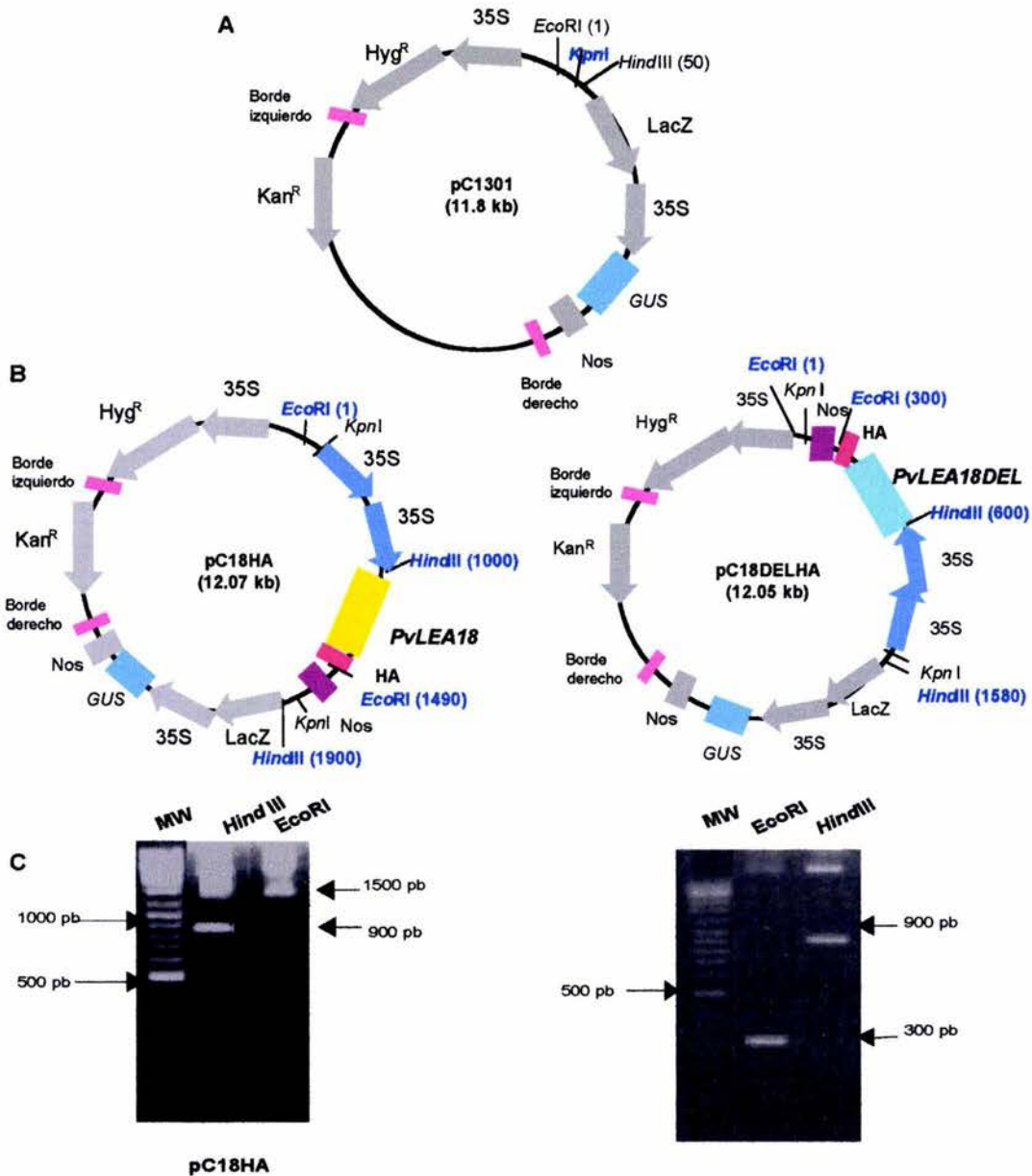


Fig. 12 Estructura del plásmido binario pCambia 1301 y de los plásmidos pC18HA y pC18DELHA

- A) Estructura del plásmido binario pCambia 1301. Dentro de las secuencias del borde izquierdo y del borde derecho se encuentra el promotor constitutivo fuerte CaMV 35S, el gen *GUS*, el terminador de nopalina sintasa (Nos) y el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección en planta. Fuera de los bordes está el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección de bacteria.
- B) Los plásmidos pC18HA y pC18DELHA se obtuvieron de la subclonación en el sitio *KpnI* del plásmido binario pCambia 1301 del casete que inicia en el promotor doble 35S hasta el terminador Nos.
- C) Digestión de los plásmidos pC18HA y pC18DELHA con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. De la digestión del plásmido pC18HA con *EcoRI* y *HindIII* se obtuvieron dos fragmentos, uno de 1500 pb y otro de 900 pb, respectivamente. De la digestión del plásmido pC18DELHA con *EcoRI* y *HindIII* se obtuvieron fragmentos de 300 pb y de 900 pb, respectivamente. El tamaño de los fragmentos corresponde con el predicho en el mapa de restricción. Las flechas a la izquierda indican los tamaños del marcador de peso molecular (MW) y las flechas a la derecha indican el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática.

III.B.2 Selección de plantas transgénicas que poseen las fusiones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA

La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido binario conteniendo la fusión PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA se realizó por infiltración de plantas de *Arabidopsis* con las cepas de *Agrobacterium* portadoras de las construcciones pCH18HA, pCH18DELHA y el plásmido binario pC1301. La selección de las plantas transgénicas se llevó a cabo con las semillas obtenidas en la primera cosecha de las plantas transformadas (semillas T₀) en medio MS con higromicina. De las plantas que se transformaron con el vector pC1301 se recuperaron 9 plantas resistentes a higromicina (plantas T₁) mientras que de las plantas transformadas con las construcciones pC18HA y pC18DELHA se obtuvieron 5 plantas resistentes al antibiótico por cada construcción. En la Tabla 3 se muestra el número de líneas resistentes a higromicina para las tres construcciones y el número de plantas que expresaron GUS, que se utiliza como un marcador adicional de selección que posee el vector binario pC1301. Para la realización de los experimentos que se describen posteriormente se utilizaron plantas de la generación T₂.

Tabla 3. Líneas transgénicas conteniendo las fusiones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA recuperadas por selección con higromicina. Se muestra el número de líneas independientes obtenidas a partir de las plantas transformadas, así como el número de plantas que poseen el transgén verificado por PCR y las plantas que expresan GUS.

Construcción	No. Plantas transformadas	No. Semilla T ₀ sembrada	No. Plantas Hyg ^R T ₁	No. Plantas que poseen el transgén PvLEA18 (PCR)	No. Plantas que poseen el transgén gus (PCR)	No. Plantas que expresan GUS
pC1301	20	10000	9		9	9
pC18HA	20	10000	5	5	5	4
pC18DELHA	20	10000	5	5	5	5

III.B.3 PCR de plántulas transgénicas

Para confirmar la presencia de los transgenes en las plantas seleccionadas por su resistencia a la higromicina se hicieron reacciones de PCR utilizando DNA de

plantas transgénicas y silvestres con los oligonucleótidos correspondientes (ver Mat. y Met.). En las 5 líneas que poseen la fusión PvLEA18::HA (líneas independientes HA2, HA3, HA4, HA5 y HA6) se detectó un producto amplificado de alrededor de 300 pb, el cual confirma la presencia del transgén en las 5 líneas de plantas recuperadas, ya que corresponde al tamaño esperado de la PvLEA18 y no se observó ningún fragmento en la muestra de la planta silvestre que se usó como control negativo (Fig. 13A).

De manera similar, en las 5 líneas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18DEL::HA (líneas independientes DEL3, DEL4, DEL6, DEL7 y DEL8) se detectó un producto de amplificación ~300 pb que corresponde al transgén y cuyo tamaño correlaciona con el tamaño de la PvLEA18DEL utilizada como control positivo, mientras que en la planta silvestre no se detectó ningún producto de amplificación (Fig. 13B).

Los oligonucleótidos GUS1 y GUS2 se emplearon para amplificar una región de 400 pb de la secuencia del gen *GUS* el cual se encuentra en el plásmido binario como un marcador adicional de selección. La secuencia de *GUS* se amplificó por PCR y se detectó en las líneas HA2, HA3, HA4, HA5 y HA6 y en las líneas DEL3, DEL4, DEL6, DEL7 y DEL8 mientras que en la planta silvestre no se detectó producto de amplificación (Fig. 13C). Control positivo de *GUS* se utilizó la planta C14-1 que contiene el plásmido binario pC1301 con la secuencia del gen *GUS*.

III.B.4 Ensayo histoquímico de GUS (β -Glucuronidasa)

Debido a que el plásmido binario pC1301 posee de forma separada el gen de *GUS* bajo el promotor 35S en el T-DNA, se llevó a cabo la detección histoquímica de *GUS* en las líneas transgénicas obtenidas. En todas las líneas transgénicas se detectó el transgén *GUS* (Fig. 13C) con excepción de la línea silvestre, sin embargo, los niveles de expresión fueron variables dependiendo de la línea analizada. Por ejemplo, de las plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::HA solamente se observó expresión de *GUS* en las líneas: HA3, HA4, HA5 y HA6 (Fig.14A), mientras que en las plantas con la construcción PvLEA18DEL::HA la expresión de *GUS* se detectó en todas las líneas, pero con diferentes niveles de expresión, desde un nivel muy bajo (DEL3), hasta un nivel de expresión mayor (DEL6, DEL7 y DEL8) (Fig. 14A). En las plantas transgénicas que expresan las fusiones PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA bajo el

promotor constitutivo se observa una mayor acumulación de GUS en el tejido vascular (Fig. 14B).

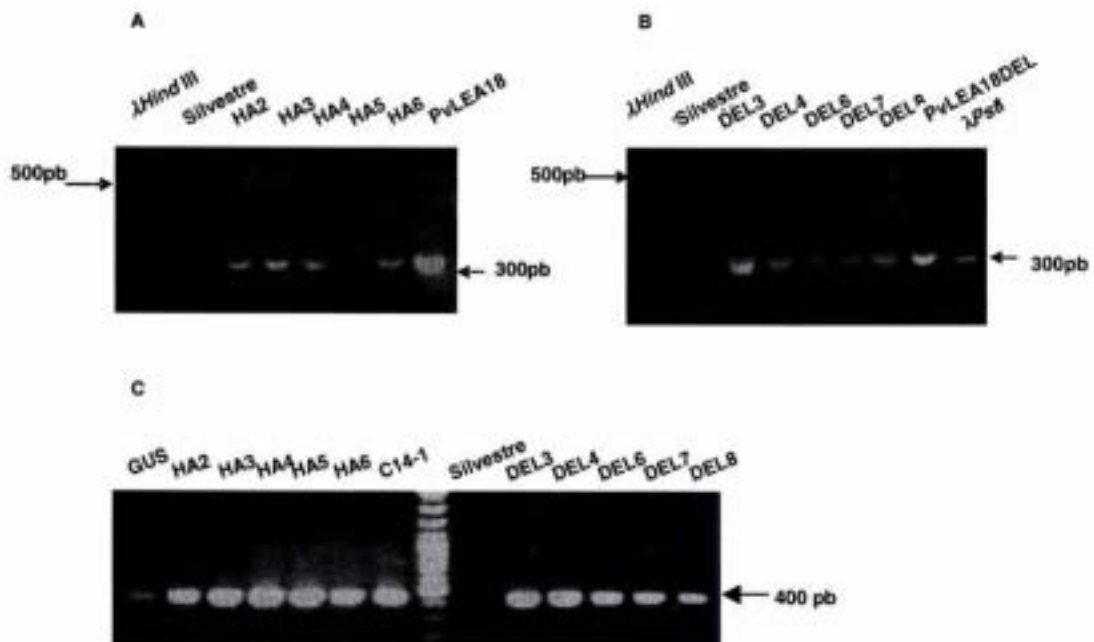


Fig. 13 Detección por PCR de la presencia de los transgenes PvLEA18::HA, PvLEA18DEL::HA y GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

- A) Se detectó un producto amplificado de alrededor de 300 pb en las 5 líneas que poseen la fusión PvLEA18::HA (HA2, HA3, HA4, HA5 y HA6). El tamaño del producto corresponde con el tamaño de la región codificante de la PvLEA18. En la planta silvestre no se observó ningún fragmento.
- B) En las 5 líneas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18DEL::HA (DEL3, DEL4, DEL6, DEL7 y DEL8) se detectó un producto de amplificación ~300 pb que corresponde al transgén. Como control positivo se utilizó el fragmento amplificado de la PvLEA18DEL mientras que en la planta silvestre no se detectó ningún producto de amplificación.
- C) Se detectó un producto de amplificación del gen GUS de 400 pb en todas las líneas transgénicas y en el control positivo C14-1 de GUS, en la planta silvestre no se detectó producto de amplificación.

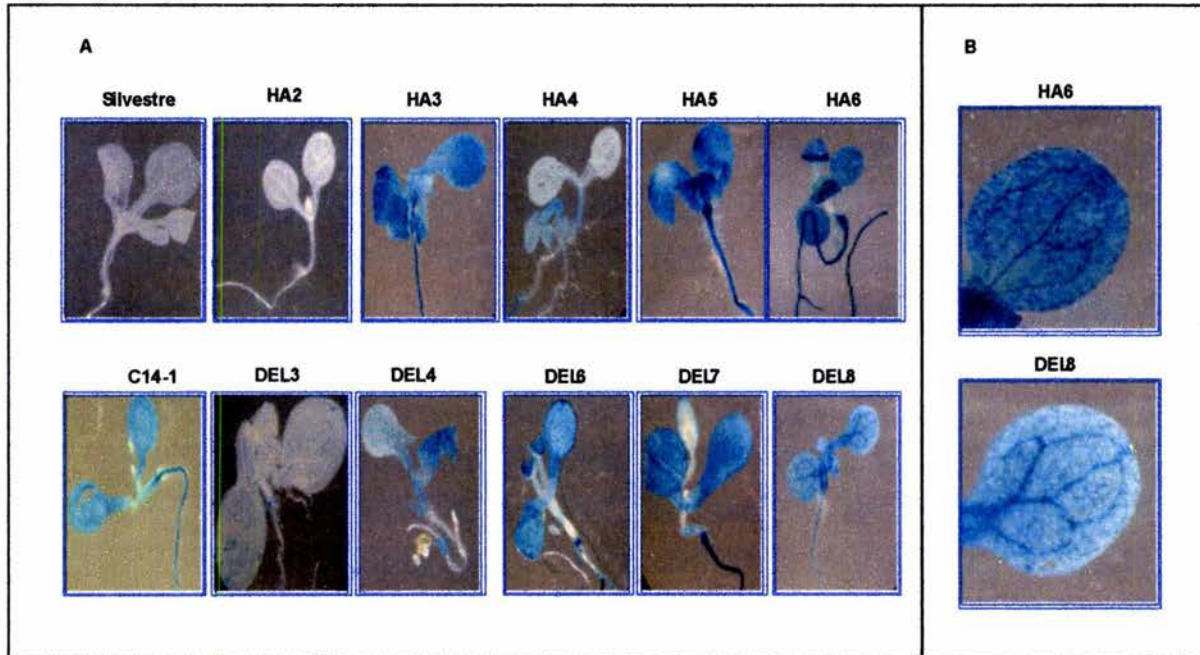


Fig. 14 Expresión de GUS en las plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA

- A) En las plantas transgénicas que tienen la fusión PvLEA18::HA se observa que GUS presenta diferentes niveles de expresión entre las líneas. En la línea HA2 no hay expresión de GUS mientras que en las líneas HA3, HA4, HA5 y HA6 la expresión de GUS es evidente, con una mayor acumulación en HA3, HA5 y HA6. En las líneas con la fusión PvLEA18DEL::HA se aprecia que hay una expresión variable de GUS en todas las líneas, siendo muy baja en las líneas DEL3 y DEL4. Las plantas C14-1 (GUS) y la planta silvestre se utilizaron como controles.
- B) Amplificación de una hoja de las plantas HA6 y DEL8 donde se aprecia una mayor expresión de GUS en el tejido vascular.

III.B.5 Determinación de los niveles de transcrito de PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA en las plantas transgénicas

Al analizar los niveles de mRNA de la PvLEA18::HA por "Northern-blot" se detectó transcrito en plantas de las líneas HA3, HA5 y HA6, en la línea HA6 se detectó un nivel de transcrito ligeramente superior al resto y en la línea HA4 es posible que el nivel del transcrito fuera demasiado bajo para poder ser detectado, en la planta silvestre no se detectó el transcrito (Fig. 15A). Se detectó transcrito de PvLEA18DEL::HA en las líneas DEL3, DEL4, DEL6, DEL7 y DEL8 de las cuales la línea DEL7 presentó un nivel mayor al resto; la línea HA6 se utilizó como control positivo y en la planta silvestre no se detectó mensajero (Fig. 15B).

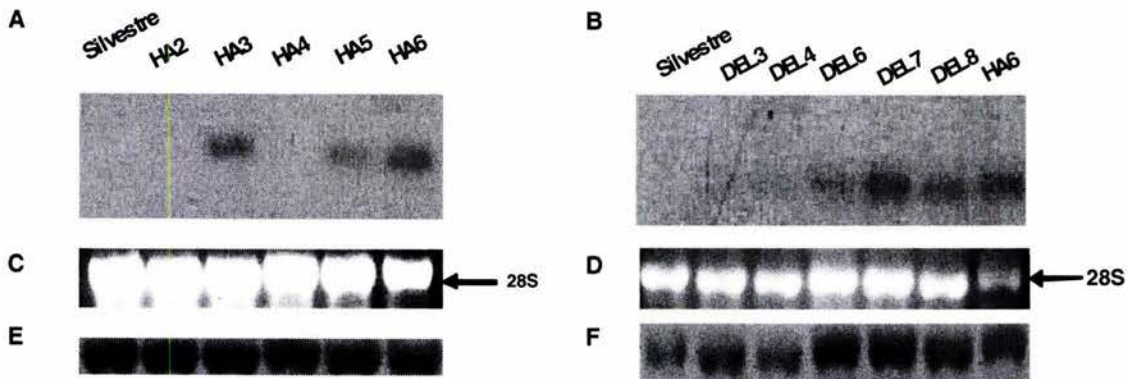


Fig.15 Northern blot de las plantas transgénicas llevando la fusión con HA

- A) Plantas transgénicas con la fusión PvLEA18::HA.** En las líneas HA3, HA5 y HA6 se detectó el transcrito de la PvLEA18, en la línea HA6 se observó el mayor nivel de mRNA. No se detectó transcrito en las líneas HA2 y HA4 y tampoco en la planta silvestre.
- B) Plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18DEL::HA.** Se detectó el transcrito de la PvLEA18DEL en las líneas DEL6, DEL7 y DEL8 de las cuales la línea DEL7 presenta un nivel de transcrito ligeramente mayor al resto de las líneas, mientras que en las líneas DEL3 y DEL4 se aprecia un nivel menor de transcrito. La línea HA6 se utilizó como control positivo y la planta silvestre como control negativo.

Como control de carga se muestra el rRNA 28S teñido con bromuro de etidio (C, D) y la membrana teñida con azul de metileno después de la transferencia (E, F).

III.B.6 Detección de las proteínas PvLEA18 y PvLEA18DEL en plantas transgénicas

Después de analizar los niveles de transcrito en las plantas transgénicas se procedió a determinar los niveles de proteína recombinante, para lo cual se llevaron a cabo experimentos tipo "Western-blot" utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína PvLEA18 o anticuerpos policlonales dirigidos contra el epítipo HA.

Las proteínas se extrajeron utilizando SDS al 5%, sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra la PvLEA18 y contra el epítipo HA no detectaron la proteína posiblemente por actividad proteolítica sobre el extracto. Para evitar dicha degradación, se aislaron proteínas solubles con el método de fenol y precipitación de proteínas solubles con TCA al 20%. Utilizando nuevamente los anticuerpos dirigidos contra la PvLEA18 y contra el epítipo HA no fué posible detectar una señal específica en ninguno de los extractos de plantas transgénicas. Se utilizó el método de revelado por

luminiscencia en sustitución del revelado con fosfatasa alcalina, debido a que permite detectar cantidades mínimas de proteína e intensificar su señal.

La PvLEA18 sí se detectó en los controles positivos utilizados (extracto de semilla de frijol y proteína recombinante de bacteria) (Fig. 16A,B). Un resultado similar se obtuvo al llevar a cabo el mismo análisis en las plantas transgénicas DEL3, DEL4, DEL6, DEL7 y DEL8 (dato no mostrado).

Tampoco fué posible detectar la proteína recombinante al realizar el mismo tipo de análisis sobre las líneas transgénicas obtenidas usando anticuerpos dirigidos contra el epítipo HA (dato no mostrado).

