



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Estudio de la relación estructura- función de la familia 6 de  
proteínas LEA

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Inti Alberto Arroyo Mosso

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alejandra Covarrubias Robles  
Instituto de Biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dr. Federico del Río Portilla  
Instituto de Química, UNAM

Dr. Joel Osuna Quintero  
Instituto de Biotecnología, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Contenido

Abstract .....	1
Introducción.....	2
El estrés por déficit hídrico en las plantas .....	2
Respuesta al estrés por déficit hídrico.....	3
El ajuste osmótico .....	4
Papel de la acumulación de carbohidratos en la respuesta al estrés hídrico.....	5
El papel de ROS en la respuesta al estrés hídrico .....	5
El grupo de proteínas LEA en respuesta a estrés hídrico .....	6
Sistemas de reparación del daño en respuesta a estrés hídrico .....	6
Señalización y regulación de la respuesta a déficit hídrico.....	7
El papel de ABA y otras hormonas en la señalización de estrés hídrico en plantas.....	8
Papel de la regulación traduccional y post-transcripcional en el estrés por déficit hídrico .....	15
Las proteínas intrínsecamente no estructuradas .....	16
Las proteínas LEA en la respuesta al déficit hídrico .....	18
Clasificación de las proteínas LEA.....	20
Los grupos de las proteínas LEA .....	22
La familia 6 de proteínas LEA.....	24
.....	26
Análisis de la relación estructura-función de la familia 6 de proteínas LEA.....	29
Hipótesis.....	32
Objetivos .....	32
Materiales y métodos .....	33
Extracción de proteínas totales. ....	33
Cuantificación de proteínas .....	34
Ensayos de desfosforilación de extractos totales.....	34
Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína PvLEA6.....	34
Electroforesis en dos dimensiones (2D).....	35
Ensayos tipo western.....	36
Ensayos <i>in silico</i> y otras herramientas computacionales.....	37
Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38

Generación de mutaciones en el gen <i>AtLEA6-1</i> .....	39
Ensayos de choque térmico frío en <i>E. coli</i> BX04.....	39
Resultados .....	41
Parte I.....	41
Identificación de modificaciones post-traduccionales en 2D.....	41
Predicción de fosforilación en proteínas de la familia LEA 6.....	44
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> en la proteína PvLEA6 .....	45
Parte II.....	46
Ensayos de mutagénesis dirigida en el gen <i>AtLEA6-1</i> .....	47
Análisis funcional de las proteínas LEA de la familia 6.....	54
Discusión.....	60
Parte I.....	60
Identificación de modificaciones post-traduccionales en 2D.....	60
Predicción de fosforilación en proteínas de la familia LEA 6.....	62
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> .....	63
Ensayos de mutagénesis dirigida en el gen <i>AtLEA6-1</i> .....	63
Parte II.....	65
Análisis funcional de las proteínas LEA de la familia 6.....	65
Bibliografía.....	68
Anexos.....	75
Anexo 1 .....	75
Anexo 2 .....	76
Anexo 3 .....	80

# Abstract

The LEA proteins are synthesized during plant seed development in the late embryogenesis phase. These proteins also have been found in vegetative plant tissues under different stress conditions. Based in their accumulative patterns and previous assays it has been suggested that these proteins participate in the cellular water deficit response to protect the cell, however their molecular mechanisms during this stress conditions are unclear.

Using isoelectrofocusing assays we show that the LEA 6 group member of *Phaseolus vulgaris*, PvLEA6, is modified post-translationally. Our *in silico* and *in vitro* analyses suggest that these modifications are phosphorylation events, but we do not discard the possibility some others modifications. The PTM in LEA proteins can open new investigation lines about the function, because in trials done to date don't considerate these modifications.

Further we use BX04 an *Escherichia coli* mutant that lack four cold shock proteins (CSPs) and is highly sensitive to cold stress, for complementation assays using different LEA6 proteins. In these assays we observe that the BX04 complemented lines have a better survival than control cells during incubation at low temperature. These results suggest that LEA 6 proteins can promote the cold adaptation process in *E. coli*, possibly as a RNA chaperone activity during the cold adaptation process.

# Introducción

## El estrés por déficit hídrico en las plantas

De manera general una condición de estrés es definida como cualquier factor externo que puede alterar las funciones normales de la planta, lo cual implica un cambio significativo en las condiciones favorables del ambiente en las que una planta puede sobrevivir, crecer y reproducirse óptimamente. Los diferentes tipos de estrés pueden resumirse en dos grupos: el estrés biótico y abiótico. El estrés biótico se debe a la influencia de otros organismos, tales como depredadores, hongos, bacterias y patógenos virales (Taiz & Zeiger, 2010); mientras que en el abiótico, se presenta cuando se presenta un exceso o un déficit en las condiciones físicas o químicas del ambiente, como sequía, salinidad, carencia o exceso de nutrientes minerales, altas temperaturas, congelamiento, inundación y condiciones extremas de luminosidad e hipoxia (Hirayama & Shinozaki, 2010; Taiz & Zeiger, 2010).

Algunos de estos tipos de estrés involucran cambios en la disponibilidad de agua que pueden conducir a un estado de déficit hídrico que se manifiesta en una gran variedad de daños físicos y químicos en las estructuras celulares y macromoleculares que pueden ser irreversibles y en últimos términos producir la muerte celular (Shih, Hoekstra, & Hsing, 2008).

El estrés desencadena una amplia variedad de respuestas en las plantas, como cambios en la tasa de crecimiento y productividad, alteraciones en la expresión genética y el metabolismo, entre otros (EA Bray, Bailey-Serres, & Weretilnyk, 2000). El estrés por déficit hídrico en las plantas se presenta cuando éstas no son capaces de extraer la suficiente agua del suelo para recuperar la que pierden por evaporación. Éste es uno de los tipos de estrés abiótico más comunes que las plantas enfrentan durante su ciclo de vida y tiene un gran impacto en su desarrollo, crecimiento y productividad (Olvera-Carrillo, Campos, Reyes, Garcarrubio, & Covarrubias, 2010)

El estrés por déficit hídrico en las células tiene como consecuencia el aumento en la concentración de solutos, cambios en el volumen celular, ruptura de membranas, disrupción de los gradientes de potencial hídrico, deficiencia en la integridad y fluidez de la membrana, inestabilidad de macromoléculas y aumento del estrés oxidativo (E. A. Bray, 1997; Caramelo & Iusem, 2009).

La respuesta de las plantas a las condiciones de déficit hídrico puede darse por diversas vías, sin embargo estrés hídrico puede tener muchas variables como la severidad, duración e intensidad, así como la combinación o repetición de varias formas de estrés en un mismo momento. Además, otro factor importante que modula la respuesta se refiere a propiedades de la planta como las características genéticas, el estado del desarrollo en el que la planta sufrió el estrés y finalmente, el órgano o parte de la planta que específicamente pueda sufrir el estrés (Taiz & Zeiger, 2010).

El conjunto de respuestas ante un estrés determinado y los mecanismos regulatorios que las generan dependerán de las características inherentes de una planta para contender con esta condición en términos de adaptación. En algunos casos, las plantas son capaces de contender con condiciones extremas, ya que poseen características morfológicas, fisiológicas y metabólicas, producto de la selección genética a lo largo de la evolución que les ha permitido adaptarse a estas condiciones ambientales adversas. En otros casos han adquirido la capacidad de contender transitoriamente con el estrés, lo cual involucra respuestas que se dan en la planta a minutos de haber comenzado el estrés y pueden mantenerse por días o semanas; estas respuestas son generalmente reversibles y en su mayoría se deben a cambios en la expresión génica que involucran factores inducibles (Taiz & Zeiger, 2010).