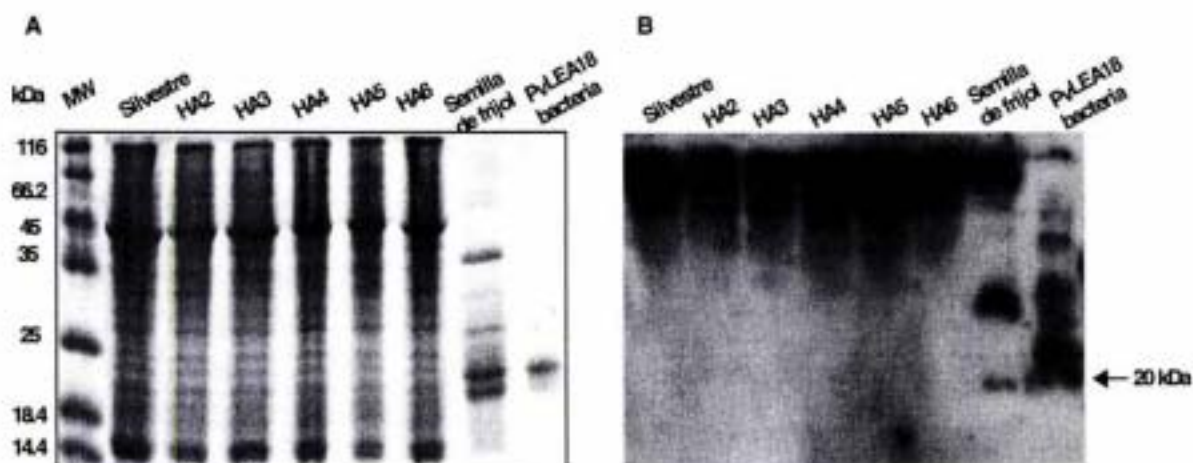


Fig. 16 Western blot de plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::HA

A) Extractos de proteínas solubles de las líneas transgénicas HA2, HA3, HA4, HA5 y HA6 en un gel SDS-PAGE 15% teñidas con azul de Coomassie. Se observa que la cantidad de proteína en todos los extractos es la misma.

B) Western-blot de los extractos de proteínas solubles de las plantas de las líneas transgénicas HA2, HA3, HA4, HA5 y HA6 revelado por luminiscencia. La PvLEA18 no se detectó en los extractos de plantas transgénicas, pero sí fue detectada en los extractos de semilla de frijol y de la proteína recombinante de bacteria. La señal correspondiente a la proteína PvLEA18 muestra un tamaño de 20kDa.

III.C EXPRESIÓN TRANSITORIA EN EPIDERMIS DE CEBOLLA DE LAS PROTEÍNAS PvLEA18 Y PvLEA18DEL FUSIONADAS CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

III.C.1 Obtención de las fusiones *PvLEA18::GFP-GUS* y *PvLEA18DEL::GFP-GUS*

Para lograr la fusión del cDNA de la PvLEA18 y PvLEA18DEL con la región codificante de GFP se amplificaron por PCR los marcos de lectura que codifican para la PvLEA18 y la versión carente de sus primeros 6 aminoácidos utilizando los oligos HOS (Mat. y Met.). La amplificación de estos cDNAs se llevó a cabo de tal manera que al clonarlos en el plásmido binario pCambia 1304 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), quedaran en fase con la fusión GFP-GUS. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el sitio *EcoRV* del vector pKS+, generando los plásmidos pH18 y pH18DEL (Fig. 9A y 17A). Mediante un análisis de restricción con *BglII-EcoRI* se comprobó la construcción de los plásmidos pH18 y pH18DEL. Para ambos plásmidos se obtuvo un fragmento de 260 pb producto de la doble digestión con *BglII-EcoRI* (Fig. 17B), dicho fragmento corresponde al tamaño predicho en el mapa de restricción para los dos plásmidos (Fig. 17A). Para corroborar la identidad de la secuencia de los cDNAs, los plásmidos generados pH18 y pH18DEL se secuenciaron, confirmando la ausencia de cualquier cambio o rearrreglo en la secuencia.

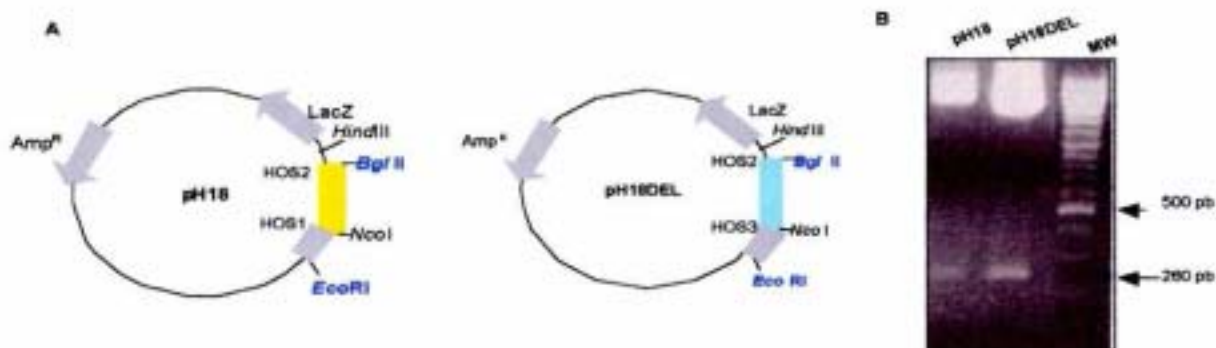


Fig. 17 Mapas de restricción de los plásmidos pH18 y pH18DEL

A) Los plásmidos pH18 y pH18DEL se generaron a partir de la clonación del cDNA de la PvLEA18 y PvLEA18DEL en el sitio *EcoRV* del vector pKS+.

B) La digestión enzimática con *BglII-EcoRI* de ambos plásmidos liberó un fragmento de 260 pb que corresponde con el tamaño predicho en el mapa de restricción.

Para obtener los genes quiméricos PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS, los plásmidos pH18 y pH18DEL se digirieron con las enzimas *NcoI*-*BglII* y el fragmento liberado de 260 pb se subclonó en el sitio *NcoI*-*BglII* del plásmido binario pC1304 (Fig.18A). De esta manera se obtuvo la fusión extremo carboxilo terminal de las proteínas PvLEA18 y PvLEA18DEL con el extremo amino terminal de la fusión GFP-GUS (Fig.18B), generándose de esta forma los plásmidos binarios pCH18 y pCH18DEL. Para determinar que eran correctas las construcciones se llevó a cabo una análisis de restricción con *EcoRI*-*BglII* y *EcoRI*-*NcoI*. Al cortar el plásmido pCH18 con *EcoRI*- *BglII* se liberó un fragmento de 1.07kb; la digestión del plásmido pCH18DEL con *EcoRI*-*NcoI* y *EcoRI*-*BglII* generó dos fragmentos, uno de aproximadamente 800pb y otro de 1.07kb (Fig.18C). Los fragmentos obtenidos después de las digestiones corresponden con el tamaño de los fragmento esperados de acuerdo al mapa de restricción para los dos plásmidos (Fig.18B). Los plásmidos pCH18 y pCH18DEL se utilizaron tanto para expresión transitoria en epidermis de cebolla, como para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la proteína de manera estable (Fig. 9).

III.C.2 Transformación de epidermis de cebolla por bombardeo

Antes de llevar a cabo el bombardeo se determinó la viabilidad de las células de epidermis de cebolla. Con azul de tripano las células muertas se observaron teñidas de azul y con diacetato de fluoresceína (FDA) las células vivas presentaron fluorescencia verde, se encontró que las células mantenían su integridad a las 0, 24 y 48 horas después de ser sembradas en medio MS (Fig.19).

El sistema de transformación transitoria de epidermis de cebolla (*Allium cepa*) se utilizó debido a que las monocapas de la epidermis son fácilmente transformables por bombardeo y el gran tamaño de estas células facilita el monitoreo de la localización subcelular de GFP al microscopio, además de que no hay fluorescencia de otros cromóforos (clorofila). El análisis de la fluorescencia es hecho *in vivo* y la visualización del núcleo no requiere de tinciones adicionales.

Cuando las células de cebolla se transformaron con el plásmido conteniendo la fusión GFP-GUS (pC1304) la fluorescencia de GFP se localizó en el citoplasma, el cual se encuentra en el espacio entre la pared celular y la vacuola (Fig. 20A).

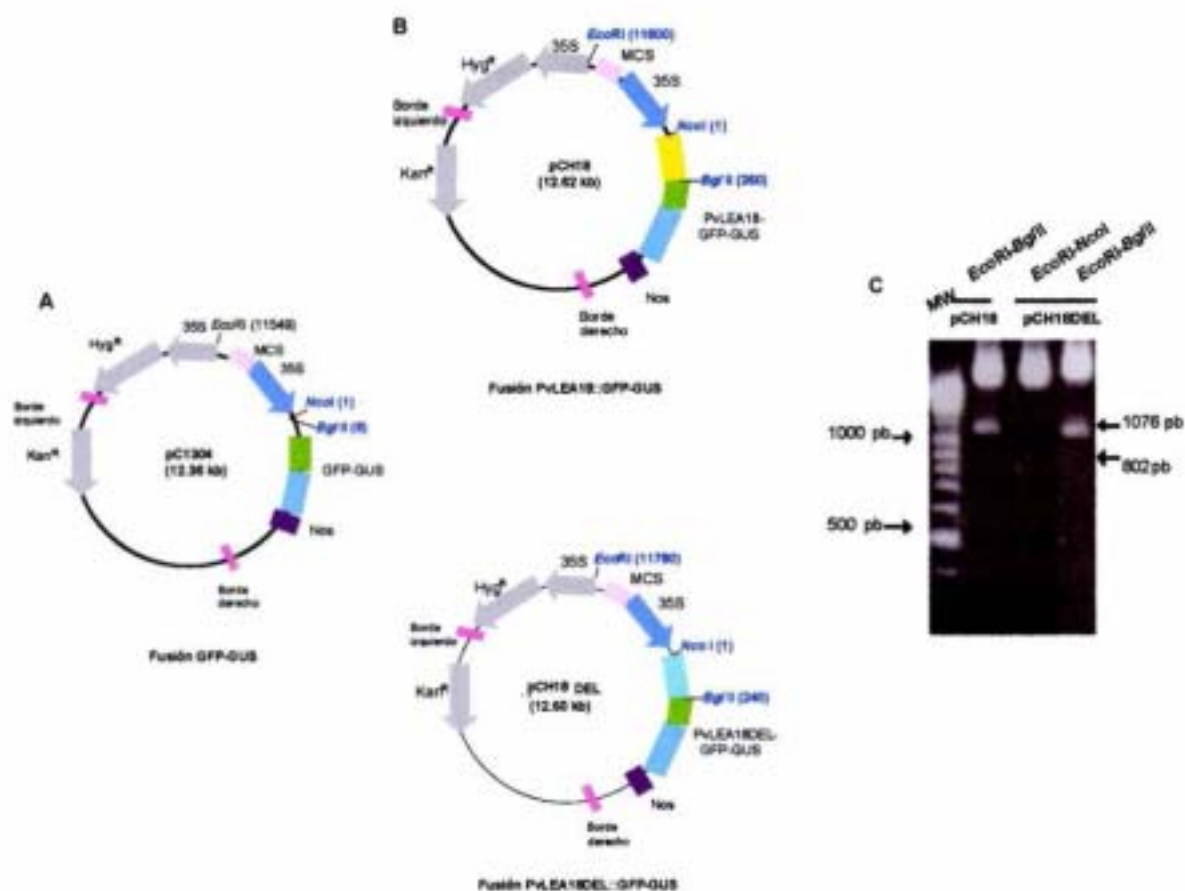
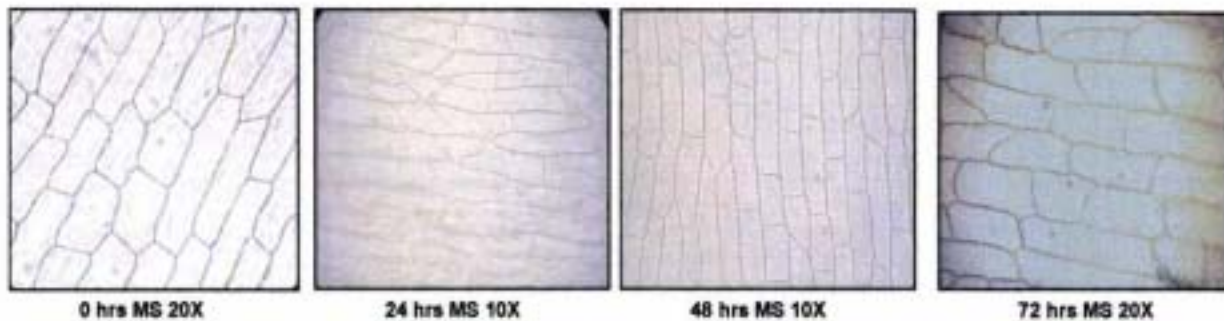


Fig. 18 Mapas de restricción del plásmido binario pC1304 y de los plásmidos pCH18 y pCH18DEL

- A)** Mapa de restricción del plásmido binario pCambia 1304 que posee las secuencias específicas del borde izquierdo y derecho necesarias para la integración del T-DNA. Los bordes izquierdo y derecho se encuentran flanqueando al promotor constitutivo fuerte 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); la región codificante de la *gfp* fusionada en fase con el gen *GUS*; el terminador de nopalina sintasa (*Nos*), un sitio de clonación múltiple (*MCS*) y el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección de planta. Fuera de la región del T-DNA se localiza el gen de resistencia a kanamicina en bacteria. La subclonación de la *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* fue en los sitios *NcoI*-*BglII*.
- B)** Mapas de restricción de los plásmidos *pCH18GFP* y *pCH18DELGFP* que poseen las fusiones *PvLEA18::GFP-GUS* y *PvLEA18DEL::GFP-GUS*.
- C)** Fragmento de 1076 pb obtenido de la digestión del plásmido *pCH18GFP* con *EcoRI*-*BglII*. Las digestiones *EcoRI*-*NcoI* y *EcoRI*-*BglII* del plásmido *pCH18DELGFP* liberaron fragmentos de 802 y 1076 pb, respectivamente.

Las flechas a la derecha indican los tamaños de los fragmentos obtenidos de la digestión y las de la izquierda el de los marcadores de peso molecular.

Azul de tripano (campo claro)



Disacetato de fluoresceína (Fluorescencia)

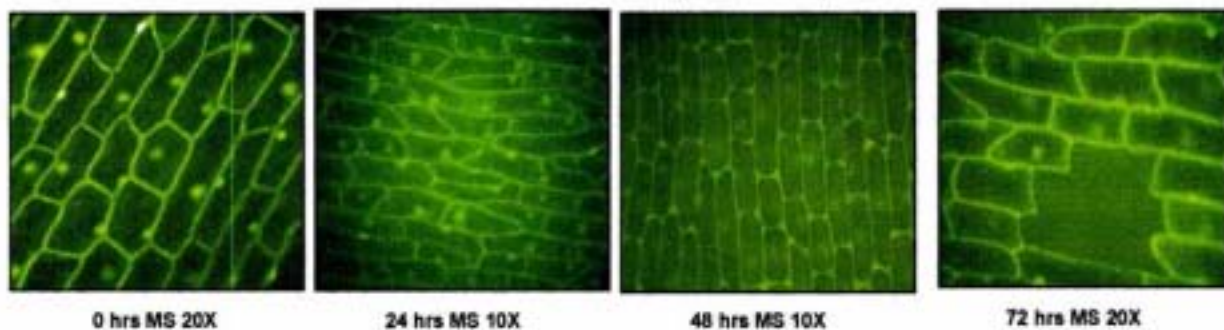


Fig. 19 Ensayo de viabilidad de epidermis de cebolla

Las células mantienen su viabilidad después de estar en el medio MS durante 0, 24 y 48 hrs; no se observan células teñidas por el azul de tripano lo que indica la ausencia de células muertas y las células con fluorescencia verde por el FDA indican su viabilidad. A la derecha se muestran controles de células muertas teñidas con azul de tripano las cuales no presentan fluorescencia con FDA, indicando que son células muertas.

En el caso de las células transformadas con la fusión PvLEA18::GFP-GUS (pCH18) la proteína se localizó en el citoplasma y alrededor del núcleo, en este último la fluorescencia fué muy intensa a su alrededor, lo que dificultó determinar si la fluorescencia se encontraba rodeando al núcleo o si estaba dentro de éste (Fig. 20C).

Cuando se observaron las células transformadas con fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS (pCH18DELGFP) se detectó que la acumulación de fluorescencia se encuentra alrededor del núcleo y en el citoplasma (Fig. 20E).

Considerando que la fusión posee el gen *GUS*, se hizo la tinción histoquímica en las células de epidermis de cebolla transformadas con las construcciones GFP-GUS, PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS para analizar si la fusión se estaba expresando.

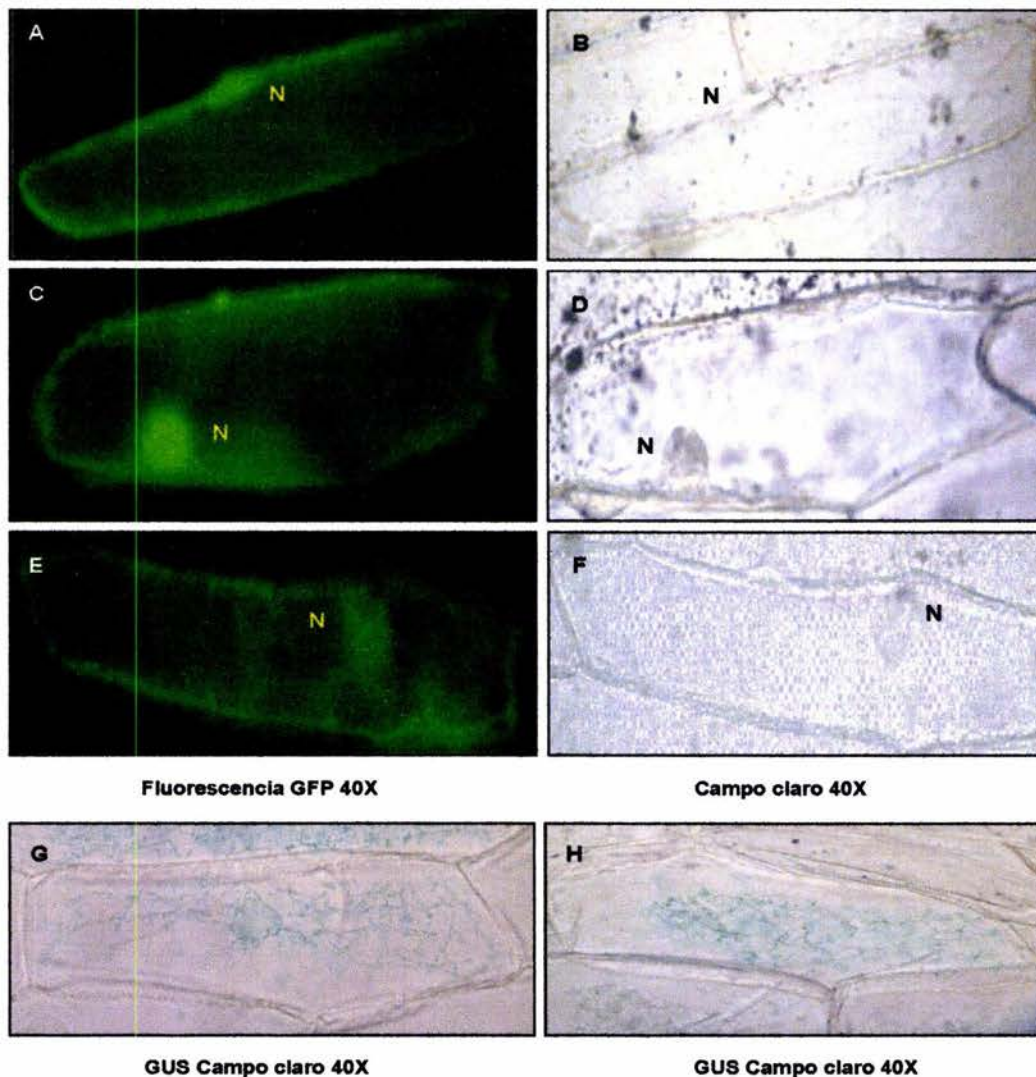


Fig. 20 Expresión transitoria en epidermis de cebolla de las proteínas PvLEA18 y PvLEA18DEL fusionadas a GFP-GUS

(A, B) Localización de la fluorescencia de GFP en una célula transformada con la fusión GFP-GUS (pC1304). La fluorescencia se observa acumulada en el citoplasma replegado hacia la pared celular debido al tamaño de la vacuola de la célula (A). Núcleo, N. En campo claro se aprecia que la célula no presenta plasmólisis (B).

(C, D) En la célula transformada con la fusión PvLEA18::GFP-GUS se observa una acumulación intensa de fluorescencia en el núcleo y en citoplasma (C). Las observaciones de microscopía de fluorescencia no permiten distinguir si la acumulación de la fluorescencia se localiza dentro del núcleo o a su alrededor. En campo claro se aprecia que la célula no presenta plasmólisis (D).

(E, F) Célula transformada con la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS en donde se observa que la acumulación de fluorescencia está alrededor del núcleo y en el citoplasma (E). Se aprecia que la célula no presenta plasmólisis (F). Núcleo, N.

(G, H) Células expresando GUS transformadas con la fusión GFP-GUS (G) y PvLEA18::GFP-GUS (H), en las que se aprecia la presencia de pequeños cristales en su interior.

Como resultado de la tinción histoquímica de GUS se observaron cristales azules en las células que no permitieron determinar la localización precisa de las proteínas (Fig. 20G y H).

III.C.3 Análisis por Microscopía Confocal

Aunque se visualizó la fluorescencia de GFP en las células transformadas, no fué posible determinar con exactitud si estaba asociada al núcleo. Fué por esto que se utilizó el microscopio confocal, ya que las imágenes confocales permiten tener una visualización precisa de las señales de fluorescencia dentro de un plano de enfoque y así determinar con mayor detalle la localización de la fluorescencia en la célula (Messerli and Perriard, 1995). En este caso permitiría distinguir si la fluorescencia de las construcciones con GFP se localizaba dentro del núcleo o si estaba en la periferia del mismo.

Al visualizar las células transformadas con el plásmido control pC1304 en campo claro, se aprecian la integridad de la célula y la ausencia de plasmólisis (Fig. 21C). Con la ventaja que ofrece el microscopio confocal de obtener secciones o cortes ópticos de la muestra, se seleccionó un corte de la célula para observar la fluorescencia de GFP y se encontró que hay una acumulación de proteína en el citoplasma y alrededor del núcleo (Fig. 21A). Cuando todos los cortes ópticos se agrupan forman una proyección de la célula en la que se observa de manera general que la fluorescencia de GFP se localiza en citoplasma (Fig. 21B).

En la visualización confocal de campo claro de la célula transformada con la fusión PvLEA18::GFP-GUS, puede observarse tanto la ubicación del núcleo como la integridad de la célula (Fig. 21F). En la visualización confocal con fluorescencia se detectó una acumulación de proteína en el citoplasma y en la periferia del núcleo, lo que evidencia que la intensa fluorescencia que parecía estar dentro del núcleo (Fig. 20C) era el resultado de la gran acumulación de proteína a su alrededor (Fig.21D). En la proyección de la célula se pueden observar grandes cantidades de proteína en la periferia del núcleo y en el citoplasma (Fig. 21E). En la célula transformada con la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS se observó el mismo patrón de acumulación de

fluorescencia en el citoplasma, presentándose en algunas zonas con mayor intensidad que otras, mientras que en el núcleo no se detectó fluorescencia (Fig. 21G y H).

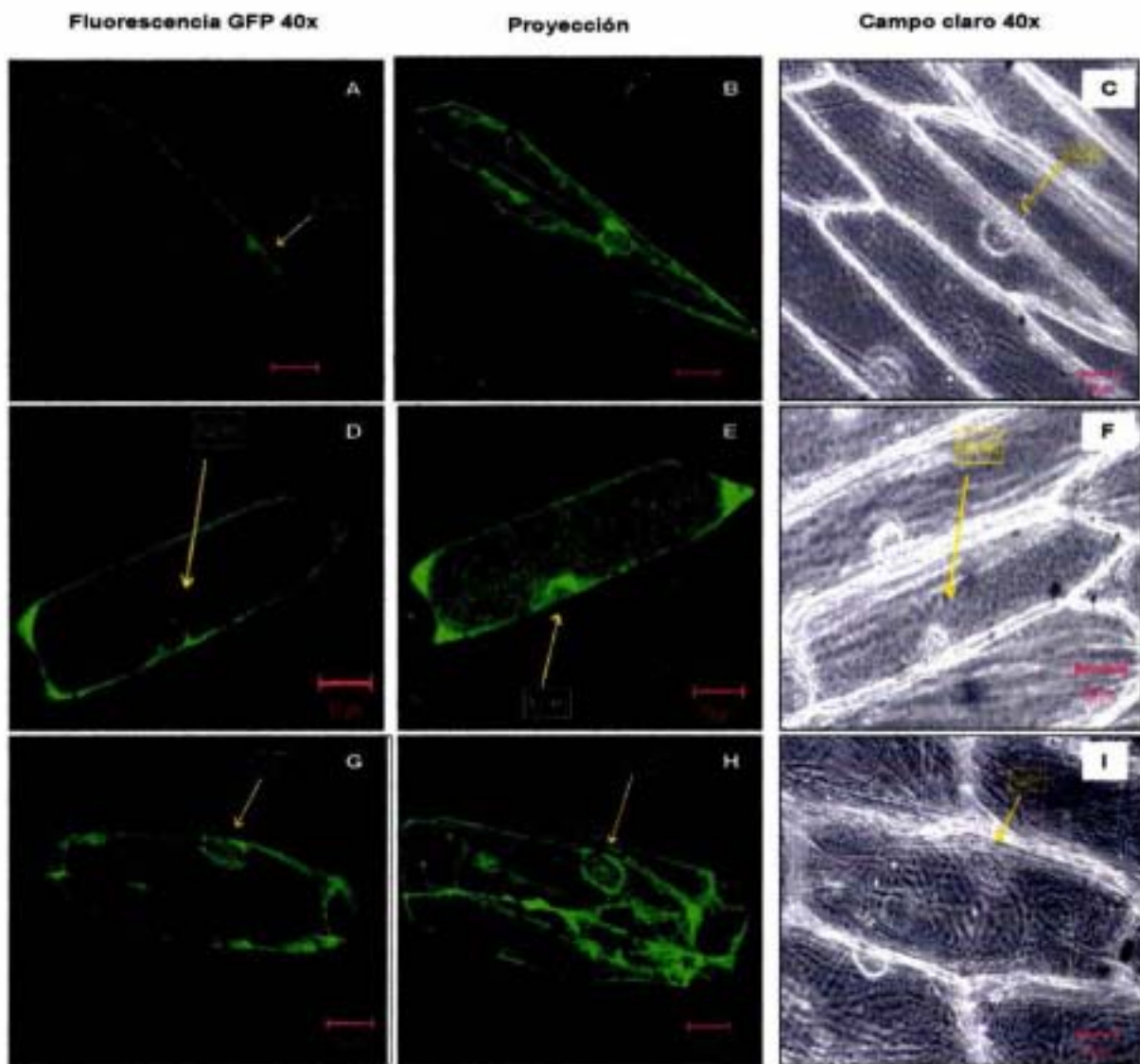


Fig. 21 Visualización confocal de la fluorescencia de GFP de epidermis de cebolla en medio MS

Localización de la fluorescencia de GFP en las células transformadas con las fusiones GFP-GUS (pC1304) (A-C), PvLEA18::GFP-GUS (D-F) y PvLEA18DEL::GFP-GUS (G-I). La visualización en campo claro permite ubicar la posición del núcleo y la integridad de la célula (C,F,I), en la visualización de fluorescencia de un corte óptico de la célula transformada se observa acumulación de fluorescencia alrededor del núcleo y en citoplasma (A,D,G). La proyección tridimensional de la célula muestra la ausencia de fluorescencia dentro del núcleo pero se detecta su acumulación a su alrededor y en el citoplasma (B,E,H).

III.C.4 Efecto de ABA en la localización subcelular

Para establecer si la fitohormona ABA tiene algún efecto sobre la localización de la proteína PvLEA18 en la célula se transformaron epidermis de cebolla con las construcciones pC1304, pCH18, pCH18DEL, para después ser tratadas con ABA durante 24 horas. La visualización confocal en campo claro de las epidermis de cebolla transformadas mostró que el núcleo de las células no se aprecia turgente. De las visualizaciones confocales con fluorescencia se detectó que ésta se encuentra dispersa en la célula con excepción del núcleo que se observa como un hueco oscuro en las células tratadas con ABA (Fig.22).

III.D OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE EXPRESAN DE MANERA ESTABLE LAS FUSIONES DE LA PvLEA18 Y PvLEA18DEL CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

Además de analizar la expresión transitoria de las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS en epidermis de cebolla, se llevó a cabo este análisis en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la proteína de fusión de manera estable. La localización subcelular de la fusiones se hizo mediante la detección de fluorescencia de GFP en la raíz considerando los bajos niveles de autofluorescencia en este tejido.

III.D.1 Selección de plantas transgénicas

La obtención de plantas transgénicas que expresaran la fusión PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS se logró mediante la infiltración de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones pCH18, pCH18DEL y el plásmido binario pC1304. Las plantas transgénicas se seleccionaron con higromicina.

En la Tabla 4 se muestra el número de líneas independientes resistentes a higromicina para las tres construcciones y el número de plantas que expresaron el gen reportero GUS que se encuentra en fase con la región codificante de GFP.

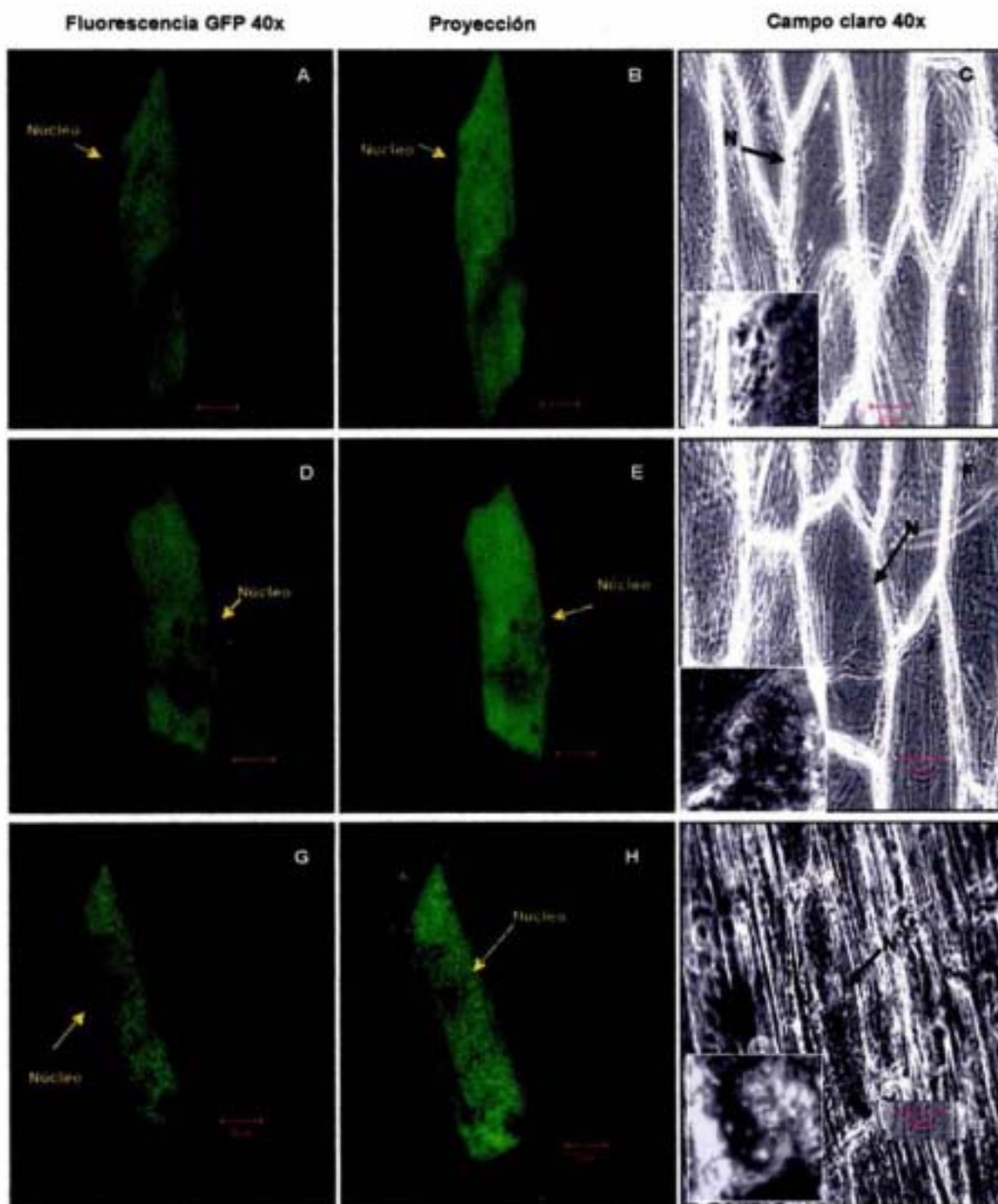


Fig. 22 Visualización confocal de la expresión de GFP en epidermis de cebolla tratadas con ABA 50 μ M

Localización de la fluorescencia de GFP en las células transformadas con las fusiones GFP-GUS (pC1304) (A-C), PvLEA18::GFP-GUS (D-F) y PvLEA18::GFP-GUS (G-I) tratadas con ABA 50 μ M durante 24 hrs. En la visualización en campo claro se puede ubicar la posición del núcleo y la integridad de la célula (C,F,I); en la visualización de fluorescencia de un corte óptico de las células transformadas se observa la fluorescencia dispersa con excepción del núcleo (A,D,G). En la proyección de la célula se aprecia la ausencia de fluorescencia dentro del núcleo (B,E,H). En el recuadro de las figuras C,F e I se muestra una ampliación donde se aprecia el aspecto del núcleo.

Tabla 4. Líneas transgénicas conteniendo la fusión PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS. Se muestra el número de líneas independientes obtenidas a partir de las plantas transformadas, así como el número de plantas que poseen el transgén verificado por PCR y las plantas que expresan GUS.

Construcción	No. Plantas transformadas	No. Semilla T ₀ sembrada	No. Plantas Hyg ^R T ₁	No. Plantas que poseen el transgén <i>PvLEA18DEL</i> (PCR)	No. Plantas que poseen el transgén <i>GUS</i> (PCR)	No. Plantas que expresan GUS
pC1304	20	10000	18		18	18
pC18GFP	20	10000	13	13	13	13
pC18DELGFP	20	10000	7	7	7	7

III.D.2 PCR de plántulas transgénicas

Para confirmar la presencia de los transgenes en las plantas seleccionadas se hicieron reacciones de PCR utilizando el DNA de plantas transgénicas T₂, de la planta silvestre y los oligonucleótidos HOS1, HOS2 y HOS3 con la finalidad de amplificar los genes *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* (Mat. y Met).

Al llevar a cabo el análisis en las 13 líneas que poseen la construcción pCH18 (G0, G8, G9, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G19, G20, G21 y G25) se observó un fragmento cercano a los 300 pb cuyo tamaño correlaciona con el de la secuencia amplificada de la *PvLEA18*, utilizada como control positivo y no se observó ningún fragmento en el producto de PCR de la planta silvestre (Fig. 23A). De manera similar a lo anterior, en las 7 líneas transgénicas con la construcción pCH18DEL (D2, D4, D5, D8, D25, D30 y D50), se observó un fragmento alrededor de los 300 pb cuyo tamaño corresponde a la secuencia amplificada de *PvLEA18DEL* utilizada como control positivo que no está presente en la planta silvestre (Fig. 23B).

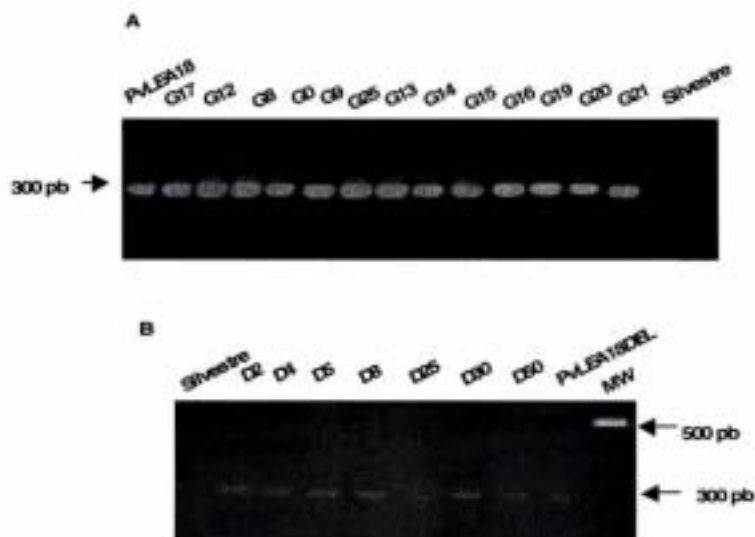


Fig. 23 Detección por PCR de la presencia de los transgenes *PvLEA18::GFP-GUS* y *PvLEA18DEL::GFP-GUS* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

- A) Se detectó un producto de amplificación en las 13 líneas transgénicas para la construcción *PvLEA18::GFP-GUS* el tamaño del fragmento es de ~300 pb. Se utilizó el producto amplificado del cDNA de la *PvLEA18* como control positivo y el DNA de las plántulas silvestres como control negativo.
- B) En las 7 líneas transgénicas para la construcción *PvLEA18DEL::GFP-GUS* se detectó un producto de amplificación cercano a los 300 pb que corresponde con el transgén *PvLEA18DEL*, que no se detectó en la planta silvestre.

III.D.3 Ensayo histoquímico de GUS

Tanto en las líneas que tienen la fusión *PvLEA18::GFP-GUS* como en las que poseen la fusión *PvLEA18DEL::GFP-GUS* se observó que la expresión de GUS presenta variaciones en cuanto a su nivel de expresión entre cada una de las líneas (Fig. 24A). Esta expresión se localiza principalmente en la raíz y en el tejido vascular de la hoja (Fig. 24B). La planta C14 (fusión *GFP-GUS*) se utilizó como control positivo de *GUS*.

III.D.4 Determinación de los niveles de transcrito de las fusiones *PvLEA18::GFP-GUS* y *PvLEA18DEL::GFP-GUS* en plantas transgénicas

Las líneas transgénicas utilizadas en este experimento y en los posteriores fueron G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21 debido a que presentaron niveles altos de transcrito de *PvLEA18::GFP-GUS* y *GUS* (Fig. 25).

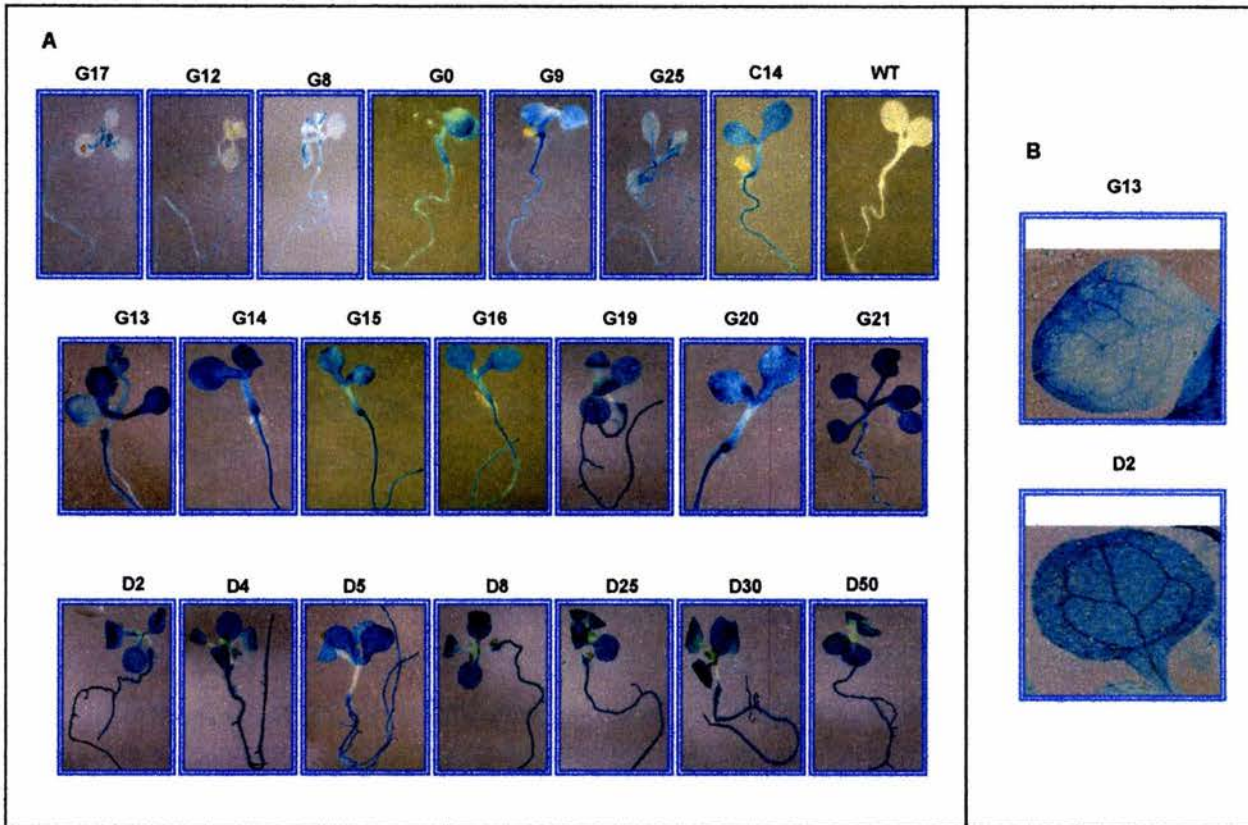


Fig. 24 Expresión de GUS en plantas transgénicas *PvLEA18::GFP-GUS* y *PvLEA18DEL::GFP-GUS*

- A) En las plantas que tienen la fusión *PvLEA18::GFP-GUS*, se observa que la expresión de GUS es variable entre cada una de las líneas. En las líneas en G17, G12, G8, G0, G9 y G25 (arriba) la expresión de GUS es menor respecto a las líneas G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21 (medio). En las plantas que poseen la fusión *PvLEA18DEL::GFP-GUS* (abajo) se aprecia que hay una expresión de GUS homogénea en todas las líneas. Las plantas C14 (fusión *GFP-GUS*) y la planta silvestre se utilizaron como controles positivo y negativo del ensayo histoquímico de GUS.
- B) Amplificación de una hoja de las plantas de las líneas G13 y D2 donde se aprecia la acumulación de GUS en el tejido vascular.