### Respuesta al estrés por déficit hídrico

Durante su respuesta al déficit hídrico las plantas modifican su crecimiento, destacándose una disminución de la expansión foliar para evitar el daño a los tejidos fotosintéticos y un aumento en el sistema radicular que tiene la finalidad de incrementar el área de absorción de agua; así como, el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua, lo cual ocurre tan sólo algunos minutos después de haber percibido la condición de estrés. Esta modificación

fisiológica es una de las respuestas al déficit hídrico más caracterizadas (Taiz & Zeiger, 2010).

A nivel celular el estrés hídrico se detecta a través de varias señales que involucran sensores que convierten el estrés físico en una respuesta bioquímica (E. A. Bray, 1997; Harb, Krishnan, Ambavaram, & Pereira, 2010). A pesar de que la información sobre el tema es limitada, se ha propuesto que hay osmosensores que podrían ser activados por la pérdida o disminución de la turgencia, cambios en el volumen celular o alteraciones en las interacciones entre la pared celular y la membrana plasmática que desencadenen la respuesta. Un ejemplo son los complejos transmembranales de cinasas de histidinas (HK por sus siglas en inglés) como la AHK1/ATHK1, una cinasa de *Arabidopsis sp.*, que actúa como un osmosensor en células de levadura y presumiblemente mantiene esta función en plantas (Hirayama & Shinozaki, 2010; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Después del evento de percepción, las señales se transducen por diferentes vías de señalización en las que muchos segundos mensajeros, hormonas de plantas, transductores de señales, reguladores transcripcionales y traduccionales actúan para regular la respuesta al estrés (Fig. 1).

Con la percepción del estrés se produce un cambio importante en el perfil de expresión genética, en el cual la mayoría de los genes inducidos codifican proteínas que están involucradas directamente con la tolerancia al estrés. También otro grupo de los genes que se inducen, corresponden a proteínas que participan en la modulación de la respuesta al estrés por déficit hídrico (Hirayama & Shinozaki, 2010). La mayoría de estos cambios en la expresión genética se dan en respuesta a la pérdida de agua; sin embargo, varios genes se pueden expresar ante el déficit hídrico aunque no estén directamente relacionados con el mismo, sino más bien su expresión puede ser el resultado de otras condiciones de estrés consecuencia del primero (estrés oxidativo y genotóxico, daño, etc.; Bray 1997).

#### El ajuste osmótico

Una respuesta generalizada al estrés hídrico en las plantas, es el ajuste osmótico que tiene por finalidad la disminución del potencial hídrico en los tejidos, que a su vez impide la pérdida de agua y en consecuencia evita el daño celular (E. A. Bray, 1997).



El ajuste osmótico es diferencial de acuerdo al compartimento celular en donde ocurra; así, por ejemplo, en la vacuola se da por acumulación de iones (Cushman, 2001) y en el citosol a través de la síntesis de osmolitos, los cuales son solutos compatibles que se pueden acumular abundantemente sin interferir con las funciones celulares, como por ejemplo, con la actividad de las proteínas (E. A. Bray, 1993, 1997). Algunos ejemplos de osmolitos son ciertos solutos orgánicos como algunos carbohidratos (mono, di y oligosacáridos), algunos aminoácidos (ej. prolina) y sus derivados, compuestos de amonio cuaternario (ej. glicinbetaína) y compuestos de sulfonio (Cushman, 2001). Para el proceso de ajuste osmótico también se requiere de la actividad de transportadores de agua como las acuaporinas, o de iones como los canales iónicos y bombas, que en conjunto juegan un papel esencial en la contención del déficit hídrico (E. A. Bray, 1997).

#### Papel de la acumulación de carbohidratos en la respuesta al estrés hídrico

La acumulación de algunos carbohidratos, como la sacarosa y el sorbitol, participan en la protección de componentes celulares, sin embargo no quedan del todo claro los mecanismos moleculares de esta protección. Aunque con ensayos *in vitro* se ha demostrado la participación de estos carbohidratos en la protección de liposomas, ya que evitan la desorganización y fusión de membranas durante ciclos de sequía y rehidratación. Adicionalmente, basados en estos estudios *in vitro*, se propone que estos carbohidratos disminuyen la temperatura de transición de la fase lipídica en el sistema de membranas de la célula, posiblemente por interactuar con los grupos polares de los lípidos (Caramelo & Iusem, 2009). Además se ha propuesto que en condiciones de extrema desecación, los carbohidratos podrían reemplazar las capas de agua que rodean las macromoléculas, formando puentes de hidrógeno con las mismas, lo que finalmente disminuye los efectos dañinos producidos por la deshidratación (Caramelo & Iusem, 2009).

#### El papel de ROS en la respuesta al estrés hídrico

Otra respuesta a nivel celular que está enfocada a evitar el daño celular es la remoción de compuestos tóxicos producidos durante el periodo de estrés como lo son las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés; Reactive Oxygen Species; Ingram &

Bartels 1996) que en condiciones de estrés aumentan dramáticamente (Miller, Suzuki, Ciftci-Yilmaz, & Mittler, 2010). Para contrarrestar estos escenarios, enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa, la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la peroxirredoxina se acumulan abundantemente en respuesta al déficit hídrico para minimizar el estrés oxidativo (Miller et al., 2010). Estas proteínas, junto a compuestos no proteínicos, como los fenilpropanoides y compuestos fenólicos, se encargan de la remoción de radicales libres en las células (E. a. Bray, 2002; Ingram & Bartels, 1996).

#### El grupo de proteínas LEA en respuesta a estrés hídrico

Además, destaca un grupo de proteínas que se acumulan bajo condiciones de déficit hídrico y se propone que participan activamente en evitar el daño celular producido. Estas proteínas son las pertenecientes a la superfamilia LEA (del inglés: Late Embryogenesis Abundant) que, como su nombre lo indica, son proteínas que se acumulan en la fase tardía de la formación de la semilla o fase de deshidratación, proceso necesario para que la semilla germine y la planta prosiga su desarrollo. Estas proteínas han sido caracterizadas ampliamente por la alta correlación que existe entre su acumulación y las condiciones de limitación de agua, sin embargo, a nivel molecular su mecanismo de acción aún no ha sido esclarecido (Battaglia, Olvera-Carrillo, Garcarrubio, Campos, & Covarrubias, 2008).

#### Sistemas de reparación del daño en respuesta a estrés hídrico

Para las células otro factor importante en la contención del déficit hídrico es la reparación del daño producido por las condiciones de estrés; para reparar el daño proteínas como las chaperonas, ubiquitinas y proteasas tienen un rol fundamental. Con los cambios fisicoquímicos que ocurren ante la baja disponibilidad de agua, algunas proteínas tienden a perder su conformación funcional y/o llegan a agregarse. Para evitar este problema, las chaperonas moleculares asisten a las proteínas afectadas para que mantengan o readquieran su plegamiento funcional y para evitar así su agregación y/o consecuente degradación. Por otro lado, aquellas proteínas que ya no pueden repararse necesitan ser eliminadas, para lo cual los sistemas de degradación dirigen a las proteasas y ubiquitinas. Las proteasas más comunes en condiciones de déficit hídrico son cisteín-proteasas y las metalo-proteasas. También se sabe que a la par se activan inhibidores de proteasas, lo que sugiere una

compleja red de regulación que balancea los mecanismos de reparación y degradación de proteínas (E. a. Bray, 2002).