Al analizar los niveles de mRNA de la *PvLEA18* por "Northern-blot" se detectó transcrito en las líneas G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21 (Fig. 25A), mientras que en las líneas G17, G12, G8, G0, G9 y G25 no se detectó mensajero ni en la planta silvestre ni en la planta control de *GUS* C14 (fusión *GFP-GUS*). Como control positivo de la *PvLEA18* se utilizó el mRNA de la línea HA6, en la que anteriormente se había detectado el transcrito (Fig. 25A).

Se detectó el transcrito de *PvLEA18DEL::GFP-GUS* en las líneas D2, D4, D5 y D8, de las cuales la línea D4 presentó un mayor nivel de mensajero y no se detectó transcrito en la planta silvestre ni en la planta control C14. El tamaño del transcrito se localizó entre los marcadores moleculares de 2500-3000 pb, lo que confirma un tamaño similar al esperado de 2812 pb (*PvLEA18*, 246 pb, *GFP*, 728 pb, *GUS*, 1838 pb).

Cuando se utilizó la región codificante de *GUS* como sonda se detectaron niveles variables de transcrito en las todas las líneas transgénicas, siendo mayor las líneas G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21 y en las líneas D2, D4, D5, D8, D25, D30 y D50 (Fig. 25B).

Los niveles de transcrito de *GUS* correlacionan con los nivel de expresión de *GUS* observada en las plantas (Ver Fig. 24).

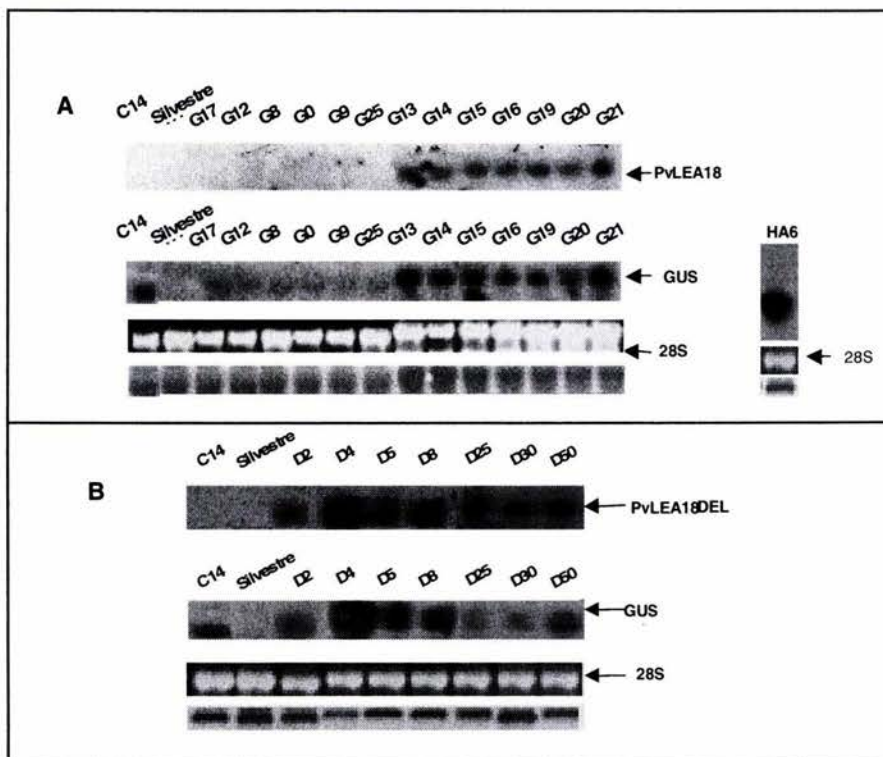


Fig. 25 Northern blot de plantas transgénicas que poseen la fusión GFP-GUS

A) Plantas transgénicas expresando la fusión *PvLEA18DEL::GFP-GUS* y **B)** la fusión *PvLEA18DEL::GFP-GUS*. Se detectó transcrito en las líneas transgénicas G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21 y en las líneas D2, D4, D5, D8, D25, D30 y D50. La planta silvestre y la línea C14 se utilizaron como controles negativos; y la línea HA6 se utilizó como control positivo. El transcrito de *GUS* se detectó en todas las líneas transgénicas y no se detectó mensajero en la planta silvestre.

III.E DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS

Una vez detectado el transcrito de PvLEA18 y PvLEA18DEL en las plantas transgénicas que poseen las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS, se empleó la técnica de "Western-blot" con el anticuerpo dirigido contra la PvLEA18 para detectar la proteína en extractos de proteínas solubles obtenidos mediante precipitación con TCA. El tamaño esperado de la proteína de fusión PvLEA18::GFP-GUS es de 102.8kDa, (PvLEA18, 8.8kDa, GFP, 27kDa, GUS, 67kDa).

El anticuerpo dirigido contra la PvLEA18 detectó una proteína de 102 kDa en los extractos proteicos de las líneas G13, G14, G15, G16, G19, G20 y G21, y no se detectó ninguna proteína en los extractos de la planta silvestre y la planta C14. Como control de carga se muestran geles teñidos con azul de Coomassie (Fig. 26A).

En los extractos de las líneas transgénicas D2, D4, D5, D8, D25, D30 y D50 el anticuerpo dirigido contra la PvLEA18DEL detectó una proteína de 102 kDa que no se detecta en el extracto de la planta silvestre o en la planta C14 (Fig. 26B). Se utilizó el extracto de semilla de frijol como control positivo de la proteína PvLEA18, que se detecta con un peso molecular diferente al esperado (20kDa) debido al desfaseamiento en el tiempo de migración respecto al resto de los extractos.

III.E.1 Detección de fluorescencia de GFP en pelos radiculares de plantas transgénicas

La observación de los pelos radiculares de plantas de *Arabidopsis thaliana* en el microscopio confocal es particularmente conveniente debido a que poseen muy poca autofluorescencia, permitiendo distinguir la acumulación de GFP claramente.

Para evaluar el efecto del estrés por deshidratación y la fitohormona ABA sobre la localización subcelular de la proteína PvLEA18 y su forma truncada, se procedió a determinar la localización de las proteínas PvLEA18 y PvLEA18DEL en los pelos radiculares bajo tres condiciones: control (medio MS), estrés por deshidratación (PEG 25%) y ABA 50 μ M. Las líneas que se utilizaron en estas tres condiciones fueron C14, G13 y D2, debido a que presentaron un alto nivel de expresión de GUS de acuerdo a la

tinción histoquímica de GUS de la plantas transgénicas (Fig.24) y a que las proteínas habían sido detectadas por el anticuerpo en los extractos.

Después de los tratamientos se analizó la fluorescencia de GFP en los pelos radiculares y para contrastar los núcleos se tiñeron con DAPI.

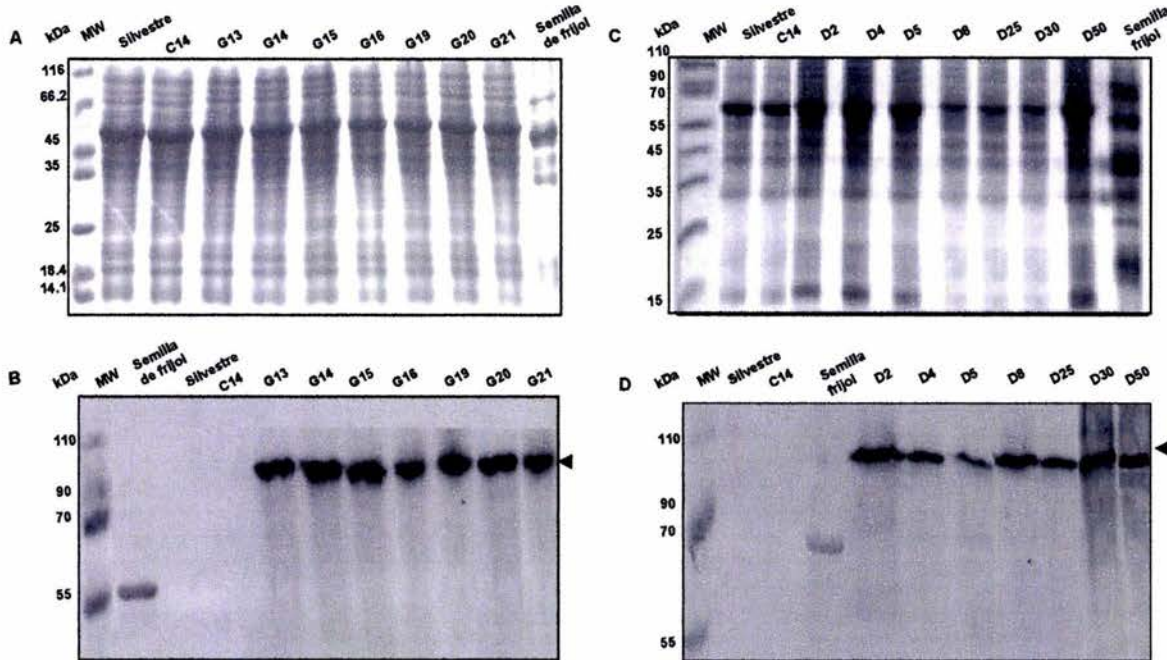


Fig. 26 Western blot de plantas transgénicas expresando la fusión PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS

A y C) Gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. En el gel se observan las cantidades de proteína de los extractos de las diferentes líneas transgénicas, así como de los controles (silvestre, semilla de frijol y C14).

B y D) El anticuerpo dirigido contra la PvLEA18 y PvLEA18DEL detectó a la proteína de fusión de 102 kDa en los extractos proteicos de las plantas con las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS, dicha proteína no se detecta en los extractos de la planta silvestre ni en la línea C14 pero sí en semilla de frijol. Marcador de peso molecular, MW.

En la Figura 27 se presenta la imagen de pelos radiculares de la planta silvestre donde se aprecia un nivel muy bajo de autofluorescencia.

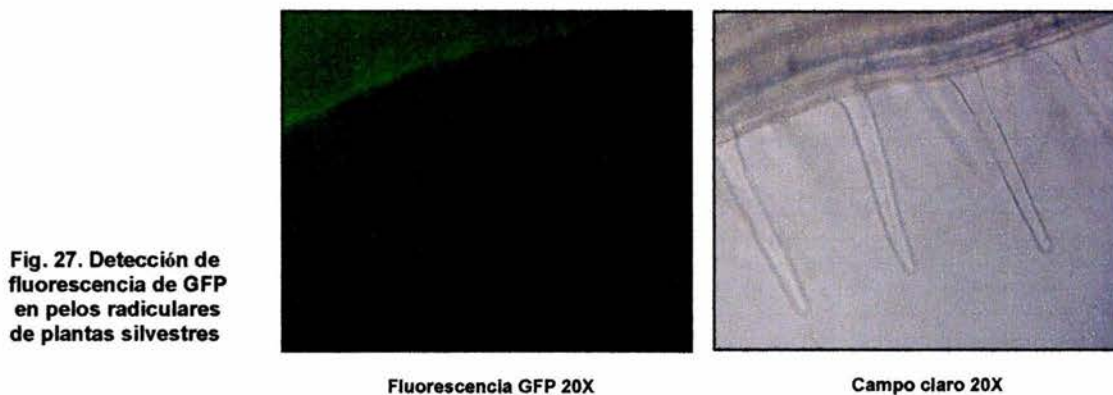


Fig. 27. Detección de fluorescencia de GFP en pelos radiculares de plantas silvestres

Fluorescencia GFP 20X

Campo claro 20X

El análisis de los pelos radiculares de la planta que posee la fusión PvLEA18::GFP-GUS en MS y en los tratamientos con PEG 25% y ABA 50 μ M mostró que no se detecta fluorescencia de GFP en los núcleos en ninguna de las condiciones.

En la Fig. 28A, B, C se muestra que los núcleos teñidos con DAPI no poseen fluorescencia debida a GFP. De manera similar, en los pelos radiculares de las plantas que poseen la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS la fluorescencia de GFP no se detectó en el núcleo en medio MS, PEG o ABA (Fig. 29).

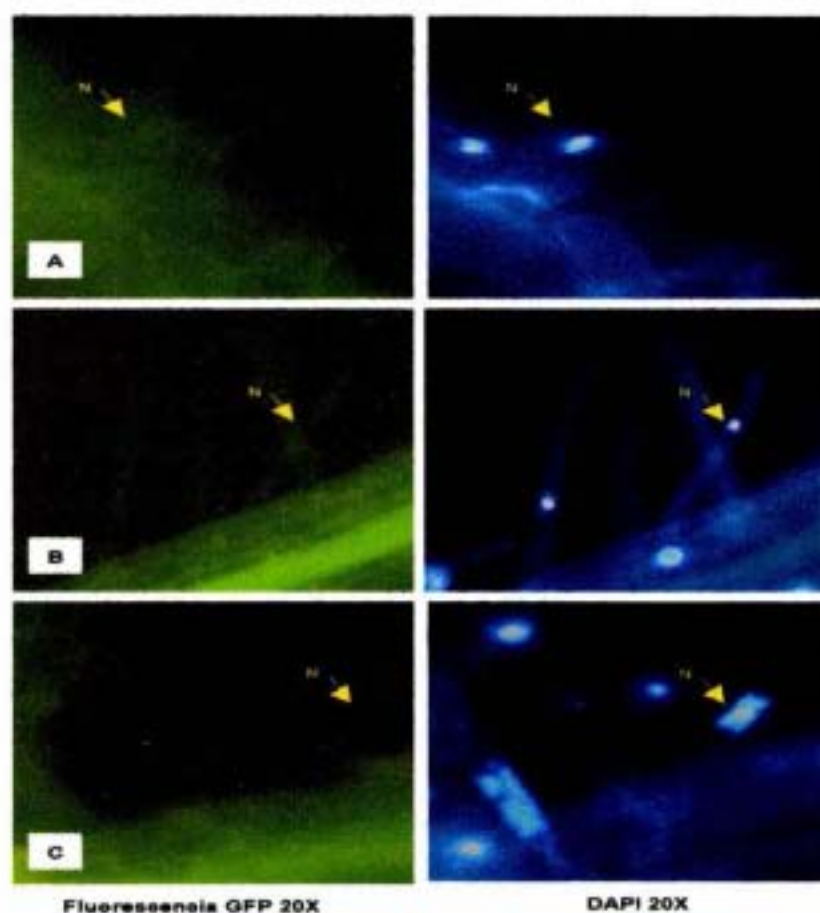


Fig. 28 Pelos radiculares de plantas transgénicas expresando la fusión PvLEA18::GFP-GUS

Pelos radiculares tratados con: A) MS, B) PEG 25% y C) ABA 50 μ M. La fluorescencia no se localiza en el núcleo en ninguna de las condiciones. Los núcleos se tificaron con DAPI para ubicar su posición en los pelos radiculares. Con flechas se señala la posición de los núcleos, N.

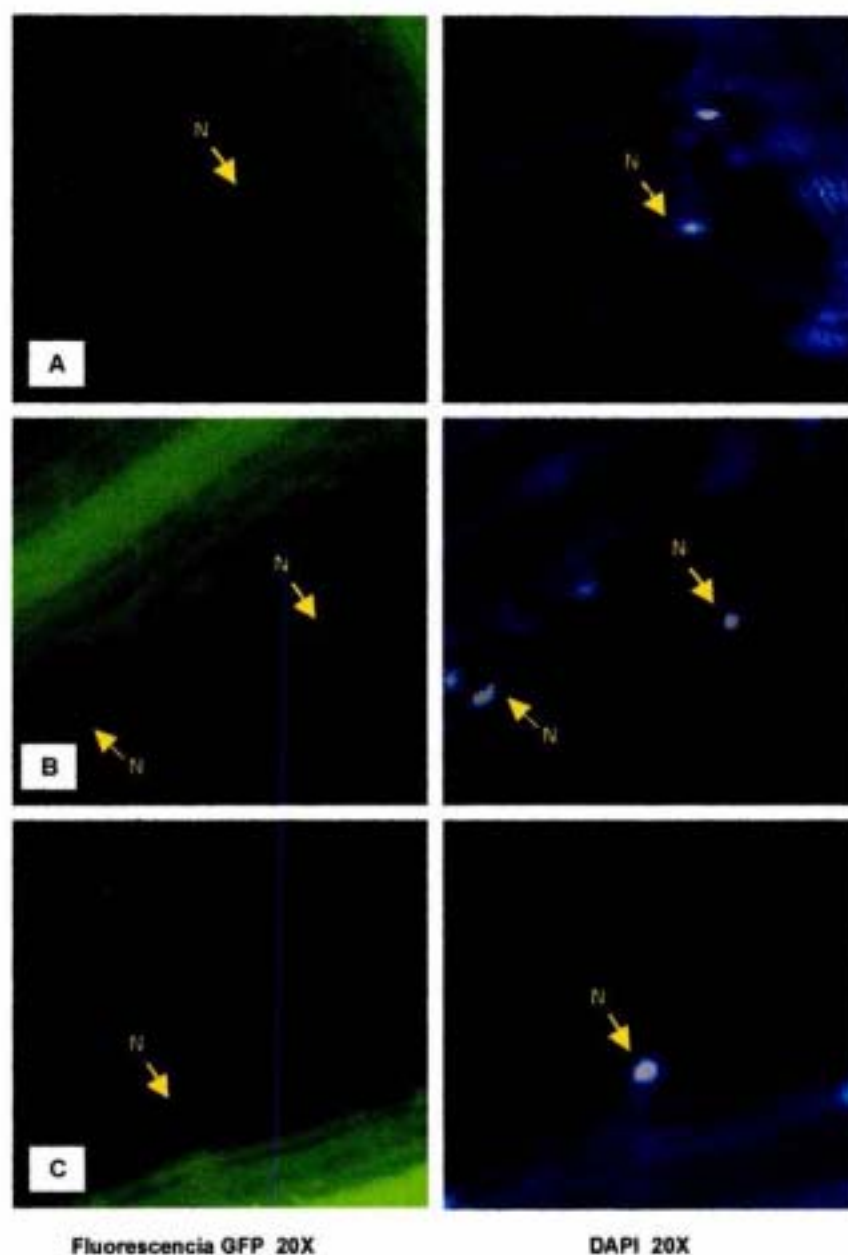


Fig. 29 Pelos radiculares de plantas transgénicas expresando la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS

Pelos radiculares tratados con: **A)** MS, **B)** PEG 25% y **C)** ABA 50µM. No se detectó fluorescencia en el núcleo. Los núcleos se tiñeron con DAPI para ubicar su posición en los pelos radiculares. Con flechas se señala la posición de los núcleos, N.

En los pelos radiculares de la planta C14 (fusión GFP-GUS) en medio MS y en los tratamientos con PEG 25% y ABA 50µM no se detectó fluorescencia de GFP en los núcleos teñidos con DAPI (Fig.30).