## Señalización y regulación de la respuesta a déficit hídrico

Después de la percepción del estrés se sabe poco acerca de los elementos que regulan y participan en la transducción de la señal; sin embargo se han examinado elementos de las cascadas de señalización en donde se han identificado segundos mensajeros como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1), el cual es uno de los más importantes elementos en la respuesta a estímulos extracelulares en plantas. El incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser inducido presumiblemente bajo condiciones de estrés, lo cual desencadena la movilización de moléculas señalizadores tales como inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), diacilglicerol, inositol hexafosfato ( $\text{IP}_6$ ), cADP-ribosa o especies reactivas de oxígeno, que transducen la señal a otros elementos, aunque los receptores de estas moléculas son prácticamente desconocidos en plantas (Hirayama & Shinozaki, 2010).

En los eventos de señalización de eucariontes, la fosforilación de proteínas cumple un rol esencial en la transmisión de la señal, y su relevancia en las vías de señalización en respuesta a déficit hídrico no es trivial. De manera general las cinasas funcionan en contraparte a las fosfatasas y, en conjunto, estos elementos comprenden los más importantes factores de señalización en eucariontes. En plantas muchas cinasas y fosfatasas han sido identificadas como factores en la señalización por respuesta a déficit hídrico y algunas han sido bien caracterizadas (Hirayama & Shinozaki, 2010). Las familias de cinasas más importantes que participan en la respuesta a este tipo de estrés son SnRK2, CDPKs, CIPK/PKS/SnRK3 y las MAP cinasas (MAPKs).

De manera particular, la familia de las MAPKs funge como uno de los más importantes componentes de señalización celular en los eucariontes. Además, en condiciones de estrés se ha analizado a los genes que codifican a las MAPKs para determinar su participación en estos escenarios. Se ha encontrado que muchas MAPKs, MAPKKs y MAPKKKs participan en la compleja red regulatoria durante diferentes tipos de estrés. Las cinasas relacionadas a SNF1 (SnRK1, SnRK2 y SnRK3) han sido involucradas funcionalmente en varias respuestas a estrés y a la fitohormona ácido abscísico (ABA). Inclusive para la señalización

por ABA las cinasas SnRK2 juegan un papel esencial (Hirayama & Shinozaki, 2010). También existen muchas proteínas cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que están asociadas a la tolerancia a condiciones de estrés y respuestas por ABA (Hirayama & Shinozaki, 2010).

#### El papel de ABA y otras hormonas en la señalización de estrés hídrico en plantas

La fitohormona ABA afecta varios aspectos de la vida de la planta, por ejemplo, la dormancia de las semillas, maduración, desarrollo y crecimiento de la planta, así como la respuesta a estrés por déficit hídrico (Umezawa & Hirayama, 2011). Por esta razón la acumulación de ésta fitohormona es un elemento central en la cascada de transducción de señales asociada al estrés, pues desencadena un cambio drástico en los perfiles de expresión genética, síntesis de proteínas y una variedad de procesos celulares involucrados con la respuesta al estrés. Estas peculiaridades hacen a esta hormona una pieza clave en la respuesta al estrés por déficit hídrico, debido a que coordina una respuesta integral a través de varias vías de señalización, que a su vez se entrecruzan con vías de señalización para otras hormonas y para diferentes procesos del desarrollo, dando como consecuencia una respuesta a gran escala dentro de la planta. Sin embargo, no todas las respuestas al déficit hídrico son mediadas por ABA, ya que se han identificado y en algunos casos, caracterizado algunos de los mediadores de otras vías de señalización (Chandler & Robertson, 1994).

A nivel fisiológico, el modelo por excelencia para el estudio de esta fitohormona es el control del cierre y apertura de los estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración en respuesta a ciertas condiciones de estrés. La señalización de ABA hacia las células guarda (células encargadas de la apertura estomática) produce una cascada de señalización que en respuesta a la limitación de agua, promueve la salida de potasio a través de la membrana plasmática y del tonoplasto, e inhibe su entrada regulando los canales correspondientes. Por otro lado, también modula los canales responsables de la entrada y salida de calcio, de tal manera que induce su entrada al citosol y su salida de la vacuola. De esta manera se restablece el equilibrio electroquímico celular, lo que disminuye el turgor y produce el cierre estomático (Schroeder, Kwak, & Allen, 2001).

Además, el ABA junto con otras hormonas, como las citoquininas y el etileno, se encarga de coordinar procesos tan importantes como la conductividad hidráulica y otros procesos ligados al control del crecimiento que son afectados por la baja disponibilidad de agua como la senescencia y la abscisión (Miller et al., 2010).

Otras hormonas de plantas juegan un papel substancial en el estrés hídrico de manera directa o indirecta, específicamente hormonas como el ácido salicílico (AS), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (AJ), que se ha demostrado participan en la respuesta a estrés abiótico a través de complejas interrelaciones con el ABA (Hirayama & Shinozaki, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que los factores transcripcionales AtMycC2 y ERF1 son puntos de convergencia en las cascadas de señalización de AJ/ABA o AJ/ET, respectivamente. La interacción entre ABA y ET es presumiblemente necesaria para integrar varias señalizaciones de estrés y mantener un balance entre la respuesta a nivel celular y de toda la planta (Hirayama & Shinozaki, 2010).

La acumulación de la fitohormona ABA está regulada por diversas vías, donde participan enzimas limitantes en su síntesis, almacenamiento, activación y degradación (Hirayama & Shinozaki, 2010). En particular enzimas limitantes, como la dioxigenasa 9-cis-epoxicarotenoide (NCED) que participa en la vía de biosíntesis o las P450CYP707As (CYP707A) que actúan en la vía catabólica, han sido muy estudiadas, ya que afectan la regulación de esta hormona por distintos mecanismos. La activación de estas enzimas se presenta bajo una diversidad de tratamientos de estrés; por ejemplo, el caso de NCED3 (enzima para la biosíntesis del ABA) cuya acumulación disminuye por rehidratación, mientras que CYP707A3 (enzima para la degradación del ABA) tiene un importante aumento en su acumulación, lo que implica una precisa regulación de los niveles del ABA a través de la coordinación de los mecanismos necesarios para su producción y eliminación. Adicionalmente, esta fitohormona se almacena en su forma inactivada (éster glucosil de ABA) en vacuolas y apoplastos. En condiciones de estrés, el ABA es activado por la enzima  $\beta$ -glucosidasa y liberado para que ejerza su actividad (Hirayama & Shinozaki, 2010).

El mecanismo de regulación mediada por la hormona ABA depende en primera instancia de sus receptores y se han caracterizado dos tipos: PYR1-PYLs-RCAR1 y START (Fig. 1).