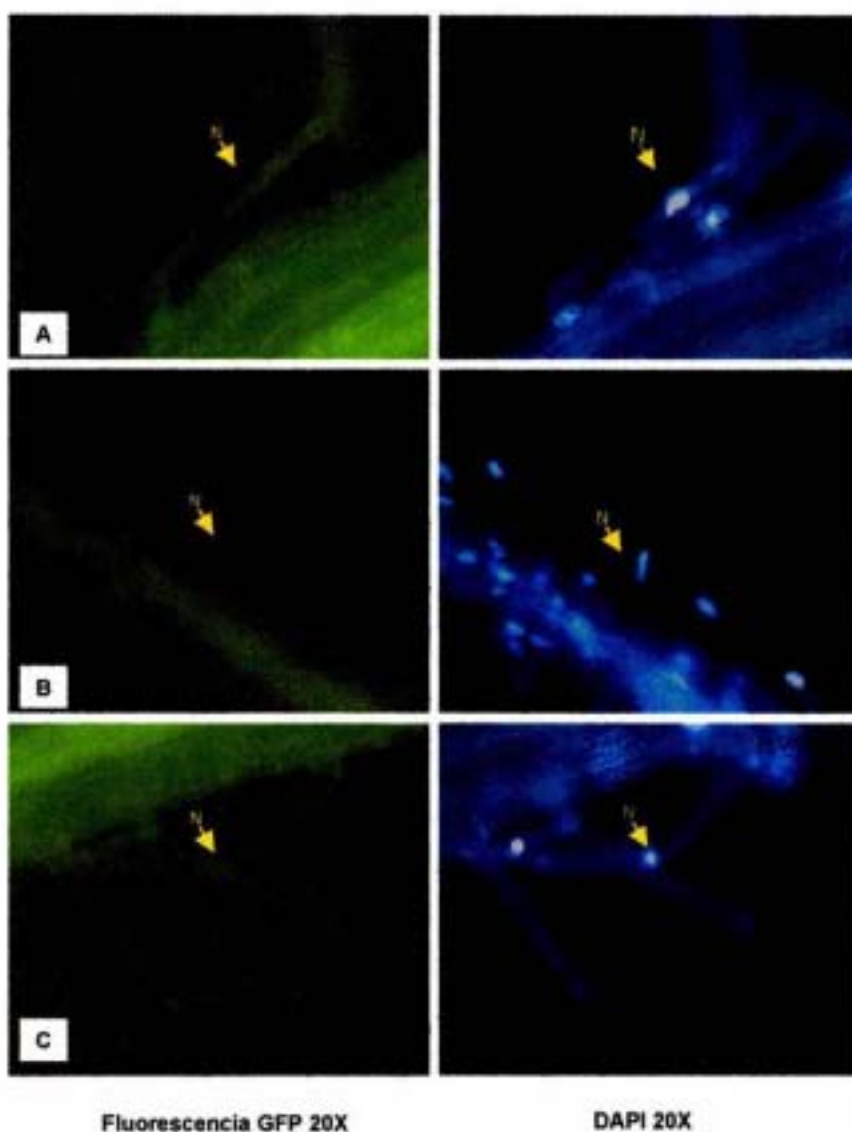


Fig. 30 Pelos radiculares de plantas transgénicas expresando la fusión GFP-GUS (pC1304)

En los pelos radiculares tratados con: A) MS, B) PEG 25% y C) ABA 50 μ M no se detectó fluorescencia de GFP en los núcleos teñidos con DAPI. Con flechas se señala la posición de los núcleos, N.

La visualización de los pelos radiculares de las plantas transgénicas mostró que no se detectó fluorescencia de GFP en el núcleo cuando los pelos se encontraban en medio MS y en los tratamientos con PEG 25% y ABA 50 μ M. Para confirmar estos datos también se analizó la zona de la raíz que presenta una alta tasa de división celular esperando la presencia de una cantidad considerable de núcleos.

III.E.2 Microscopía confocal de raíces de plantas transgénicas

Se seleccionaron las líneas G13 y D2 para realizar las observaciones en el microscopio confocal de la zona de la punta de la raíz. Para ello se crecieron plantas de cada una de las líneas G13 y D2, utilizando como control plantas de la línea C14 y plantas silvestres. Una vez que las plantas cumplieron dos semanas de edad fueron sometidas a tres tratamientos. Dichos tratamientos consistieron en mantener a las plantas bajo condiciones control (medio MS líquido), PEG al 25% (deshidratación) y en 50 μ M de ABA durante 24 horas.

En la Figura 31 se muestra la visualización confocal en campo claro y fluorescencia de la punta de la raíz de una planta silvestre en la zona de división celular. En la planta silvestre en medio MS se observaron niveles muy bajos de autofluorescencia, de hecho ésta se localizó en la punta de la cofia mientras que en el resto de las células de la punta de la raíz no se detectó fluorescencia. En las plantas tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M también se observaron mínimos niveles de fluorescencia alrededor de la misma zona (Fig.31).

La visualización confocal con fluorescencia de las puntas de las raíces de las plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::GFP-GUS (línea G13) tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M, reveló que la fluorescencia se localiza en el citoplasma, esta misma localización de la proteína se observó en las plantas que se encontraban en medio MS (Fig.32). Los espacios negros que se observaron corresponden a los núcleos sin fluorescencia. La acumulación de fluorescencia de GFP en el citoplasma mostró la localización de la proteína de fusión.

En la visualización confocal de las puntas de las raíces de las plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS (línea D2) tratadas con MS, PEG 25% y ABA 50 μ M, se observó que la fluorescencia de GFP se localiza en el citoplasma, los espacios negros observados corresponden a los núcleos sin fluorescencia (Fig.33). Las imágenes confocales de fluorescencia confirmaron que en estas plantas transgénicas la proteína de fusión se localiza en el citoplasma de las células sometidas a los tratamientos con MS, PEG y ABA.

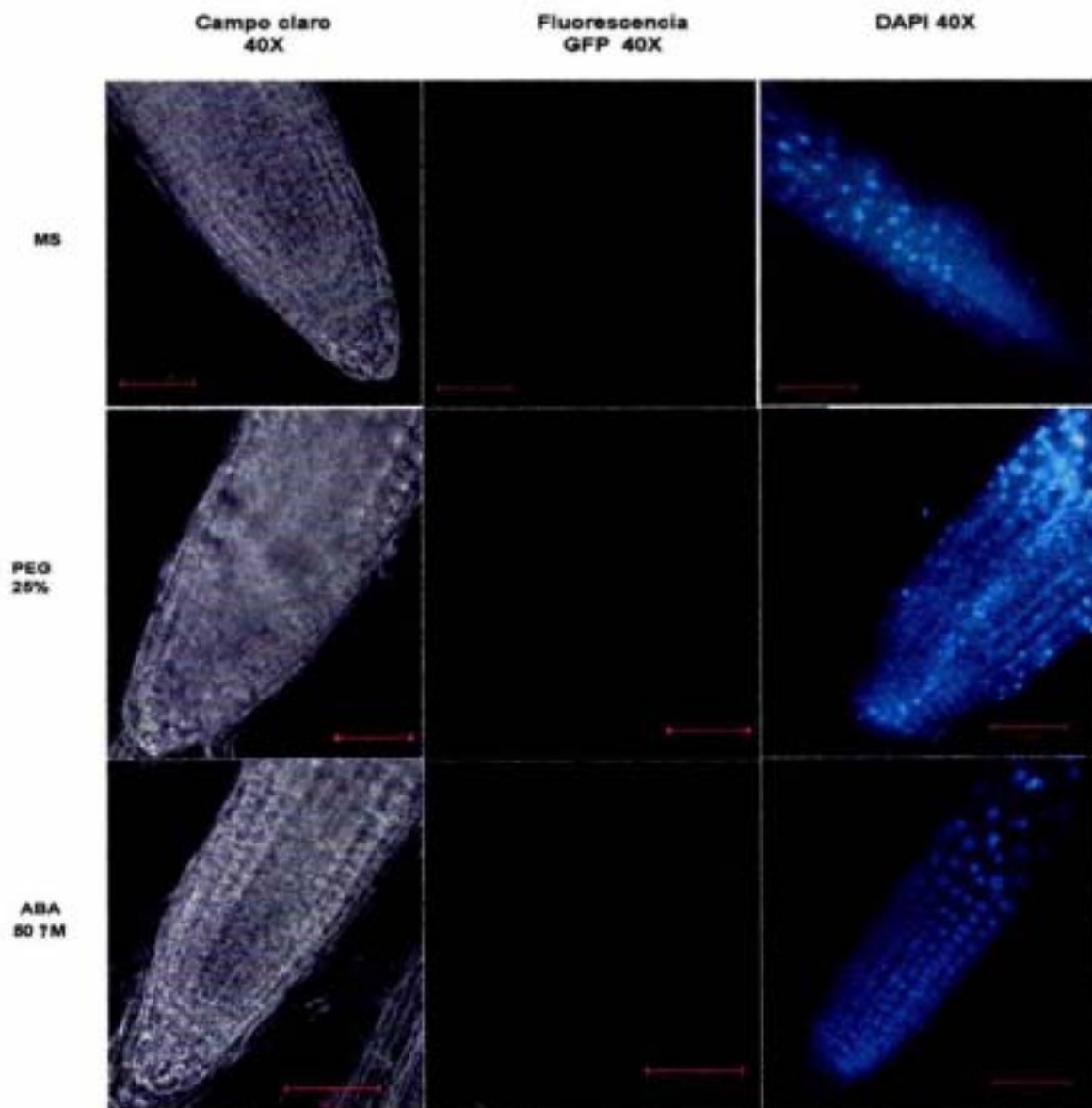


Fig. 31 Detección de fluorescencia en la zona de división celular de raíces de plantas silvestres

Se muestra la zona de división celular en las raíces de plantas silvestres en medio MS y tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M durante 24 hrs. La autofluorescencia se localiza en la zona de la punta de la coifa. Los núcleos teñidos con DAPI se visualizan como puntos azules fluorescentes.

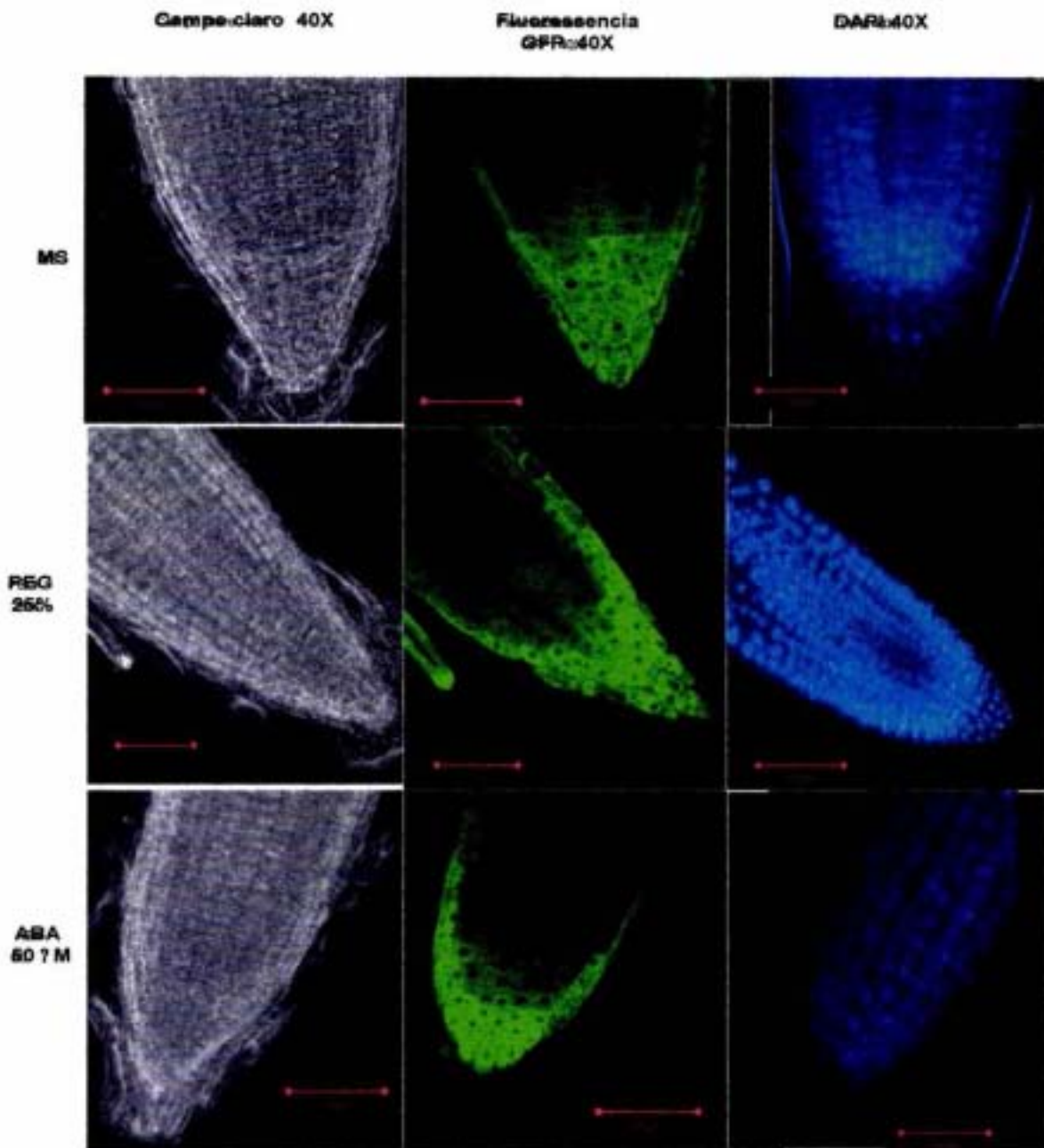


Fig. 32 Detección de fluorescencia de GFP en la zona de división celular de raíces de plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::GFP-GUS

Se muestra la zona de división celular de las raíces de plantas transgénicas en medio MS y tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M durante 24 hrs. La fluorescencia de GFP se localiza en el citoplasma de las células de la epidermis y de la columela, lo que revela la ausencia de proteína en los núcleos que se observan como huecos oscuros. Los núcleos teñidos con DAPI se visualizan como puntos azules fluorescentes.

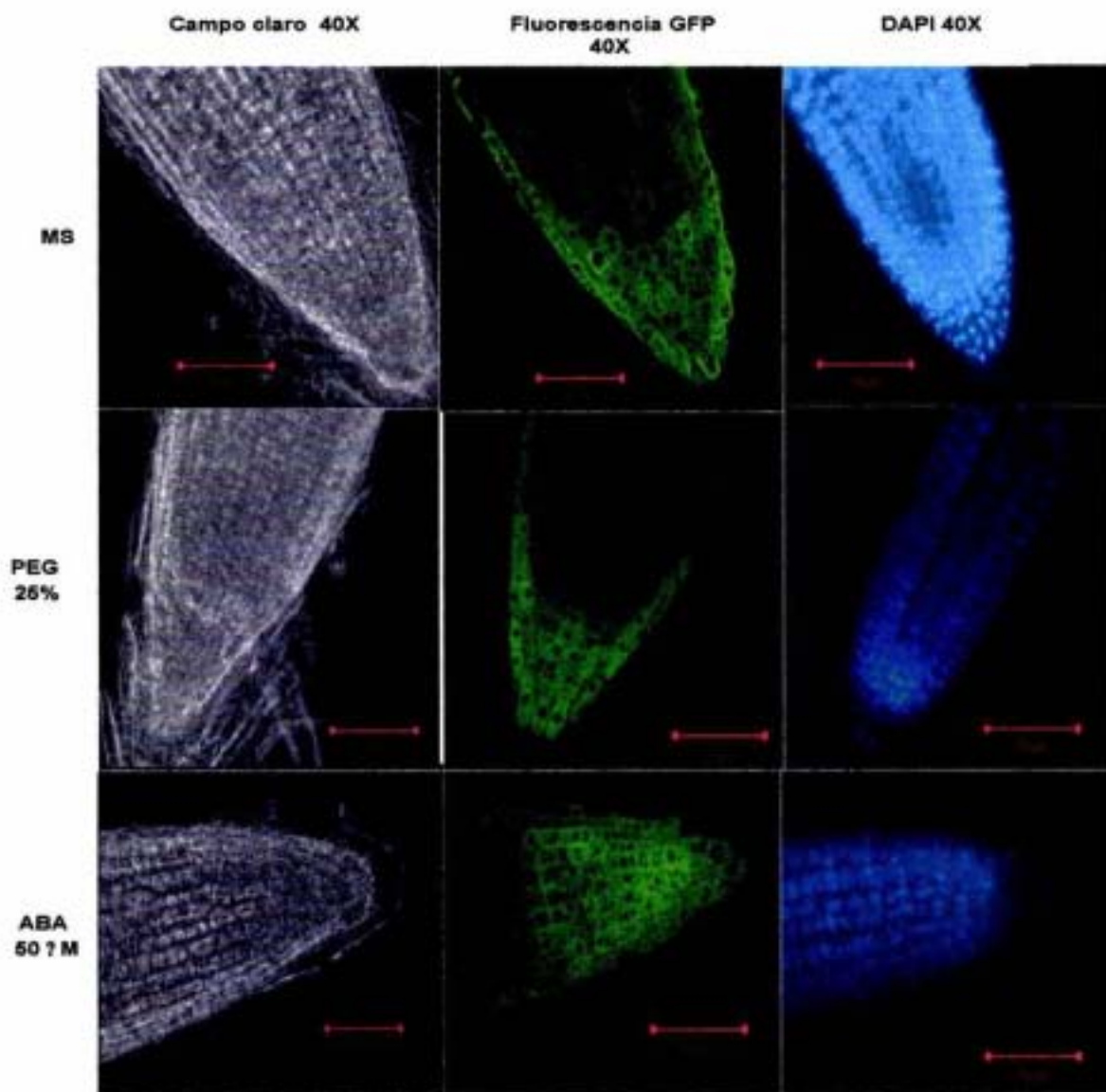


Fig. 33 Detección de fluorescencia de GFP en la zona de división celular de raíces de plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18DEL::GFP-GUS

Se muestra la zona de división celular de la raíz de plantas transgénicas en medio MS y tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M durante 24 hrs. La fluorescencia de GFP se localiza en el citoplasma de las células de la epidermis y columela, mostrando la ausencia de proteína en los núcleos que se observan como huecos oscuros. Los núcleos teñidos con DAPI se visualizan como puntos azules fluorescentes.

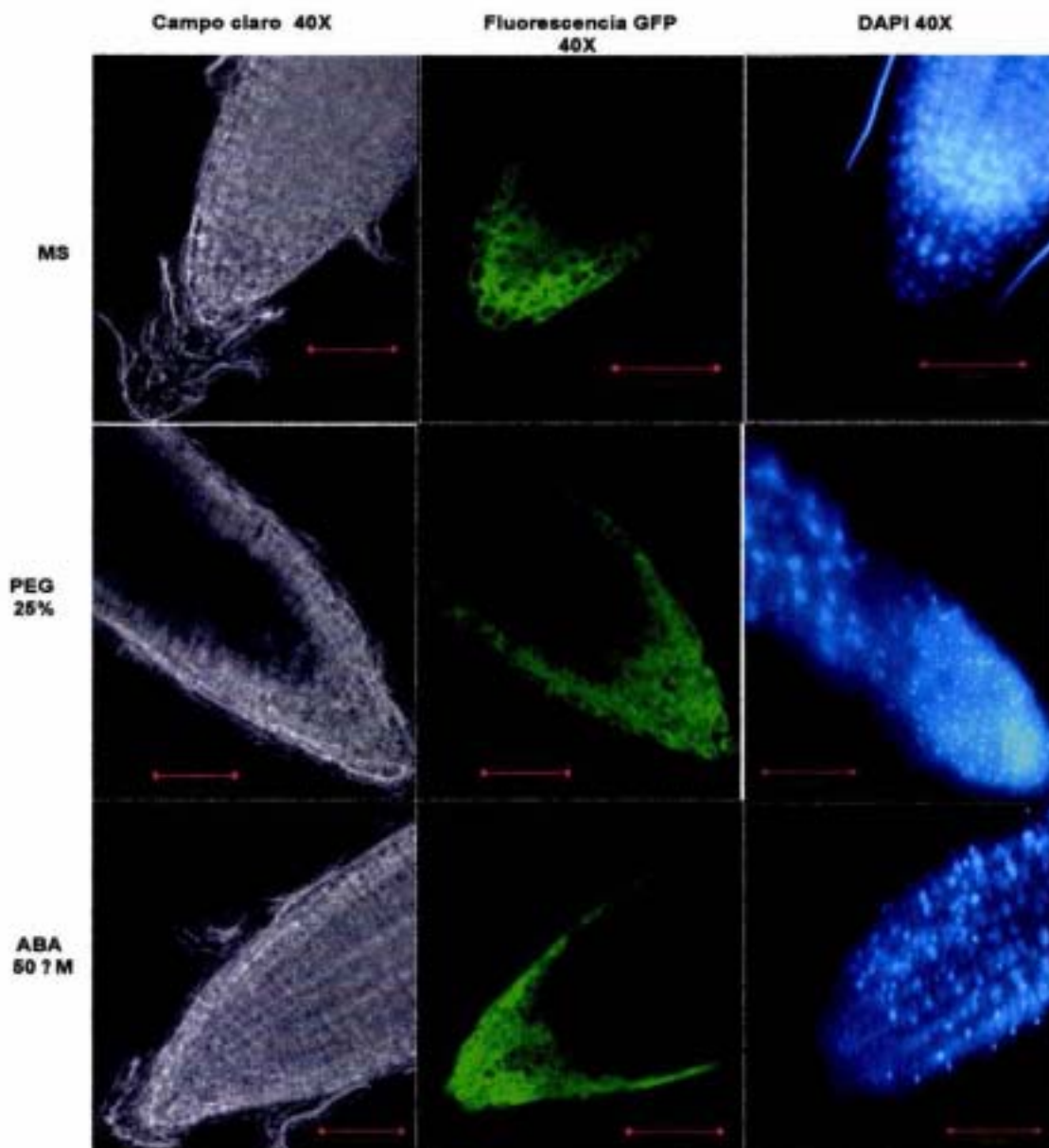


Fig. 34 Detección de fluorescencia de GFP en la zona de división celular de raíces de plantas transgénicas que poseen la fusión GFP-GUS (pC1304)

Se muestra la zona de división celular de las raíces de plantas transgénicas en medio MS y tratadas con PEG 25% y ABA 50 μ M durante 24 hrs, la fluorescencia de GFP se localizó en el citoplasma de las células de la epidermis y colmuela, mostrando la ausencia de proteína en el núcleo (huecos oscuros), los cuales se tiñeron con DAPI para visualizarlos como puntos azules fluorescentes.