Estos complejos proteínicos que reciben la señal son de dos tipos, el primero es un receptor anclado a la membrana y el otro es soluble en el citosol (Hirayama & Shinozaki, 2010). Cuando el ABA es reconocido por los receptores, el complejo se une a la fosfatasa PP2C, lo cual es clave en la modulación de la señalización debajo de este complejo, ya que a su vez interactúa con el complejo SnRK2 (Fig. 1; Soon et al. 2012). El sistema PP2C (ABI1, ABI2 y HAB1) interactúa físicamente con SnRK. SnRK2 en ausencia de ABA, interactúa físicamente con PP2Cs y desfosforila sus residuos de serina en el asa de activación, el cual necesita estar fosforilado para la actividad de cinasa (Fig. 1; Soon et al. 2012). En presencia de ABA, éste se une al receptor de la familia PYR/PYL/RCAR lo que promueve que el complejo se una al sitio catalítico de PP2C e inhiba su actividad catalítica. Por lo tanto, ABA induce la inhibición de PP2Cs lo que lleva a la activación de SnRK2s, por un evento de auto-fosforilación (Fig. 1; Soon et al. 2012). La cinasa SnRK2 puede estar involucrada en la activación de otras cinasas por debajo de la vía de transducción de señales y también actúa directamente en la activación de factores transcripcionales como AREB/ABF bZip (Hirayama & Shinozaki, 2010). Además se sabe que PP2C regula proteínas como los transportadores de potasio, AKT2 y AKT3, la proteína de homeodominio ATHB6, varias cinasas de proteínas que interactúan con proteínas parecidas a calcineurina-3 y con la proteína remodeladora de cromatina SWI3, sin embargo la relevancia fisiológica de estos blancos no ha sido establecida (Umezawa & Hirayama, 2011).

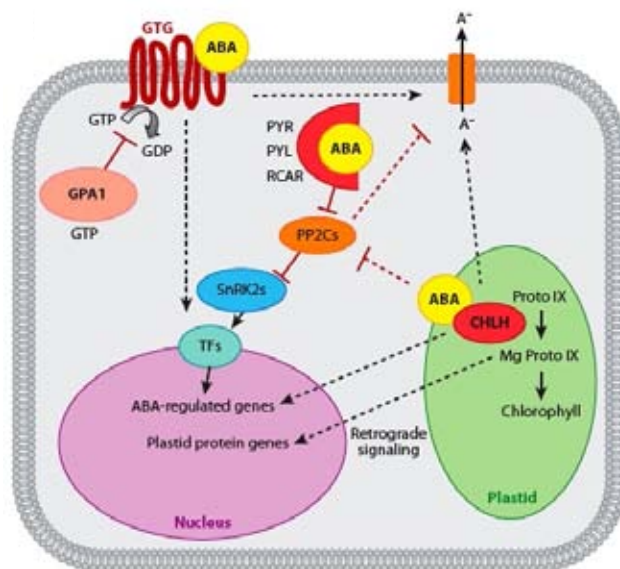


Fig. 1. **Modelo de las interacciones entre ABA y sus posibles receptores descritos a la fecha.** Entre ellos se encuentran una quelatasa de magnesio (CHLH), localizada en la membrana del cloroplasto; una proteína G de tipo GPCR, localizada en la membrana plasmática; y las proteínas nucleocitoplásmicas PYR/PYL/RCARs. Estas proteínas intervienen en la expresión genética y la electrofisiología de las células guarda (representadas como un canal aniónico, A). Las interconexiones de estos factores no se han descrito hasta el momento. Las líneas sólidas indican interacciones directas y las líneas punteadas indican interacciones no descritas. Las interacciones positivas se indican con una flecha; las barras indican represión. Tomado de Cutler et al. (2010).

Otros factores importantes en la transducción de señales en la respuesta al déficit hídrico, que pueden o no ser regulados por ABA, son los factores transcripcionales (Fig. 1) como los DREB (DRE-binding protein), CBF (C-repeat-binding factor), AREF/ABF (ABA-binding factor), MYC y MYB, entre otros (Hirayama & Shinozaki, 2010). Estos factores transcripcionales se encargan de activar genes que codifican proteínas diversas cuyas actividades son necesarias para establecer una nueva homeostasis celular que conduce a la adaptación y/o ajuste al estrés (Hirayama & Shinozaki, 2010). Muchos de estos factores actúan de manera coordinada, formando complejos multiproteínicos, sobre elementos regulatorios en *cis* localizados en el promotor de los genes blanco, generando así una compleja red regulatoria (Hirayama & Shinozaki, 2010).

Para los genes que responden a ABA uno de los elementos regulatorios más conservados en la región en *cis* es el denominado ABRE (ABA Response Element, por sus siglas en inglés), estos elementos constan de secuencias de 8 a 10 pb (YACGTGGC), con una secuencia central ACGT (Mundy, Yamaguchi-Shinozaki, & Chua, 1990). Para la activación transcripcional dependiente de ABA de un gen se necesita más de una secuencia ABRE y regularmente son repeticiones de esta secuencia asociada a los llamados ‘elementos acopladores’ (CE). En este sentido el conjunto de elementos mínimos que responden a ABA consiste de un ABRE y un ‘elemento acoplador’, y de esta forma dichos elementos son capaces de inducir la respuesta al ABA (Hobo, Asada, Kowyama, & Hattori, 1999).

En plantas se han encontrado varios factores transcripcionales tipo bZIP, los cuales presentan un motivo básico de cierre de leucinas en el extremo N-terminal, el cual se une a los elementos ABRE. Estas proteínas de unión a ABRE se han nombrado AREB (ABA responsive element binding protein por sus siglas en inglés), o ABFs (ABRE binding factor por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se ha mostrado que los AREBs/ABFs son regulados por eventos de fosforilación y desfosforilación, lo cual desencadena su actividad

para controlar la expresión de los genes que contienen los elementos en *cis* ABRE (Fujita et al., 2005; Uno et al., 2000).

Otro tipo de factores transcripcionales son los MYC y MYB, los cuales son sintetizados *de novo* bajo condiciones de estrés osmótico, y de manera cooperativa activan genes inducibles por estrés tales como el de RD22 (Hirayama & Shinozaki, 2010).

Otra clase de factores transcripcionales son los del tipo NAC, y un ejemplo es el que activa la expresión del gen *RD26*. Ensayos de análisis de la expresión genética han demostrado que la aplicación exógena de ABA induce la expresión de este factor transcripcional. También se induce por sequía y por condiciones de alta salinidad. La sobre-expresión de *RD26* en plantas transgénicas confiere hipersensibilidad al ABA; además el análisis de microarreglos ha mostrado que los genes que se inducen durante estrés biótico (*GLY*, *SAG13*, etc.) y ABA son sobre-regulados en aquellas plantas que sobre-expresan a *RD26*, y se reprimen en plantas mutantes en este gen (Fujita et al., 2005).