Las visualizaciones confocales de la zona de la punta de la raíz mostraron que las proteínas de fusión PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS (102kDa) se localizan en el citoplasma (Fig. 32, 33). En las plantas transformadas con el plásmido pC1304, la fluorescencia debida a GFP también se localizó en el citoplasma de las células en las condiciones de MS, PEG y ABA (Fig. 34).

III.F LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PvLEA18 EN SEMILLAS DE FRIJOL

La localización subcelular de las fusiones PvLEA18::GFP-GUS y PvLEA18DEL::GFP-GUS mostró que la proteína PvLEA18 se localiza en el citoplasma y que la NLS propuesta en su secuencia no tiene un papel de señalización al núcleo.

Sin embargo, debido al tamaño pequeño de la PvLEA18, ésta podría ser transportada al núcleo por un mecanismo de difusión, el cual se impidió cuando se hizo la fusión de la proteína con GFP-GUS ya que se incrementó su tamaño (de 8.8kDa a 102 kDa) impidiendo el transporte al núcleo. Con la idea de que la fusión con GFP-GUS impidió el transporte de la PvLEA18 al núcleo, se decidió detectar a la proteína PvLEA18 en fracciones subcelulares de semilla de frijol con la finalidad de detectar con anticuerpos a la proteína PvLEA18.

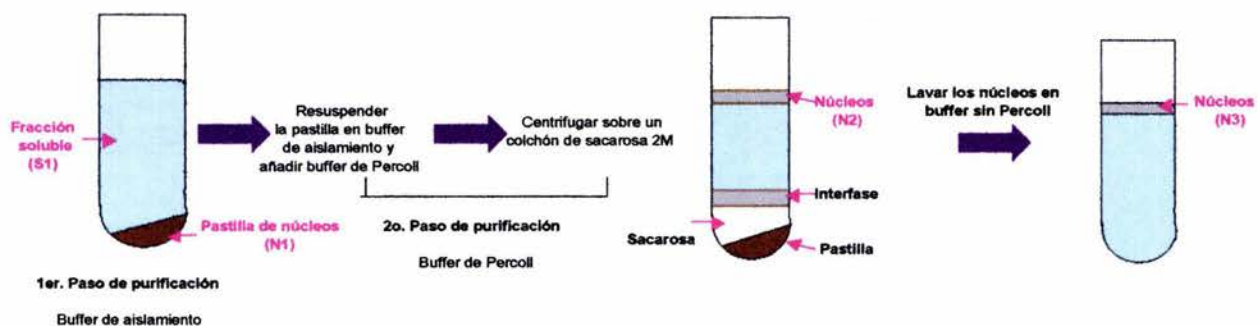


Fig. 35 Aislamiento y purificación de núcleos de semilla de frijol

Protocolo para aislar núcleos de ejes embrionarios de frijol, los núcleos se recuperaron de cada una de las fracciones señaladas de las cuales se extrajeron las proteínas solubles para ser analizadas por un Western blot.

Los núcleos de los ejes embrionarios de frijol se aislaron siguiendo el protocolo de Goday *et al* (1994). Se recuperó la fracción soluble S₁ y las fracciones nucleares N₁, N₂ y N₃ (Fig. 35), en las cuales se verificó la integridad de los núcleos por DAPI. De cada una de las fracciones nucleares se extrajeron las proteínas solubles y se precipitaron con TCA.

La inmunodetección de la proteína PvLEA18 muestra que el anticuerpo inmunopurificado detecta una proteína de 20kDa en la fracción S₁, en la pastilla N₁ y en las fracciones N₂ y N₃ en donde se pueden distinguir dos bandas de bajo peso molecular. Como controles positivos se utilizaron el extracto proteico de semilla de frijol obtenido con TCA, la proteína recombinante de bacteria de la PvLEA18 y el extracto proteico de frijol en buffer de Laemli (Fig. 36B). En la Figura 36A se muestra el gel SDS-PAGE 15% de las fracciones proteicas subcelulares teñidas con azul de Coomassie, en donde se observa el tamaño de la proteína PvLEA18 recombinante de bacteria (20kDa) y las cantidades cargadas de proteína del resto de las fracciones.

El anticuerpo detectó un reconocimiento no específico de proteínas de alto peso molecular en todas las fracciones nucleares y en la soluble. Fué por esto que se decidió hacer un Western-blot con los mismos extractos incubando solamente con el anticuerpo secundario, para determinar si las proteínas de alto peso molecular eran reconocidas de manera inespecífica por este anticuerpo. En la Figura 36C se muestra el Western blot en donde las proteínas de alto peso molecular son reconocidas por el anticuerpo secundario.

A pesar de que se detecta la proteína PvLEA18 en los extractos nucleares se requieren de más experimentos para corroborar estos resultados, p.ej., el uso de anticuerpos dirigidos contra proteínas localizadas en citoplasma y núcleo para ser usados como controles positivos.

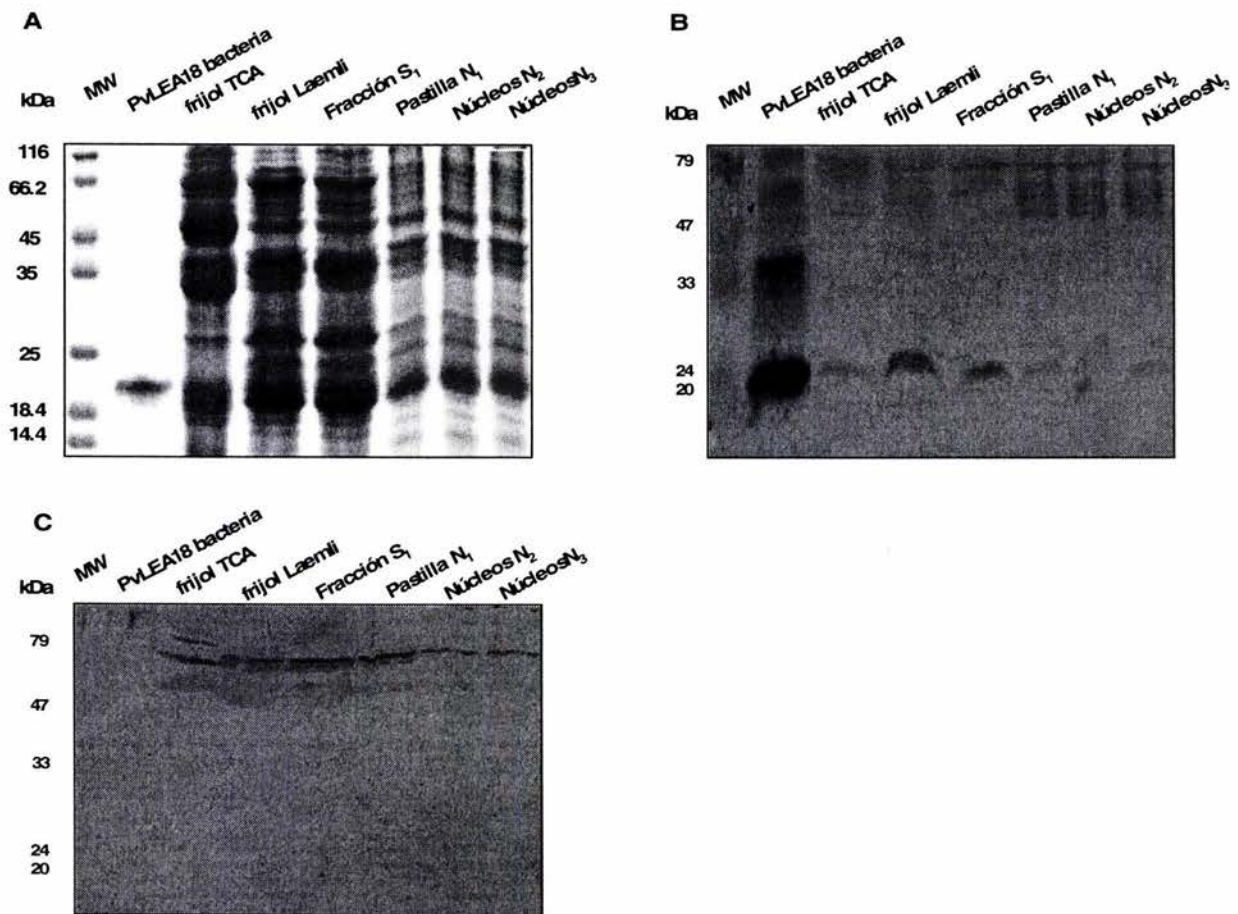


Fig. 36 Western blot de extractos proteicos de fracciones subcelulares de semillas de frijol

- A) Gel SDS-PAGE 12% de las fracciones proteicas subcelulares teñidas con azul de Coomassie, en donde se observa el tamaño de la proteína PvLEA18 recombinante de bacteria (20kDa) y las cantidades de proteína de las muestras.
- B) Western blot de las proteínas de las fracciones S₁, N₁, N₂ y N₃ utilizando el anticuerpo inmunopurificado de la PvLEA18. Se detectó una proteína de 20 kDa en el extracto de la PvLEA18 recombinante de bacteria, en los extractos de frijol obtenidos con TCA y con buffer de Laemli y en los extractos proteicos de la fracción soluble (S₁) y de las fracciones nucleares (N₁, N₂, y N₃).
- C) Western-blot de los extractos proteicos incubados únicamente con el segundo anticuerpo. Las proteínas detectadas corresponden con las de alto peso molecular reconocidas en el Western realizado con el anticuerpo inmunopurificado de la PvLEA18.

IV. DISCUSIÓN

La respuesta de las plantas ante el déficit hídrico ocurre a través de la inducción de genes específicos y de diferentes mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permiten adquirir tolerancia a las condiciones adversas (Ingram and Bartels, 1996).

Algunos de los genes cuya expresión es inducida en tejidos vegetativos durante la condición de estrés son los que codifican para las proteínas LEA, las cuales se acumulan a altos niveles durante la última etapa de la maduración de la semilla, cuando ocurre un proceso natural de desecación (Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993).

Las proteínas LEA son inducidas cuando hay una pérdida de agua, tienen un elevado porcentaje de glicinas y de aminoácidos cargados; su abundante acumulación en la etapa de desecación de la semilla y en tejidos vegetativos sujetos a déficit hídrico, apoyan el posible papel protector de estas proteínas en la respuesta adaptativa ante el estrés por sequía (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que el significado biológico de la existencia de proteínas altamente hidrofílicas, como las proteínas LEA, responde a la necesidad de mantener hidratadas a las células con potenciales hídricos bajos, al actuar como protectores de estructuras celulares o complejos macromoleculares (transcriptosomas, ribosomas, etc.) de los efectos dañinos debido a la pérdida de agua. Otras funciones propuestas son el secuestro de iones, la formación de medios de hidratación y la protección de proteínas y membranas (Cuming, 1999; Bray, 1993, Danyluk *et al.*, 1998).

Esto podría estar relacionado con su función hipotética de contribuir a mantener un contenido mínimo de agua necesario en la célula para mantener su sobrevivencia bajo condiciones de estrés (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Evidencia adicional que fundamenta esta hipótesis se encuentra en los ensayos de protección funcional de diversas actividades enzimáticas *in vitro* en condiciones de estrés (Rinne *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2005), así como en la obtención de plantas transgénicas en donde se ha encontrado una correlación entre la acumulación de algunas proteínas LEA y un aumento en la protección ante el estrés hídrico (Imai *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998; Ismail *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2003).

Dentro del grupo 6 de las proteínas LEA, se ha clasificado a la PvLEA18 ya que tiene una secuencia proteica distinta al resto de los 5 grupos (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). El cDNA de la PvLEA18 se aisló de un banco de cDNA obtenido a partir del mRNA de plantas de frijol sometidas a tratamiento con ABA y deshidratación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). El transcrito y la proteína PvLEA18 se acumulan en altos niveles durante la fase de desecación de la semilla de frijol y se detectan en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y en respuesta a la aplicación de ABA en plantas bajo condiciones normales de irrigación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

Mediante experimentos de localización inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra la PvLEA18, Colmenero-Flores *et al.* (1999) encontraron que esta proteína se localiza en el núcleo y en el citoplasma de diferentes tipos celulares a lo largo del hipocotilo. La mayor acumulación de la proteína se detectó en el cilindro vascular y los tejidos epidermales, que son tejidos que pudieran presentar valores más negativos de potencial hídrico debido a que están más expuestos a los cambios ambientales (Nonami and Boyer, 1983; Davies, 1986). Se encontró también que la proteína PvLEA18 se acumula en mayor cantidad en el núcleo que en el citoplasma (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

A pesar de que no se ha podido determinar una función específica para las proteínas LEA, la localización subcelular de estas proteínas puede ser un indicador muy útil para predecir su función (Moriguchi *et al.*, 2005). Una técnica muy eficiente y poderosa para determinar la localización de una proteína es el marcado con epítopos (c-myc, FLAG, HA) o con la proteína verde fluorescente (GFP).

En la realización de este trabajo se utilizaron ambas estrategias para marcar a la PvLEA18 y poder identificar su localización subcelular mediante ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla y de expresión estable en plantas transgénicas, así como para determinar si la fitohormona ABA y el estrés por deshidratación alteran la localización subcelular de la proteína PvLEA18.

IV.A LOCALIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE GFP EN EPIDERMIS DE CEBOLLA Y EN PLANTAS TRANSGÉNICAS

El sistema de transformación transitoria de epidermis de cebolla (*Allium cepa*) ofrece la ventaja de trabajar con las monocapas de la epidermis, las cuales son fácilmente transformables por bombardeo, además, el análisis de la fluorescencia de GFP en las células transformadas se realiza *in vivo*, sin el uso de substratos o el proceso de fijación requerido en la localización inmunohistoquímica y la visualización del núcleo no requiere de tinciones adicionales. Se ha observado que la vacuola en las células de cebolla puede ocupar un 90-95% de su volumen interno, por lo que la mayoría del citoplasma se localiza perinuclear o como una delgada capa entre la membrana plasmática y el tonoplasto (Chytilova *et al.*, 1999).

Una desventaja en el análisis histoquímico de GUS en las células de epidermis de cebolla transformadas transitoriamente fué la difusión del producto de la reacción a las células vecinas y la formación de pequeños cristales dentro de éstas que impiden determinar una localización celular precisa. Se ha visto que las enzimas utilizadas como proteínas reporteras (β -Glucuronidasa) no reflejan la localización subcelular de la proteína a alta resolución o en tiempo real debido a que son detectadas indirectamente a través de sus productos cromogénicos de reacción (Taylor, 1997). Por esta razón, se consideró que el análisis transitorio en epidermis de cebolla utilizando *GUS* como gen reportero no es adecuado para la localización de las proteínas de fusión. La utilización de GFP en un análisis *in vivo* fué una mejor técnica para obtener una localización precisa de las proteínas.

Si bien en los ensayos transitorios en epidermis de cebolla se identificó a las células transformadas utilizando la microscopía de fluorescencia, también se tuvo la limitante de no poder observar a GFP a una alta resolución que permitiera determinar su localización con precisión. La necesidad de observar GFP a mayor resolución condujo a la utilización de la microscopía confocal, la cual ha tenido un papel fundamental para extender el potencial de GFP como una herramienta en la investigación. La resolución de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal es mucho mayor de la que se puede obtener usando el microscopio de fluorescencia.

Mejor aún, todos los cortes ópticos obtenidos de la visualización confocal pueden ser agrupadas en una imagen favoreciendo la observación de la célula.

Las observaciones confocales realizadas en epidermis de cebolla en medio MS confirmaron que las proteínas de fusión (PvLEA18::GFP-GUS, PvLEA18DEL::GFP-GUS y GFP-GUS) se localizan en el citoplasma y no se translocan al núcleo.

Las visualizaciones confocales con fluorescencia de las epidermis de cebolla tratadas con ABA 50 μ M mostraron que la fluorescencia de GFP ya no se encuentra restringida en el espacio entre la membrana plasmática y el tonoplasto sino que se aprecia dispersa en la célula con excepción del núcleo.

Reisen *et al* (2005) realizaron reconstrucciones tridimensionales de la vacuola de células de protoplastos de tabaco expresando la fusión de un gen de acuaporina de tonoplasto con GFP con la finalidad de monitorear los cambios tridimensionales en la estructura de la membrana vacuolar en condiciones de estrés con manitol y PEG.

Las observaciones de las vacuolas marcadas con GFP mostraron que es un compartimiento continuo de hebras transvacuolares que forman surcos y pliegues hacia el lado citoplasmático a lo largo de la membrana vacuolar lo que induce un incremento en su superficie y en el volumen citoplasmático.

Dada la ausencia de plasmólisis y para tratar de explicar la localización de la fluorescencia dispersa en las células de cebolla tratadas con ABA 50 μ M, es posible que en éstas células también existan rearrreglos en el tonoplasto de la vacuola, los cuales fuesen la razón por la cual la fluorescencia del citoplasma antes restringida a este compartimiento, ahora se localizara en los pliegues y surcos formados en el tonoplasto dando una apariencia de engrosamiento celular.

Sin embargo, para determinar con certeza el efecto de ABA sobre la localización de la proteína de fusión en las células de epidermis de cebolla se requiere la realización de experimentos que permitan analizar los cambios en la arquitectura del tonoplasto en respuesta a la aplicación de ABA.

La localización de la fluorescencia de GFP en los ensayos transitorios, mostró que las proteínas de fusión se localizan en el citoplasma y que la NLS propuesta (MEKEKK) en la secuencia de la PvLEA18 parece no ser una señal de localización nuclear.

Las ventajas ofrecidas por el microscopio confocal para detectar la localización de la fluorescencia de GFP fueron aprovechadas nuevamente cuando se decidió observar las raíces de las plantas transgénicas sometidas a diversos tratamientos.

Se analizó la fluorescencia de GFP en la zona de división celular de la raíz (la región inmediata a la cofia) considerando que es una zona donde las células tienen una alta tasa de división celular lo que permitiría identificar un gran número de núcleos.

Las observaciones confocales realizadas después de mantener a las raíces en medio MS y en tratamientos por PEG 25% y ABA 50 μ M, mostraron que la fluorescencia de GFP se localiza en el citoplasma de las células, cuyos núcleos se observan como zonas carentes de fluorescencia (huecos oscuros).

La visualización confocal de la fluorescencia de GFP en las raíces de plantas transgénicas confirma la localización citoplasmática de las proteínas de fusión, por lo tanto no es posible atribuir a la secuencia MEKEKK un papel de NLS.

Debe tenerse en consideración que cuando se hizo la fusión de la PvLEA18 (8.8kDa) con GFP-GUS (102kDa) pudo haberse causado un impedimento en su translocación al aumentar su tamaño considerablemente. Es posible que debido al tamaño pequeño de la proteína PvLEA18 ésta se pudiera transportar al núcleo por un mecanismo de difusión que estuviera impedido en la proteína fusionada. Considerando esto, fué que se decidió detectar a la proteína en las fracciones subcelulares de semilla de frijol.

Los resultados de la localización de la proteína PvLEA18 en semillas de frijol mostraron que el anticuerpo dirigido contra la PvLEA18 detectó una proteína tanto en la fracción citoplasmática (S_1), como en las fracciones nucleares enriquecidas (N_1 , N_2 y N_3), detectándose una mayor cantidad de proteína en la fracción citoplasmática.

La detección de la proteína en la fracción S_1 confirmaría la localización citoplasmática de la PvLEA18, lo cual correspondería también con la localización en el citoplasma de las proteínas de fusión en los ensayos transitorios y en las plantas transgénicas.

Sin embargo, dada la ausencia de proteínas nucleares y citoplasmáticas utilizadas como controles en los ensayos tipo Western, no se tiene una total confiabilidad de la localización de la proteína ya que es posible que la detección de la

proteína PvLEA18 en los extractos nucleares fuera resultado de una contaminación con restos de la fracción citoplasmática S₁.