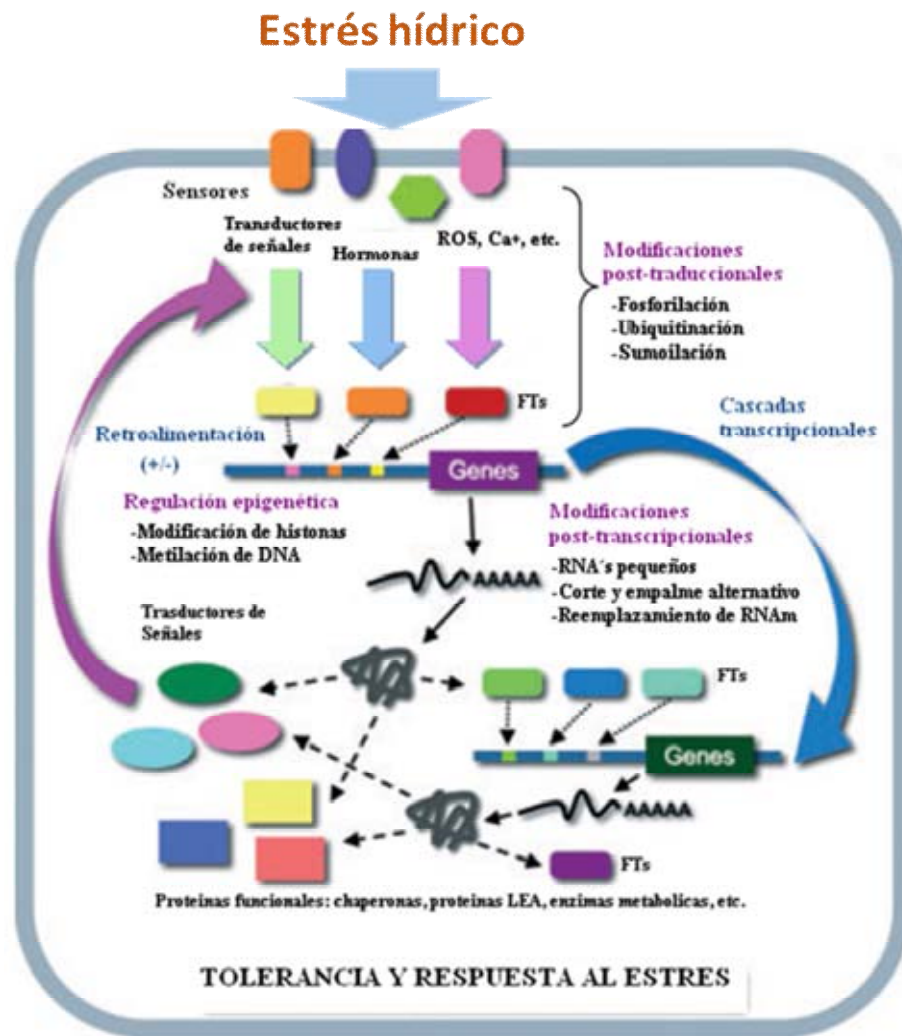


Fig. 2. **Modelo integral de la respuesta al estrés abiótico.** La planta recibe una gran variedad de señales a través de diversos sensores; estas señales son transducidas por distintas vías de señalización en las cuales muchos segundos mensajeros, transductores de señales y reguladores transcripcionales participan. Algunos genes inducidos por estrés son regulados por múltiples señales de estrés, donde los factores transcripcionales inducidos durante la respuesta a estrés son actores destacados. Algunos genes inducibles por estrés codifican proteínas funcionales que están directamente involucrados en la tolerancia al estrés. Otros genes inducibles por estrés codifican proteínas regulatorias que probablemente forman parte de sistema retroalimentativo (+/-) que regula la respuesta al estrés. En los últimos años se ha esclarecido la importancia de otros reguladores, como los modificadores post-traduccionales, modificadores post-transcripcionales y la regulación epigenética (modificado de Hirayama & Shinozaki 2010).

En la regulación de la respuesta al estrés por déficit hídrico no sólo participan factores transcripcionales que activan o reprimen a los genes implicados, actuando directa o indirectamente sobre su región regulatoria. También existe otra clase de regulación

transcripcional, la conocida como regulación epigenética. Este tipo de regulación no depende de la secuencia del gen sino de la señalización a distancia por factores proteínicos y moléculas de RNA's pequeños que participan en la modificación del DNA (metilación) y de proteínas asociadas a éste, como lo son las histonas (metilación y acetilación); que tienen la finalidad de activar o reprimir su transcripción. Esta regulación permite mantener una condición dada (activación y/o represión) aún después de transcurrido el período de estrés (memoria) y, en generaciones posteriores (herencia), proveyendo al organismo de estrategias que le permiten prepararse para situaciones adversas.

En todo tipo de células además de regular los niveles de transcripción de un gen dado, también es necesario regular la acumulación del producto correspondiente (i.e. proteínas) de una forma adecuada, por lo que se requiere de controlar los procesos post-transcripcionales. Muchos de los RNA's mensajeros (mRNA) sufren varias modificaciones como son el procesamiento de intrones, corte-empalme alternativo, la adición de una estructura llamada 'cap' en el extremo 5', y la poli-adenilación del extremo 3'. Todos estos procesos son blancos de regulación con el objetivo de evitar su degradación y mantener a los mRNA's para su procesamiento. En condiciones de estrés estos procesos son regulados de manera fina para mantener los niveles apropiados de RNAs, en los diferentes tipos celulares y durante las diferentes etapas de su desarrollo, que le permitan a las células realizar las funciones mínimas necesarias para sobrevivir ante esas condiciones adversas.

Después de la producción del mRNA, éste se exporta al citoplasma donde se traduce, proceso que también está sometido a un control riguroso; en particular, porque la síntesis de proteínas es una de las funciones con mayor gasto energético y que disminuye notablemente de forma global bajo condiciones de estrés (Battaglia, 2008). Aunque sorprendentemente se conoce poco sobre los mecanismos regulatorios involucrados en ello, se sabe que varios transcritos de genes activados bajo estas condiciones están sometidos a este nivel de regulación, a través de sus regiones 5' y 3' no traducidas; ya que, a pesar de que la célula disminuye su capacidad de traducción, es importante que mantenga la síntesis de las proteínas que le ayudarán a contender con los efectos del estrés (Battaglia et al., 2008).

## Papel de la regulación traduccional y post-transcripcional en el estrés por déficit hídrico

Las proteínas son la principal base de la actividad celular en todos los tipos de células. Por ello, la producción y regulación de las proteínas es modulada frente a una diversidad de estímulos, como es el caso de la respuesta al estrés.

En las plantas, la traducción se regula en condiciones de déficit hídrico de manera dual. Por un lado, muchos estudios han demostrado que diferentes condiciones de estrés causan una disminución significativa en la síntesis de proteínas totales, lo cual lleva a una situación de represión global de la traducción; sin embargo, existen ciertos mRNAs (que generalmente codifican proteínas involucradas en la respuesta a estrés hídrico) que se traducen normalmente a pesar de la represión global de la traducción. Los mecanismos involucrados en la represión de la síntesis de proteínas y cómo se gobierna la selección de los mRNAs que serán preferencialmente traducidos han sido poco explorados (Battaglia et al., 2008; Branco-Price, Kaiser, Jang, Larive, & Bailey-Serres, 2008).

Por otro lado, existe otro nivel de regulación adicional que se da sobre las proteínas sintetizadas, el cual involucra modificaciones específicas de las mismas que modularán su función. En condiciones de estrés la regulación post-traduccional juega un papel central, pues es una vía de comunicación rápida y sencilla para modular procesos celulares que se lleven a cabo para contender con el estrés. Gracias a las modificaciones post-traduccionales las proteínas son sometidas a cambios que favorecen su activación, represión o inclusive su degradación.

Las modificaciones post-traduccionales suelen ser modificaciones reversibles y covalentes lo cual involucra la alteración de proteínas a través de una diversa gama de modificaciones post-traduccionales que incluyen la fosforilación de hidroxil-aminoácidos (Ser, Thr y Tyr), metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, prolil-hidroxilación, entre muchas otras (Tompa, 2010).

El mecanismo más común de modificación post-traduccional (MPT) es la fosforilación, que además parece ser el más importante y frecuente sistema de regulación en la célula. Las

proteínas pueden ser fosforiladas por cinasas en los residuos de Ser, Thr y Tyr, principalmente, en tanto que los grupos fosfato son removidos por fosfatasas. La delicada regulación entre la expresión espacial y temporal de cinasas y fosfatasas, hacen de este evento reversible (la fosforilación) uno de los más complejos, pues está implicada en la regulación de prácticamente todos los procesos celulares básicos, como la división celular, diferenciación, migración, apoptosis, transmisión sináptica por mencionar algunos. A partir de los análisis de datos *in silico* se predice que un tercio de todas las proteínas eucariontes son blanco de fosforilación reversible, de ahí que cerca del 2% de todas las secuencias codificantes lo sean para cinasas y fosfatasas (Tompa, 2010).

La fosforilación es un tipo de modificación unitaria, es decir que un solo fosfato puede ser agregado a un aminoácido. Sin embargo, una cadena polipeptídica puede ser potencialmente fosforilada en muchos sitios, lo que produce una gama de isoformas que pueden tener distintas actividades biológicas. Otras modificaciones post-traduccionales pueden ser más diversas, con lo que se pueden generar polipéptidos modificados con un número inmenso de posibles variantes (Tompa, 2010).

Las modificaciones post-traduccionales pueden actuar alterando la estructura y/o función al inducir nuevos estados conformacionales. Este tipo de regulación alostérica involucra un conjunto de interacciones moleculares especializadas que están ligadas a un polipéptido particular (Tompa, 2010).

Potencialmente cualquier residuo de Ser, Thr y Tyr puede ser modificado, sin embargo, se requieren algunas características estructurales que permiten la modificación, como puede ser una secuencia local apropiada, una región expuesta y cierta flexibilidad del sitio que va a ser modificado para alcanzar la posición dentro del sitio activo de la enzima modificadora. Curiosamente varias líneas de investigación muestran que existe una íntima relación entre las proteínas intrínsecamente no estructuradas y estas características estructurales (Tompa, 2010).

Las proteínas intrínsecamente no estructuradas

También conocidas como proteínas desordenadas, se caracterizan por tener un ensamblaje

estructural que intercambia conformaciones alternativas rápidamente. Esta propiedad les da características que proteínas con estructuras definidas no poseen, como el incremento en la velocidad de interacción con el ambiente o con sus posibles ligandos, la combinación de tener alta especificidad y promiscuidad, lo que además les da la capacidad de tener más de una función (Kovacs, Agoston, & Tompa, 2008; Olvera-Carrillo et al., 2010; Tompa & Kovacs, 2010).

Uno de los conceptos de la biología estructural de mayor influencia, establecía que para la actividad de una proteína es necesaria una estructura tridimensional definida, lo mismo se aplica para el reconocimiento molecular y para que una enzima lleve a cabo una catálisis. Sin embargo, las IUPs (Intrinsically Unstructured Protein, por sus siglas en inglés) aún sin una estructura estable, son capaces de llevar a cabo diversas funciones (Tompa, 2010). Aunque a la fecha se cuenta con muy poca información sobre su dinámica funcional, existen datos que indican que al menos algunas de estas proteínas o algunas de sus regiones pueden adquirir una estructura definida por su interacción con blancos biológicos tales como otras proteínas, membranas, RNA o DNA. La adquisición de estructura también se ha reportado por autoensamblaje y oligomerización (Tompa, 2010). Además hay ejemplos donde la adquisición de una estructura definida está dada por las condiciones del ambiente como cambios en la temperatura, pH, concentración de iones o la disponibilidad de agua (J. Mouillon, Gustafsson, & Harryson, 2006).

Esto muestra como el desorden estructural puede representar ventajas adaptativas para los organismos. Por ejemplo, algunas de las IUPs que participan en los procesos regulatorios modifican su estructura al adquirir una estructura funcional, la cual puede estar dada por modificaciones post-traduccionales o modificaciones promovidas por cambios en el ambiente. También se han reportado cambios en su conformación estructural al adquirir cierto grado de plegamiento, después de que regiones desordenadas de una proteína se unen a su ligando. Las interacciones entre una proteína o región desordenada y sus ligandos presentan la característica de que a pesar de su baja afinidad muestran una alta especificidad. Además, esta flexibilidad estructural en las IUPs provee de múltiples interfaces moleculares, sin la necesidad de una gran andamiaje proteínico; esta idea se basa en que las interfaces de unión expuestas por las IUPs son más extensas que las de proteínas comunes. Estas regiones flexibles podrían unirse al mismo ligando en diferentes

conformaciones, o bien, la misma región unirse a diferentes ligandos a través de la misma o de una conformación diferente. Estas características resultan en una ventaja desde el punto de vista de la función de proteínas reguladoras, particularmente, aquellas que son puntos centrales dentro de una red de regulación (J. Mouillon et al., 2006; J.-M. Mouillon, Eriksson, & Harryson, 2008).

Análisis en varias proteínas IUPs han mostrado que es común que estas proteínas sean reguladas por modificaciones post-transcripcionales, particularmente la fosforilación, como es el caso de las proteínas CREB (cyclic-AMP response element-binding por sus siglas en inglés), fosfatasa 1, p53, MAP2, tau, p27kip1, estamina, DARPP-32 y las proteínas LEA no son la excepción (Tompa, 2010).

### Las proteínas LEA en la respuesta al déficit hídrico

Una de las respuestas al déficit hídrico ampliamente caracterizadas es la acumulación de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant por sus siglas en inglés), las cuales se descubrieron debido a su elevada acumulación en la fase tardía de la maduración de la semilla, es decir, cuando ésta entra en la etapa de desecación, en donde llega a perder hasta el 98% de su contenido de agua. Estas proteínas cobraron un mayor interés cuando se descubrió que también se acumulaban en respuesta a condiciones de déficit hídrico celular en el desarrollo de otras estructuras como el polen y órganos vegetativos; lo que llevó a proponer que su función estaba relacionada con la protección de las células bajo condiciones ambientales que involucraran el déficit hídrico (Battaglia et al., 2008).

Las proteínas LEA pueden clasificarse dentro de otro grupo más extenso de proteínas a las que se denomina hidrofílicas. Las hidrofílicas se definen por su composición de aminoácidos, donde destaca un porcentaje de glicinas mayor al 6%, y un índice de hidrofílicidad mayor a 1 (Battaglia et al., 2008). Es de llamar la atención el hecho de que este grupo de proteínas está presente en todos los dominios biológicos y que en todos los casos en donde se han encontrado, están asociadas con la respuesta a condiciones de limitación de agua (Battaglia et al., 2008); por lo que se ha propuesto que estas proteínas constituyen uno de los mecanismos necesarios para contender con los efectos de la baja disponibilidad de agua (Olvera-Carrillo et al., 2010).

Aunque no todas las hidrofílicas son proteínas LEA y viceversa, comparten muchas características; en particular las proteínas LEA se caracterizan por tener las siguientes propiedades físico-químicas: su estructura primaria incluye en su mayor parte aminoácidos pequeños, con carga o polares sin carga, indicando que son proteínas predominantemente hidrofílicas. En su mayoría carecen de Cys y Trp. A nivel de su estructura tridimensional, los elementos estructurales que presentan los miembros de las distintas familias indican que poseen un alto porcentaje de una estructura tipo 'random coil', en solución; es decir, proteínas que tienen un ensamblaje estructural que intercambia conformaciones alternativas rápidamente. Además, debido a su potencial flexibilidad estructural han sido consideradas IUPs o proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs del Inglés: Intrinsically Disordered Proteins). Estas propiedades fisicoquímicas les confieren a las proteínas LEA la capacidad de un alto recambio con sus posibles ligandos o interactores, y a la vez se pueden generar interacciones altamente específicas con diversos blancos (promiscuidad) que pueden ser reversibles. Por estas razones, se ha propuesto que estas proteínas, como otras IUPs, tienen la capacidad de tener más de una función (Kovacs et al., 2008).