Las visualizaciones confocales con fluorescencia de las células de epidermis de cebolla y de las plantas transgénicas confirman que la proteína PvLEA18 y su forma truncada no se transportan al núcleo y que la secuencia MEKEKK no tiene un papel señalizador al núcleo. Así mismo, la detección de la proteína PvLEA18 en fracciones subcelulares de semilla de frijol sugeriría, en principio, una localización citoplasmática.

Finalmente, y a diferencia de las plantas que tenían la PvLEA18 y PvLEA18DEL fusionada a GFP-GUS, en las cuales se detectó el transcrito de *PvLEA18* y *PvLEA18DEL* así como la proteína, en las plantas transgénicas que poseen la fusión PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA, no fué posible detectar a la proteína de fusión en ninguna de las líneas independientes a pesar de detectar el transcrito y de confirmar la presencia del transgén por PCR. Posiblemente un mecanismo de regulación postraduccional (p. ej., proteólisis del producto generado) esté involucrado (Fagard and Vaucheret, 2000).

Por otro lado, teniendo en consideración el hecho de que cuando se hizo la construcción del transgén sólo se incluyó la secuencia del marco de lectura abierto, cabe la posibilidad de que los extremos 5' y 3' del gen *PvLEA18* regulen la estabilidad del transcrito y con ello, la posterior traducción de la proteína.

En genes de plantas que participan en diversos procesos se ha demostrado que la región 3' tiene un papel regulador de la expresión del gen *PvLEA18*, estas regiones pueden funcionar a nivel transcripcional como aumentadores (Dean *et al.*, 1989; Dietrich *et al.*, 1992; Larkin *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1995), o a nivel postranscripcional modulando la estabilidad del mRNA o la velocidad de traducción (Bayley-Serres and Dawe, 1996; Chan and Yu, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999).

Para el caso del gen *PvLEA18*, Moreno and Covarrubias (2001) mostraron que la región 3' del gen *PvLEA18* tiene un efecto aumentador en la expresión del gen en plantas transgénicas de *Arabidopsis* durante el desarrollo y deshidratación, pero no en respuesta a ABA. Por lo anterior, es posible que se requiera de las regiones reguladoras 3' y 5' del gen *PvLEA18* para mantener la estabilidad del mensajero y detectar la proteína en las plantas transgénicas.

IV.E ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GUS EN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN PvLEA18::HA y PvLEA18DEL::HA

Las diferencias observadas en los niveles de expresión de *GUS* en plantas transgénicas PvLEA18::HA, PvLEA18DEL::HA, se había reportado anteriormente, ya que se ha visto que líneas independientes generadas con la misma construcción pueden llegar a presentar variaciones de hasta más de 100 veces en los niveles de expresión del transgén (Jones *et al.*, 1985, Peach and Velten, 1991; Holtorf *et al.*, 1995). Para explicar este tipo de observaciones se he propuesto que el T-DNA se integra en diferentes sitios, de los cuales si se inserta en una región transcripcionalmente activa, su expresión puede estar influenciada por secuencias reguladoras de genes cercanos; por el contrario, si se inserta en regiones de heterocromatina, los transgenes pueden ser inactivados (Pröls and Meyer, 1992; Jones *et al.*, 1985; Peach and Velten, 1991; Day *et al.*, 2000). Un proceso alternativo para explicar la variabilidad en la expresión se debe al número de dosis y/o arreglos repetidos de las copias del transgén que se introdujo en el genoma de la planta (Hobbs *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1996; Que *et al.*, 1997; Fagard and Vaucheret, 2000). Por ejemplo, la frecuencia de silenciamiento correlaciona positivamente con la fuerza de los promotores de los genes introducidos (Que *et al.*, 1997), ya que se ha visto que en plantas que poseen tres o más copias del gen *GUS* bajo control del promotor CaMV 35S existe una reducción pronunciada de los niveles de transcrito, un resultado similar se obtuvo para los genes de la proteína verde fluorescente (GFP) y de estreptomicina fosfotransferasa (SPT) (Schubert *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en cuanto a la diferencia en la expresión de *GUS* en plantas transgénicas, sugiere que la expresión del transgén pudiera estar comprometida en uno de los mecanismos mencionados.

V. CONCLUSIONES

- ❖ La proteína PvLEA18 fusionada con GFP-GUS se acumula en el citoplasma y no se transporta al núcleo.
- ❖ La NLS propuesta contenida en la secuencia de la proteína PvLEA18 no tiene una función en la translocación de la proteína del citoplasma al núcleo.
- ❖ El estrés por deshidratación (PEG 25%) y la fitohormona ABA no tienen un efecto sobre la localización de la proteína de fusión PvLEA18::GFP-GUS y su forma truncada.

VII. PERSPECTIVAS

Para determinar con certeza el efecto de ABA sobre la localización de la proteína de fusión en las células de epidermis de cebolla se requiere la realización de experimentos que permitan analizar los cambios en la arquitectura del tonoplasto en respuesta a la aplicación de ABA.

Es necesario el uso de de proteínas nucleares y citoplasmáticas utilizadas como controles en los ensayos tipo Western de las fracciones subcelulares de semilla de frijol, así como la realización de ajustes en la obtención de las diferentes fracciones nucleares, de tal manera que sea posible tener mayor confiabilidad en la localización de la proteína PvLEA18.

VI. REFERENCIAS

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A., Hood, L.E., Kent, S.B. (1987) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after *in situ* protease digestion on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (20):6970-4.
- Albertini, M., Pemberton, Rosenblum, J., Blobel, G. (1998) A Novel Nuclear Import Pathway for the Transcription Factor TFIIS. *J. Cell Biol.*, 143: 1447 - 1455.
- Aloni, R. (1987) Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 179-204.
- Alsheikh, M., Heyen, B.J., Randall, S.K. (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278: 40882-40889.
- Alster, J., Svejstrup, J.Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B.S., Westengaard, O. (1992) Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for *in vivo* function. *J. Biol. Chem.* 267, 12408-12411.
- Arroyo, E. (2003) Estudio sobre la regulación de la expresión de un gen que codifica para una proteína LEA involucrada en la respuesta a sequía en frijol. Pag.3 IBT, UNAM.
- Arts, G.J., Fornerod, M., Mattaj, J.W. (1998) Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* 8:305-314.
- Artus, N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F. (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13404-13409.
- Bailey-Serres, J. and Dawe, R.K. (1996) Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* 112: 685-695.
- Bayliss, R., Corbett, A.H., Stewart, M. (2000) The molecular mechanisms of transport macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* 1:448-456.
- Baker, J., Steele, C., Dure, L. III (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol.* 11: 277 - 291.
- Bannon, L.J., Stack, M.S., Green, K.J. (2001) Limitations of comparative detection of proteins via epitope tagging. *Anal Biochem.* 293(1):139-42.
- Barrieu, F., Chaumont, F., Chrispeels, M.J. (1998) High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize. *Plant Physiol.* 117: 1153-1163.
- Battista, J.R., Mie-Jung, P., McLemore, A., (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology* 43: 133-139.
- Bednenko, J., Cingolani, G., Gerace, L. (2003) Nucleocytoplasmic transport: Navigating the channel. *Traffic* 4: 127-135.
- Bewley, J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* 9: 1055-1066.
- Birnboim, H.C (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 100 (17):243-255.
- Bohnert, H.J. and Bressan, R.A. (2001) Abiotic stresses, plant reactions, and approaches towards improving stress tolerance. In: *Crop Science: Progress and prospects*. J. Nössberger et al., eds., CABI International, Wallingford, UK.
- Borovskii, G., Stupnikova, I., Antipina, A., Voinikov, V. (2000) Accumulation of dehydrin like proteins in the mitochondria of cold treated plants. *J. Plant Physiol.* 156: 797-800.
- Borrell, A., Cutanda, M., Lumbreras, V., Pujal, J., Godoy, A., Pages, M. (2002) *Arabidopsis thaliana* Atrab28: a nuclear targeted protein related to germination and toxic tolerance. *Plant Mol. Biol.* 50: 249-259.
- Boyes, D.C., Nam, J., Dang, J.L. (1998) The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 15849-15854.
- Bray, E. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035 - 1040.
- Bray, E. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54.
- Bray, E., Werenilnyk, E., Bailey-Serres, W. (2000) Responses to Abiotic Stress. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, eds. Rockville, Maryland, USA. 1158 - 1202.
- Bravo, L.A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martínez, J., Alberdi, M., Close, T.J., Corcuera, L.J. (2003) Cryoprotective activity of a cold induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant* 118: 262-269.
- Brown, P.M., Tagari, P., Rowan, K.R., O'Neill, G.P. (1995) Epitope labelled soluble human interleukins receptors. Affinity cross-link labelling, binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* 270: 29236-43.
- Browne, J., Tuncliffe, A., Burnell, A. (2002) Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature*: 416, 38.
- Buchanan, R., Griseem, W., Jones, R. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Chap. 22:1158-1173.
- Burd, C.G. (2000) Visualizing protein dynamics in yeast with green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 327:61-9.

- Busk, P.K. and Pagès, M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37:425-435.
- Cáceres, J., Misteli, T., Sreaton, G., Spector, D., Krainer, A. (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.* 138:225-238.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., Lianick, A.J. (1991) Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral N1a protein. *Plant Cell* 3:953-962.
- Chalfie, M., Tu, Y., Eukirchen, G., Ward, P., Pashard, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chalfie, M. (1995) Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* 4:651-656.
- Chan, M.T. and Yu, S.M. (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6543-6547.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Herman, E.M., Chrispeels, M.J. (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol.* 117: 1143-1152.
- Cheng, Z., Targoff, J., Huang, X., Wu, R. (2002) Wheat LEA genes, PMA80 and Pma1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) *Mol. Breed.* 10:71-82.
- Chi, N.C., Adam, E.J., Adam, S.A. (1995) Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J. Cell Biol.* 130: 265-274.
- Chiu, W.L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6:325-330.
- Chrispeels, M.J., and Raihkel, N.V. (1992) Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613-616.
- Church, P.M. and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
- Chytilova, E., Macas, J., Galbraith, D. (1999) Green Fluorescent Protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany*, 83: 645-654.
- Chytilova, E., Macas, J., Silwinska, E., Rafelski, S., Lambert, G., Galbraith, D. (2000) Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Cell* 11: 273-2741.
- Citovsky, V., Warnick, D., Zambryski, P. (1994) Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3210-3214.
- Close, T.J., and Bray, E. (1993) Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. *The American Society of Plants Physiologists*.
- Close, T.J. and Lambert, P.J. (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.* 101: 773-779.
- Close, T.J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97: 795 - 803.
- Close, T.J. (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration at low temperature. *Physiol. Plant* 100:291-296.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Colmenero-Flores, J., Campos F., Garciarrubio A., Covarrubias A. (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.* 35:393-405.
- Colmenero-Flores, J., Moreno, L., Smith, C., Covarrubias A. (1999) Pvlea-18, a member of a new Late-Embryogenesis Abundant Protein Family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol.* 120: 93-103.
- Conolly, L., Ziegler, K., Young, J.A. (1994) A soluble form of a receptor for subgroup A avian leucosis and sarcoma viruses blocks infection and binds directly to ALVSA. *J. Virol.* 68: 2760-64.
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S. (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 92:205-214.
- Cubbit, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving, and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455.
- Cuming, A.C. (1999) LEA proteins. In Shawry, P.R., Casey, R. (Eds) *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 753-780.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F. (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10: 623-638.
- Davis, L.I. (1996) The nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* 64:855-896
- Davies, W.J. (1986) Transpiration and the water balance of plants: In FC Steward, ed; Sutcliffe, J.F., Dale, J.E., co-eds: *Plant Physiol.: A treatise*, vol. IX; *Water and Solutes in plants*. Academic Press, New York, 49-154.
- Davies, S.J and Vierstra, R.D. (1998) Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in high plants. *Plant Mol. Biol.* 36: 521-528.
- Day, C.D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L.D., Albert, H., Ow, D.W. (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* 14: 2869-2880.
- Dean, C., Favreau, M., Bond-Nutter, Bedbrook, J., Dunsmuir, P. (1989) Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell* 1(2): 201-208.

- Dear, T.N., Hainzl, T., Follo, M., Nehls, M., Wilmore, H. (1997) Identification of interaction partners for the basic helix-loop-helix protein E47. *Oncogene* 14: 891-98.
- De Witt, N.D., and Sussman, M.R. (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053-67.
- De Witt, N.D., Hong, B., Sussman, M., Harper, J.F. (1996) Targeting of two Arabidopsis (H(+)-ATPase) isoforms to the plasma membrane. *Plant Physiol.* 112: 833-44.
- Dietrich, R.A., Radke, S.E., Harada, J.J. (1992) Downstream DNA sequences are required to activate gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell*. 11,1371-82.
- Dingwall, C., and Laskey, R. (1991) Nuclear targeting sequences, a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16: 478-481.
- Dure, L. III (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* 3: 363 - 369.
- Dure, L. III., Close, T., Bray, E. (1993a) Structural motifs in Lea proteins. Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. The American Society of Plant Physiologists, pp 91-103
- Dure, L. III., Roberts, J.K., DeSimone, N.S., Lingle, W.L. (1993b) Cellular concentrations and uniformity of cell accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5: 769-72
- Dure, L. III (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Prot. Pept. Lett.* 2,115-122.
- Ehrhardt, D. (2003) GFP technology for live cell imaging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 622-628.
- Elliot, A.R., Campbell, K.J., Grof, C.P. (1999) Green fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cell. *Plant Cell Rep.* 18:707-714.
- Esperlund, M., Saenoe-larsen, S., Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F., Jakobsen, K.S. (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid osmotic stress. *Plant J.* 2: 241-252.
- Fagard, M. and Vaucheret, H. (2000) (Trans)gene silencing in Plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 167-94.
- Fagerlund R, Kinnunen L, Kohler M, Julkunen I, Melen K. (2005) NF- κ B is transported into the nucleus by importin β 3 and importin α 4. *J. Cell Biol.* 280(16):15942-51.
- Fagotto, F., Glück, U., and Barry M. (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr. Biol.* 8:181-190.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132:6-13.
- Feldherr, C.M. and Akin, D., (1990) EM visualization of nucleocytoplasmic transport process. *Electron Micros. Rev.* 3: 73-86.
- Ferrando, A., Farras, R., Jásik, J., Schell, Koncz, C. (2000) Intron-tagged epitope: a tools for facile detection and purification of protein expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J.* 22(6): 553-560.
- Ferrando, A., Koncz-Kalma, Z., Farras, R., Tiburcio, A., Schell, J., Koncz, C. (2001) Detection of *in vivo* protein interactions between Snf1- related kinase subunits with intron-tagged epitope-labeling in plant cells. *Nucleic Acids Research*, 29(17): 3685-3693.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., Silver, P.A. (1998) Regulated nucleocytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* 17,(19): 5606-14.
- Filkenstein, R.R., Gampala, S.S.L., Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 10: 1043-1054.
- Fu, H., Kim, S.Y and Park, W.D. (1995) High level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' y 3' flanking sequences and a leader intron. *Plant Cell* 7: 1387-1394.
- Galau, G.A., Hughes, D.W., and Dure, L. III (1986) Abscisic acid induction of clones cotton late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7: 155-170.
- Galau, G.A., Bijaisoradat, N., Hughes, D.W., (1987) Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis abundant mRNAs and storage protein mRNAs: Coordinate regulation during embryogenesis and the role of the abscisic acid. *Devel. Biol.* 123:198-212.
- Galau, G.A. and Close, T.J. (1993) Sequences of the cotton Group 2 LEA/RAB/dehydrin proteins encoded by *Lea3* cDNAs. *Plant Physiol.* 98 (4):1523-1525.
- Galau, G.A., Wang, H.Y., Hughes, D.W. (1993) Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiol.* 101:895-896.
- Garay-Arroyo, A., Comenero-Flores, J.M., Garclarrubio, A., Covarrubias, A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eucaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 275: 5668-5674.
- Gasirowski, J. and Dean, D. (2003) Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Ad. Drug. Deliv. Rev.* 55: 703-716.
- Gaubier, P., Reynal, M., Hull, G., Huestis, G.M., Grellet, F., Arenas, C., Pages, M., Delseny, M. (1993) Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol. Gen. Genet.* 238: 409-418.
- Gaxiola, R.A., Rao, R. Sherman, A., Grisaffi, P., Alper, S.L., Fink, G.R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters AtNhx1 y Avp1 can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15896-15903.

- Gerdes, H.H., and Kaether, C.** (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett.* 389(1):44-47.
- Gilmour, S.J., Sebold, A.M., Salazar, M., Everard, J.D., Thomashow, M.F.** (2000) Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124:1854-1865.
- Godoy, a., Jensen, A., Culiñez-Macia, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pages, M.** (1994) The maize abscisic acid responsive protein rab17 is located in the nucleus and cytoplasm and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6:351-360.
- Godoy, JA., Luna, R., Torres, S., Moreno, J., Rodrigo, RM, Pintor-Toro, JA** (1994) Expression, tissue distribution and cellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1921-1934.
- Goldfarb, D. and Breeuwer, M.** (1990) Facilitated nuclear transport of the histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60: 999-1008.
- Görlich, D. and Matlack, I.** (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271:1513-1518.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, RA., Hartmann, E** (1996) A 41 amino acid motif in importin alpha confers binding to importin beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* 15: 1810-1817.
- Görlich, D. and Kutay, U.,** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:607-660.
- Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, J.J., Zurdo, J., Tunnacliffe, A.** (2003) Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J. Biol. Chem.* 278: 12977-12984.
- Graham, P.L., Johnson, J.J., Wang, S., Sibley, M.H., Gupta, M.C., Kramer, J.M.** (1997) Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. *J. Cell Biol.* 137: 1171-83.
- Gray, W.M., del Pozo, C., Walker, I., Yang, M., Estelle, M.** (1999) Identification of an SCF ubiquitin ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 13: 1678-1691.
- Grebencok, R.J., Lambert, G.M., Galbraith, D.** (1997) Characterization of the targeted nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. *Plant J.* 12(3): 685-696.
- Griet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.H., Grundwald, D., Macherel, D.** (2004) Identification in pea seed mitochondria of a late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* 13,157-167.
- Griesbeck, O, Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y.** (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J. Biol. Chem.* 3: 276 (31): 29188-94.
- Gutiérrez, R.A., Macintosh, G.C. and Green, P.J.** (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci.* 4: 429-438.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson K., and Pines J.** (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr. Biol.* 9:680-689.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P.** (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25(6):989-994.
- Hanson MR, Kohler RH.** (2001) GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J. Exp. Bot.* 356:529-39.
- Hara, M., Terashima, S., Kuboi, T.** (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.* 158: 1333-1339.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., Kuboi, T.** (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217: 290-298.
- Harlow, E. and Lane, D.** (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Lab Press. pp 23.
- Hartl FU., and Neupert, W.** (1990) Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247:930-938
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., Hodge, S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2122-2127.
- Haseloff, J., Siemering, K.R.** (1996) The uses of GFP in plants. In Chalfie (ed) *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols.* Wiley, 191-220.
- Hazelrigg, T., Ning, L., Hong, Y., Wang, S.** (1998). GFP expression in *Drosophila* tissues. *Developmental Biology* 199, 245-249.
- Henis, Y.I., Moustakas, A., Lin, H.Y., Lodish, H.F.** (1994) The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J. Cell Biol.* 126(1):139-54
- Heath, C.V., Copeland, C.S., Amberg, D.C., Del Priore, V., Snyder, M., Cole, C.N.** (1995) Nuclear pore complex clustering and nuclear accumulation of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT2/NUP120 gene. *J. Cell. Biol.* 131: 1677-97.
- Heim, R., Praseher, D., Tsien, R.** (1994) Wavelength mutations and posttranscriptional autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12501-12504.
- Henderson, B.R., and Percipalle, P.** (1997) Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin. *J. Mol. Biol.* 274:693-707.

- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K. (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* 130:675-687.
- Hicks, G.R., and Raihkel, N.V. (1993) Specific binding of nuclear localization sequences to plant nuclei. *Plant Cell* 5: 983-994.
- Hicks, G.R. and Raihkel, N.V. (1995) Nuclear localization signal binding proteins in higher plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 734-738.
- Hieda, M., Tachibana, T., Yokoya, F., Kose, S., Imamoto, N., Yoneda, (1999) A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of ran inhibits both the recycling of ran and nuclear protein import in living cells. *J. Cell. Biol.* 144: 645-655.
- Hobbs, S.L., Kpodar, P., DeLong, C.M. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.* 15: 851-864.
- Hoekstra, F., Golovina, E., Blutink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 431-438.
- Holtorf, S., Apel, K., Bohmann, H. (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646.
- Horton, P. and Nakai, K. (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbor classifier. *Intellig. Syst. Mol. Biol.* 5, 147-152.
- Houde M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S., Sarhan, F. (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.* 8: 583-593.
- Hough, C.D., Woods, D.F., Park, S., Bryant, P.J. (1997) Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes Dev.* 11: 3242-53.
- Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovsky, V., Zambryski, P. (1992) The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 68: 109-118.
- Hu, W. and Cheng, C. (1995) Expression of *Aequorea victoria* green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Lett.* 369:331-344.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., Luhtmann, R. (1998) Snurportin 1, an m3G-cap specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* 17:4114-4126.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissmen, J.S., O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A., Takagi, M. (1995) A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 170:243-248.
- Imamoto, N., Matsucka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, Sakiyama, F., M., Okada, Y., Tsunasawa, S., Yoneda, Y. (1992) Antibodies against 70 kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* 119:1047-1061.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1995) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377 - 403.
- Ismail, A.M., Hall, A.E., Close, T.J. (1999) Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13566-13570.
- Izaurraide, E., Kutay, U., von Kobe, C., Mettaji, I.W., Görlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* 16: 6535-6547.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D., Schabenberger, O. Thomashow, M.F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280:104-106.
- Jäkel, S., and Görlich, D. (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* 17: 4491-4502.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, FR. et al., (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* 18:2411-2423.
- Jarvik, J. And Telmer, C. (1998) Epitope tagging. *Annu. Rev. Genet.* 32: 601-618-
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* genes fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
- Jensen, A., Goday, A., Figueras M., Jessop, A., Pages, M. (1998) Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J.* 13(5): 691-197.
- Joh, T., Hanjoh, K., Yoshimoto, M., Funabashi, J., Miyamoto, T., Hatano, S. (1995) Molecular cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella vulgaris* C-27. The most abundant clone encodes a late embryogenesis protein. *Plant Cell Physiol.* 36 (1):85-93.
- Jones, J.D.G., Dunsmuir, P., and Bedbrook, J. (1985). High-level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.* 4, 2411-2418.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, G., Napoli, C.A. (1995) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* 31: 957-973.
- Jullien, S., Gorlich, D., Laemmli, U.K., Adachi, Y. (1999) Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIP alpha but not importin alpha. *EMBO J.* 18:4348-4358.
- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. and Kitts, P. (1995) Green fluorescent protein as a reporter

- of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19:650-655.
- Kalderon, D., Richardson, W., Markham, A.F., Smith, A.E.** (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311:33-38.
- Kanda, T., Sullivan, K.F., Wahl, G.M.** (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* 8(7):377-85
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, K.** (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17: 287-291.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Bohnert, H.J.** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell.* 13: 889-905.
- Kazuoka, T. and Oeda, K.** (1994) Purification and characterization of COR85 oligomeric complex from cold acclimated spinach. *Plant Cell Physiol.* 35: 601-611.
- Keegstra, K.** (1989) Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell.* 56:247-253
- Kehlenbach, R.H., and Gerace, L.** (2000) Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 275 (23):17848-56.
- Kempter, B., Luppa, P., Neumeier, D.** (1991) A short procedure for Southern blotting on neutral and anionic membranes. *Trends in Genetics* 7: 109-110.
- Kertbundit, S., Degreve, H., Deboeck, F., Van Montagu, M., Hernalsteens, J.P.** (1991) *In vivo* random beta-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5212-5216.
- Keys, D.A., Lee, B.S., Dodd, J.A., Nguyen, T.T., Vu, L.** (1996) Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes Dev.* 10: 887-903.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C.** (1988) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., Nagy, F.** (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D y E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14:1541-1555.
- Koag, M.C., Fenton, R.D., Wilkens, S., Close, T.** (2003) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6: 262-267.
- Koblan, K.S., Schaber, M.D., Edwards, G., Gibbs, J.B., Pompliano, D.L.** (1995) Src-homology (SH2) domain ligation as an allosteric regulator: modulation of phosphoinositide-specific phospholipase C gamma 1 structure and activity. *Biochem.J.* 305:745-51.
- Koepp, D.M., and Silver, P.A.** (1996) A GTPase controlling nuclear trafficking:running the right way or walking RANDOMly? *Cell* 87:1-4.
- Koornneef, M., Bentsink, L., Hilhorst, H.** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:33-36.
- Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U., Hell, R.** (2002) A metal-binding member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* J. *Biol. Chem.* (28): 25062-25069.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P.** (1998) Identification of a tRNA -specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* 1:359-369
- Laemli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laize, V., Ripoché, P., Tacnet, F.** (1997) Purification and functional reconstitution of the human CHP28 water channel expressed in *Saccharomyces cerevisiae* *Protein Expr. Purif.* 11: 284-88.
- Lam, M., Briggs, L., Hu, W., Martin, T., Jans, D.A.** (1999) Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J. Biol. Chem.* 274: 7391-7398.
- Lanford, R.E., and Butel, J.S.** (1984) Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37: 801-813.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S. And Marks, M.D.** (1993) *Arabidopsis* GLABROUS1 gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* 5: 1739-1748.
- Leffel, S.M., Mabon, S.A., Stewart, C.N.** (1997) Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* 23: 912-918.
- Lehel, S.M., Olah, Z., Petrovics, G., Jakab, G., Anderson, W.B.** (1996) Influence of various domains in protein kinase C epsilon on its PMA-induced from the Golgi to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 98-103.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H.** (1977) RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751.
- Le Maout, S., Brejon, M., Olsen, O., Merot, J., Welling, P.A.** (1997) Basolateral membrane targeting of a renal-epithelial inwardly rectifying potassium channel from the cortical collecting duct, CCD-IRK3, in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13329-34.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sekuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, K.** (1998) Two transcription factors DREB2 y DREB2 with an EREB/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathway in drought-and-low temperature responsive gene

- expresión, respectivamente en *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 1391-1405.
- Mandel, M. and Higa, A.** (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 53:159-162.
- Martina, J.A., Danioni, J.L., Maccioni, H.** (1998) Influence of N-glycosylation and N-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase. *J. Biol. Chem.* 273: 3725-31.
- Martinez-Torres A. and Miledi R.** (2001) Expression of gamma-aminobutyric acid rho 1 and rho 1 Delta 450 as gene fusions with the green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(4):1947-51.
- Maximova, S.N., Dandekar, A.M., Gultinan, M.J.** (1998) Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol. Biol.* 37: 549-559.
- McCubbin, W.D., and Kay, C.M.** (1985) Hydrodynamic and optical properties of the wheat Em protein. *Can. J. Biochem.* 63: 803-810.
- McCue, W.D** (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech.* 8: 358-362.
- McCully, ME.** (1994) Accumulation of high levels of potassium in the developing xylem elements in roots of soybean and some other dicotyledons. *Protoplasma* 183: 116-125.
- Melchior, F., Gerace, L.** (1998) Two way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol.* 8:175-179.
- Mende, U., Schmidt, C.J., Yi, F., spring, D.J., Neer, E.J.** (1995) The G protein gamma subunit. Requirements for dimerization with beta subunits. *J. Biol. Chem.* 270: 15892-98.
- Merkle, T.** (2001) Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* 213: 499-517.
- Merkle, T.** (2004) Nucleocytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr. Genet.* 44:231-260.
- Messerli, J.M., and Perliard, J.C.** (1995) Three dimensional analysis and visualization of myofibrillogenesis in adult cardiomyocytes by confocal microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 30: 521-30.
- Meyer, RF., and Boyer, JS.** (1972) Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* 108:77-87.
- Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nesmyth K.** (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW5. *Cell*. 4:743-58.
- Moore, J., Yang, J., Truant, R., Kornbluth S.** (1999) Nuclear import of Cdk/Cyclin Complexes: Identification of Distinct Mechanisms for Import of Cdk2/Cyclin E and Cdc2/Cyclin. *J. Cell Biol.* 144:213-224.
- Moreno-Fonseca, L. and Covarrubias, A.** (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate Pvlea-18 gene expression in response to dehydration. *Plant Mol. Biol*: 45:501-515.
- Moriguchi, K., Suzuki, T., Ito, Y., Yamazaki, Y., Niwa, Y., Kurata, N.** (2005) Functional isolation of novel nuclear proteins showing a variety of subnuclear localizations. *Plant Cell* 17:389-403.
- Mosammaparast, N. and Pemberton, L.F.** (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function. *Trends Cell Biol.* (10):547-56.
- Mundy, J., and Chua, N-H.** (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7 (8): 2279-2286.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Murdoch, K.J. and Allison, L.A** (1996) A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res.* 227 (2):332-43.
- Murray, P.J., Watowich, S.S., Lodish, H.F., Young, R.A., Hilton, D.J.** (1995) Epitope tagging of the human endoplasmic reticulum HSP70 protein, Bip, to facilitate analysis of Bip-substrate interactions. *Anal. Biochem.* 229: 170-179.
- Nakagawa, T., Goto, K., Kondo, H.** (1996) Cloning and characterization of a 92 kDa soluble phosphatidylinositol 4-kinase. *Biochem J.* 320: 643-49.
- Nakai, K. and Kanehisa, M.** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14, 897-911
- Ndong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NP, Sarhan F.** (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.*129(3):1368-81.
- Niedenthal RK, Riles L, Johnston M, Hegemann JH.** (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast.* 12(8):773-86.
- Niedz, R.P., Sussman, M.R., Satterlee, J.S.** (1995) Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep.* 14: 403-406.
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M., Nygren, P.A.** (1997) Affinity fusion strategies for detection, purification and immobilization of recombinant proteins. *Prot. Expr. Purif.* 11:1-16.
- Niogret, M.F., Culliañez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M., Pagès, M.** (1996) Expression and cellular localization of rab28 mRNA and Rab28 protein during maize embryogenesis. *Plant J.* 9: 549-557.

- Nonami, H. and Boyer, J.** (1983) Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiol.* 89: 798-804.
- Nonami, H. and Boyer, J.** (1993) Direct demonstration of a growth-induced water potential as a gradient. *Plant Physiol.* 102: 13-19.
- Oliver, M.J., and Wood, A.J.** (1997) Desiccation tolerance of mosses. In *Stress-Inducible Processes in Higher Eucaryotic Cells.* (ed. T. Koval) Plenum Publishing Corp. New York, 1-26 pp.
- Olvera, Y.** (2005) Análisis funcional de la familia de hidrofílinas LEA4 en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, pag. 23, IBT, UNAM.
- Olson, K., McIntosh, J., Olmstead, J.** (1996) Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell Biol.* 130:639-650.
- Ow, D., Wood, K.V., Howell, S.H.** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 244: 856-859.
- Palacios, I., hetzer, M., Adam, S.A., Mattaj, L.W.** (1997) Nuclear import of snRNPs requires importin beta. *EMBO J.* 16:6783-6792.
- Palmeri, D. and Malim, M.H.** (1999) Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol.* 19(2):1218-25.
- Pang, S.Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinsahee, M.A. Fromm, M.E.** (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112: 893-900.
- Panté, N. and Aebi, U.** (1996) Exploring nuclear pore complex structure and function in molecular detail. *J. Cell Sci.* 19:1-11.
- Panté N. and Kann M** (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell*13:425-434
- Pathak, R., and Imperiali, B.** (1997) A dual affinity tag on the 64 kDa Nrt1p subunit allows the rapid characterization of mutant yeast oligosaccharyl transferase complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 338:1-6.
- Pesch, C., and Velten, J.** (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17, 49-60.
- Pellegrineschi, A., Reynolds, M., Pacheco, M., Brito, R., Almeraya, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Holsington, D.** (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gen delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47:493-500.
- Pemberton, L., Rosenblum, J. and Blobel, G.** (1997) A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein *J. Cell Biol.* 139: 1645 - 1653.
- Pemberton, L.F., Rosenblum, J.S., Blobel, G.** (1999) Nuclear import of the TATA binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J. Cell Biol.* 145:1407-1417
- Peters R.** (2005) Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic.* 6(5):421-7.
- Piedras, P., Rivas, S., Dröge, S., Hillmer, S., Jones, J.** (2000) Functional, c-myc- tagged *Ct-9* resistance gene products are plasma membrane localized and glycosylated. *Plant J.* 21(6) 529-536.
- Poon, D., Bai, Y., Campbell, A.M., Bjorlund, S., Kin, Y.J.** (1995) Identification and characterization of a TFIIID like multiprotein complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8224-28.
- Powers, M.A., and Forbes, D.J.** (1994) Cytosolic factors in nuclear import: what's importin? *Cell.* 79: 931-934.
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F., Cornier, M.** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- Pröls, F., Meyer, P.** (1992) The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 2: 465-475.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J., Jorgensen, R.A.** (1997) The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9:1357-68.
- Quiroz, R.E.** (2003) Caracterización molecular de un miembro de la familia de proteínas LEA tipo3 de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, pag. 41, IBT, UNAM.
- Rabut, G. and Ellenberg, J.** (2001) Nucleocytoplasmic transport: diffusion channel or phase transition? *Curr Biol.*11(14):551-4.
- Ramanjulu, S. and Bartels, D.** (2002) Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141-151.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, EL., Jarnik, M.,Aebi, U.** (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J.Cell Biol.* 110: 883-894.
- Reinhardt, A. and Hubbard, T.** (1998) Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucl. Acids Res.* 26:2230.
- Reisen, D., Marty, F., Leborgne-Castel, N.** (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biology* 5:13.On line.
- Rexah, M., and Blobel, G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 81: 215-222.
- Reyes, J.L., Rodrigo, M.J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.V., Salamini, F., Bartels, D., Covarrubias, A.A.** (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitations in vitro. *Plant, Cell and Environment* (28): 6, 709-718.
- Ried, J.L., Walker-Simmons, M.K.** (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant

- seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.
- Rinne, P.H.L., Kalkuranta, P.L.M., van der Ples, L.H.W., van der Schoot, C. (1999) Dehydrins in cold-acclimation apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh) production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta* 209:377-388.
- Roberts, A.N., Berlin, V., Hager, K.M., Yanofsky, C. (1988) Molecular analysis of a *Neurospora crassa* gene expressed during conidiation. *Mol. Cell Biol.* 8, 2411-2418.
- Roberts, J., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., Dure, L. III (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5: 769-780.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623.
- Ross, C. and Quatrano, R. (1994) Insensitivity is in the genes. *Curr. Biology* 4: 1013-1015.
- Rout, M.P. and Blobel, G. (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 123: 771-783.
- Rout, M.P., Blobel G. and Aitchison, J. (1997) A Distinct Nuclear Import Pathway Used by Ribosomal Proteins. *Cell*, 89(5): 715-725
- Samach, A., Klentz, J.E., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L. (1999) The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* 20: 433-445.
- Sandeep, G., Ferguson, S., Rylett, J. (2003) Identification of a novel nuclear localization signal common to 89 and 82 kDa Human Choline acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 278(22): 20217-20224.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Gorlich, D., Ponstingl, H., Bischoff, F.R. (1997) Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *EMBO J.* 16(20):6237-49.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Carninci, P., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Sakurai, T., Akiyama, K., Carninci, P., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31 (3): 279-292.
- Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F., Bartels, D. (1993) Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Crotonotagma plantagineum* Hochst. *Planta* 189: 120-131.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., Schmidt, R. (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: The predominant role of a gene specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16: 2561-2572.
- Sheen, J., Hwang S., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D., (1995) Green fluorescent proteins as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* (8):5 777-784.
- Shi, Y. and Thomas, O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell Biol.* 12: 2186-92.
- Shieh, M., Wessler, S.R., Raihkel, N. V. (1993) Nuclear targeting of the maize R protein requires two localization sequences. *Plant Physiol.* 101: 353-361.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 115:327-334.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217-223.
- Shinozaki, K. (2003) Interaction between 2-cis-acting elements, ABRE and DRE, in abscisic acid-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high salinity stress. *Plant J.* 34 137-148.
- Siemering, K.R., Globik, R. Sever, R., Haselhoff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6:1653-1663.
- Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1995) A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* 129 (3): 551-560.
- Siomi, M.C., Eder, P.S., Kataoka, N., Wan, L., Dreyfuss, G. (1997) Transportin-mediate nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J. Cell Biol.* 138: 1181-1192.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemia, T., Dyera, W.E., Hod, T., Wu, R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic rice constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* 155:1-9.
- Skriver, K. and Mundy, I. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-515.
- Somerville, C.R., and Ogren, W.L. (1982) Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis*. Edelman, Hallick and Chua (edit) *Methods on Chloroplast Biology*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, pp. 129-138.
- Soulaiges, J., Kim, K., Walters, C., Cushman, J. (2002) Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis abundant proteins from soybean. *Plant Physiol.* 128: 822-832.
- Stacy, R.A.P. and Aalen, R.B. (1998) Identification of sequences homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1-late embryogenesis abundant proteins in plants and

- hydrophilic repeats of the general stress protein Gs1B of *Bacillus subtilis*. *Planta* 206: 476-478.
- Stewart, C.N.** (2001) The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 20: 375-382.
- Stewart, M., Baker, R., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R., Littlewood, T., Matsuura, Y.** (2001) Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett.* 498:145-149.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., and Aebi, U.** (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 391-401.
- Swain, S., Tseng, T., Thornton, T., Olszewski, N.** (2002) SPINDLY is a nuclear localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol.* 129: 605-615.
- Swire-Clark, G.A. and Marcotte, W.R.** (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 39: 117-128.
- Taylor, C.B.** (1997) Promoter fusions analysis: an insufficient measure of gene expression. *Plant Cell* 9: 273-275.
- TerBush, D.R. and Novick, P.** (1996) Sec, Sec8 and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130:229-312.
- Thomashow, M.F.** (1993) Characterization of genes induced during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Current Topics in Plant Physiology*, Rockville, MD, Am. Soc. Plant
- Tian, L., Seguin, A., Charest, P.J.** (1997) Expression of the green fluorescent protein in conifer tissues. *Plant Cell Rep.* 16:267-271.
- Titov A. and Blobel G.** (1999) The Karyopherin Kap122p/Pdr1p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus. *J. Cell Biol.*, 147: 235 - 246.
- Tomba, P.** (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27: 527-533.
- Torres-Schuman, S., Godoy, J.A., Pintor-Toro, J.A.** (1992) A probable lipid transfer protein gene id induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18:749-757.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Truant, R., and Cullen, B.R.** (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1tat and rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell Biol.* 19:1210-1217.
- Uversky, V.N.** (2002) What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269: 2-12.
- Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J., Christou, P.** (2000) The green fluorescent protein In: Chalfie, M. Kain, S.R. (eds) *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols*. Wiley, Chichester, 45-75 pp.
- Van der Geest, A.H.M and Petolino, J.F.** (1998) Expression of a modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny. *Plant Cell Rep.* 17: 760-764.
- Van der Weele, C., Spollen, W., Sharp, R., Basklin, T.** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51(350): 1555-1562.
- Varagona, M.J., Schmidt, R.J., Raihkel, NV.** (1992) Nuclear localization signals required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque2. *Plant Cell* 4: 1213-1227.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C.** (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotech.* 17: 691-695.
- Wang, S. and Hazelrigg, T.** (1994) Implications for bod mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369(6479):400-03.
- Weis, K.** (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 328-335.
- White, B.T and Yanofsky, C.** (1993) **Structural Characterization and Expression Analysis of the *Neurospora* Conidiation Gene *con-6*** *Dev. Biol.* 160, 254-264.
- Whittaker, G.R. and Helenius, A.** (1998) Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 248:1-23
- Wolkers, W., McCready, S., Brandt, W., Lindsey, G., Hoekstra, F.** (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544: 196-206.
- Wu, R., Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L., Ho, T.** (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*, 5: 493-503.
- Xu, D., Duang X., Wang B., Hong B., Ho TDH., Wu R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1 from barley confers tolerance to water deficit and salt stresses in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110:249-257.
- Xu, L., Gonzalez-Agosti, C., Beauchamp, R., Pinney, Sterner, C., Ramesh, V.** (1998) Analysis of molecular domains of epitope-tagged merlin isoforms in Cos 7 cells and primary rat Schwann cells. *Exp. Cell Res.* 238: 231-40.
- Xu, L. and Massague, J.** (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(3):209-19.
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W., Bohnert, H.J.** (1995) A family of transcripts encoding water channels proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6(2):251-64.
- Yang, Q., Rout, M.P., Akey, C.W.** (1998) Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* 1: 223-234.

- Yang, W., and Storrie, B.** (1999) Scattered Golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans-Golgi proteins. *Mol. Biol. Cell* 9:191-207.
- Yokoyama F, Imamoto N, Tachibana T, Yoneda Y.** (1999) Beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell*. 10(4):1119-31.
- Zaslloff, M.** (1983) IRNA transport from the nucleus in a eucaryotic cell; carrier mediated translocation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6436-6440.
- Zhang, A, Ohta, M, Takagi, and R. Imai** (2000) **Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins.** *J. Biochem* 127: 611-616.
- Zhao, D., Yang, M., Solava, J., Ma, H.** (1999) The ASK1 gene regulates development and interacts with UFO gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev. Genet.* 25: 209-223.
- Zimmer, M.** (2002) Green fluorescent protein (GFP) Applications. Structure and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102:759-781.
- Zhu, J.T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.** (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *CRC Crit.Rev.Plant Sci.* 16: 253-277.