En un principio algunas de las características de las proteínas LEA llevaron a Dure et al. (1989; 1993) a proponer que su función recae en proteger las membranas o proteínas contra daño producido por la desecación, posiblemente por unirse estrechamente al agua o proveyendo interacciones hidrofílicas en condiciones de baja disponibilidad de agua libre, y previniendo la cristalización de componentes celulares debido a su capacidad de actuar como estabilizador de solventes, con un efecto similar al que se ha propuesto para algunos carbohidratos.

Aunque el rol funcional que cumplen estas proteínas sigue siendo especulativo, la evidencia apoya su participación en la respuesta adaptativa y/o aclimatación al estrés. Para esclarecer su función se han efectuado análisis de expresión ectópica de algunas proteínas LEA en plantas y levaduras, dando como resultado la tolerancia a condiciones de déficit hídrico y al congelamiento (Battaglia et al., 2008; Shih et al., 2008). Además, se ha reportado que la ausencia de ciertas proteínas LEA en *Physcomitrella* y *Arabidopsis sp* provoca un fenotipo osmosensible (Olvera-Carrillo et al., 2010; Saavedra et al., 2006). Éstos y otros ejemplos

sugieren que distintas proteínas LEA pueden tener contribuciones únicas en la protección celular contra el estrés (Shih et al., 2008).

Otro acercamiento para dilucidar la función de las proteínas LEA lo han provisto los análisis *in vitro*, en donde los ensayos de protección de enzimas sensibles a condiciones de estrés, como la desecación o el congelamiento, son estrategias habituales (Battaglia et al., 2008; Shih et al., 2008). Los ensayos de limitación de agua o congelamiento/descongelamiento demuestran que distintas proteínas LEA pueden proteger la actividad de enzimas sensibles al congelamiento o al déficit hídrico como lo son la malato deshidrogenasa (MDH) o la lactato deshidrogenasa (LDH); lo que ha sugerido una función protectora para estas proteínas *in vivo* (Jose L. Reyes et al., 2005; José L Reyes et al., 2008; Shih et al., 2008).

Las proteínas LEA están sujetas a ser activadas o desactivadas por modificaciones post-traduccionales, tal es el caso de la proteína LEA RAB17, cuya fosforilación afecta sus propiedades de unión a péptidos con señales de localización nuclear, y de ERD14, cuya propiedad de unión a iones es dependiente de fosforilación. En *Craterostigma plantagineum*, una proteína similar a proteínas LEA presenta sitios potenciales de fosforilación en regiones que se predice se pueden conformar como 'coiled-coil', lo que permitió generar la hipótesis de que estas modificaciones alteran la especificidad y/o estabilidad de la interacción de estas proteínas con algún blanco (Rohrig et al., 2006).

Las proteínas LEA se encuentran de manera ubicua en el taxa de las plantas, y proteínas con características similares a las proteínas LEA también se han encontrado en organismos como bacterias, cianobacterias, protozoarios y nemátodos, rotíferos, crustáceos e insectos. En estos organismos su presencia está asociada con la tolerancia celular a la deshidratación, donde los genes de las proteínas parecidas a LEA se expresan en condiciones de déficit hídrico o anhidrobiosis, en esporas, embriones, ninfas o tejidos somáticos (Shih et al., 2008).

Clasificación de las proteínas LEA



Aunque los diferentes grupos de las proteínas LEA no guardan relaciones significativas a nivel de secuencia, los miembros de sus diferentes familias son agrupados por sus características fisicoquímicas y perfil de acumulación en diferentes órganos, particularmente en condiciones de déficit hídrico celular. Las proteínas LEA se agrupan por sus características fisicoquímicas comunes y se agrupan en distintas familias con base a su similitud de secuencia y a la conservación de sus motivos distintivos, lo que ha permitido definir entre 5 y 9 grupos (Tabla 1). Aunque se han reportado otras formas de clasificación que han considerado herramientas bioinformáticas como el perfil de probabilidad de proteínas u oligopéptidos (POPP del Inglés: Protein or Oligonucleotide Probability Profile), en donde se toma en cuenta la distribución de ciertos grupos de amino ácidos, generalmente en ventanas pequeñas de 3 a 5 residuos. Con base a estas pequeñas secuencias repetidas se realiza un perfil de similitud (Hunault & Jaspard, 2010; Shih et al., 2008). Sin embargo, esta clasificación no coincide con la obtenida por similitud de secuencia, que sugiere grupos filogenéticamente emparentados, por lo que no se toma en cuenta para este trabajo.

**Tabla 1.** Principales Clasificaciones de las Proteínas LEA.

PFAM (nombre)	Dure et al.	Bray	Tunnacliffe y Wise	Battaglia et al.	Bies- Esthève et al.	Hundertmarke Híncha	Hunault y Jaspard	Shih et al.
PF00257 (dehidrinas)	D11	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	dehidrinas	PF00257	Grupo 2
PF04927 (SMP <sup>b</sup> )	D34	Grupo 6	Grupo 6	Grupo 5A	Grupo 5	SMP	PF04927	Grupo 5
PF03760 (LEA_1)		Grupo4	Grupo 4	Grupo 4A	Grupo 4	LEA_1	PF03760	Grupo 2
	D113			Grupo 4B				
PF03168 (LEA_2)	D95	---	---	Grupo 5C	Grupo 7	LEA_2	PF03168	Grupo 5
PF03242 (LEA_3)	D73	---	Lea5	Grupo 5B	Grupo 6	LEA_3	PF03242	Grupo 3
PF02987 (LEA_4)	D7	Grupo 3	Grupo 3	Grupo 3A	Grupo 6	LEA_4	PF02987	Grupo 4

	D29	Grupo 5		Grupo 3B				
PF00477 (LEA_5)	D19 D132	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	LEA_5	PF00477	Grupo 1
PF10714 (LEA_6)	---	---	---	Grupo 6	Grupo 8	PvLEA18	PF10714	Grupo 4
PF10714 (ABA- WDS)	---	---	---	Grupo 7	---	---	---	---

Este trabajo se apega a la clasificación de Battaglia et al. (2008) que se fundamenta en la conservación de ciertos motivos que diferencian a cada familia y en donde se distinguen siete familias, cuyas características relevantes se describen en seguida.

#### Los grupos de las proteínas LEA

Los miembros del grupo 1 son proteínas de bajo peso molecular y ricas en glicinas (16-21% de la composición total) por lo que adoptan estructuras secundarias flexibles, y poseen al menos un motivo conservado de 20 residuos que se repite en tándem a lo largo de la proteína de 1 a 4 veces. La proteína EM de trigo representa a este grupo, del que se han encontrado homólogos en diversas especies vegetales (Ried & Walker-Simmons, 1993).

El grupo 2 (también conocido como dehidrinas) es uno de los más grandes en cuanto al número de proteínas reportadas, y se acumulan en altos niveles en respuesta a diferentes tipos de estrés como sequía, alta salinidad, bajas temperaturas, déficit de fosfato o a la aplicación exógena de ABA. Son de tamaño variable (14-150 KDa) y poseen al menos tres motivos, representados diferencialmente entre las proteínas de la familia, y que están altamente conservados. En el extremo carboxilo el dominio que es característico de todas las dehidrinas, denominado segmento K, está compuesto de una o varias repeticiones de 15 residuos en tándem, rico en lisinas, cuya secuencia consenso es EKKGIMDKIKEKLP (Dure III, 1993). Algunas dehidrinas también poseen un motivo en la región amino terminal denominado segmento Y, cuya secuencia consenso es (V/T)DEYGNP, así como un motivo rico en serinas, denominado segmento S, de 6 a 9 residuos fosforilables contiguos, como se

ha demostrado en el caso de RAB17 de maíz (Goday, Jensen, Culiáñez-macia, Alba, & Figueras, 1994). Se han encontrado dehidrinas en el citoplasma, la vacuola y el núcleo (Heyen et al., 2014).

Las proteínas de la familia 3 se subclasifican en dos subgrupos (D-7/D29), aunque comparten un dominio de 11 residuos, repetido de 5 a 13 veces en tándem a lo largo de la proteína, lo cual hace que tengan tamaños muy variables. La posición de algunos de los residuos a lo largo del undecámero está conservada, lo cual permite que formen  $\alpha$ -hélices anfipáticas con la posibilidad de interacciones intra e inter-moleculares (Battaglia et al., 2008).

Las proteínas de la familia 4 son de tamaño variable, de 88 a 175 aminoácidos, son ricas en glicinas, treoninas y, a diferencia de otras familias, en alaninas. Según las predicciones basadas en su secuencia de aminoácidos poseen dos dominios, uno en la región amino terminal (60-80 aminoácidos) muy conservado entre los miembros de la familia y que forma una  $\alpha$ -hélice anfipática y, otro, con menor conservación, que se predice que puede adoptar una estructura aleatoria y varía mucho en tamaño (Dure III, 1993; Ingram & Bartels, 1996).

La familia 5 la integran las proteínas LEA 'atípicas', ya que no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a las demás proteínas LEA, también conocidas como 'típicas' (Galau, Wang, & Hughes, 1993).

La familia 6 fue descrita recientemente y se caracteriza por estar compuesta por proteínas altamente hidrofílicas que se localizan en el citoplasma y en el núcleo (J. M. Colmenero-Flores, Moreno, Smith, & Covarrubias, 1999; Colmenero-flores, Campos, Garcarrubio, & Covarrubias, 1997). En el caso de la PvLEA6, la primera proteína descrita para este grupo en *Phaseolus vulgaris*, se ha propuesto que responde al estatus hídrico de la planta durante el desarrollo, ya que no solo se expresa en plantas expuestas a estrés hídrico sino también en las regiones de crecimiento de plantas bien irrigadas, en donde el potencial hídrico es más negativo (menos agua disponible) que en las regiones maduras o que ya no crecen (J. M. Colmenero-Flores et al., 1999).

Las proteínas ASR forman el grupo 7, son proteínas hidrofílicas que se localizan en el núcleo y en el citoplasma, y fueron descritas inicialmente en plantas de tomate y posteriormente, se encontraron genes ortólogos en otras especies como papa, maíz, arroz, pino y uva. A la fecha no se han descrito representantes de esta familia en *Arabidopsis thaliana* (Battaglia et al., 2008)

### La familia 6 de proteínas LEA

Este grupo de proteínas LEA se caracteriza por tener un tamaño pequeño, de entre 7 y 14 KDa, ser altamente hidrofílicas, carecer de residuos de Cys y Trp y por la presencia de cuatro motivos altamente conservados, donde resalta la secuencia LEDYK en el motivo 1 y una prolina y una treonina en las posiciones 6 y 7, respectivamente, en el motivo 2, las cuales están 100% conservadas (Battaglia et al., 2008). Basados en sus características físico-químicas, ensayos *in silico* y la caracterización estructural de PvLEA6, se sugiere que las proteínas en este grupo poseen una estructura flexible (Battaglia et al., 2008; Rivera-Najera et al., 2014).

La proteína PvLEA6 de *P. vulgaris* fue la primera proteína reportada para la familia 6 de proteínas LEA (Colmenero-flores et al., 1997). El transcrito y la proteína se acumulan en semilla seca, en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y por la aplicación de ABA (J. M. Colmenero-Flores et al., 1999). De manera notable se sabe que esta proteína también se acumula en órganos vegetativos bajo condiciones favorables de irrigación; esta acumulación se presenta particularmente en regiones donde la planta tiene valores negativos de potenciales hídrico y osmótico, como en la región de elongación del hipocótilo, en haces vasculares, en meristemos y en hidátodos, lo cual no había sido descrito para otras LEAs. En las células, la proteína PvLEA6 se encuentra localizada en el núcleo y en el citoplasma; los tejidos en donde mostró mayor acumulación fueron la epidermis, los cilindros vasculares y las semillas. Su conservación y características fueron razón para clasificarla como miembro de una nueva familia denominada LEA 6 (J. M. Colmenero-Flores et al., 1999).

En la planta modelo *A. thaliana*, se identificaron tres genes con las características de las proteínas de la familia 6 (Tabla 2) que presentan un porcentaje de identidad en promedio

del 50 %. Estos genes se encuentran en el cromosoma II; dos de ellos se hallan adyacentes y uno hacia el extremo distal del cromosoma, en el brazo superior. La disposición en la que se encuentran se debe posiblemente a su historia evolutiva, como consecuencia de duplicaciones sucesivas, dando como resultado una familia génica (Padilla, tesis de Licenciatura).

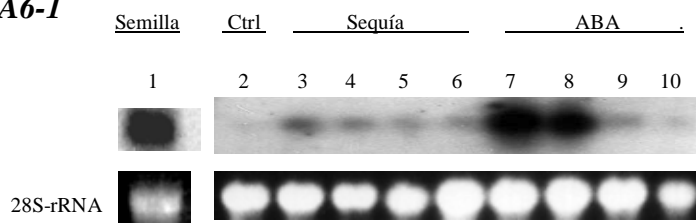
**Tabla 2.** Características de proteínas LEA6 en *A. thaliana*

PROTEINA	Código AGI	LONGITUD aa.	ORF pb	PM kDa	PI	GRAVI	Mayor Expresión
AtLEA6-1	At2g23110	93	279	9.7	6.9	-1.059	Semillas
AtLEA6-2	At2g23120	84	252	8.5	6.6	-1.001	Toda la planta
AtLEA6-3	At2g33690	72	216	7.6	7.0	-1.311	Botones florales

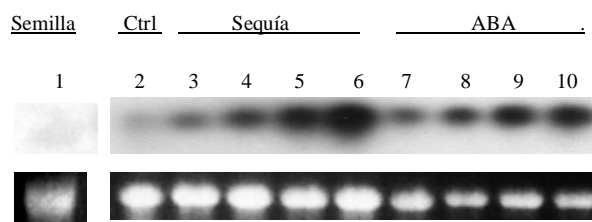
La  
expresión  
de  
los  
miembros

de la familia LEA6 en *A. thaliana* es diferencial. Los patrones de expresión de *AtLEA6-1* muestran que se expresa en semilla, en tejidos vegetativos bajo condiciones de sequía, y tratamientos con ABA aumentan su expresión. En cambio, *AtLEA6-2* no parece expresarse en semilla, aunque sí se expresa en tejido vegetativo en condiciones de irrigación óptima y de sequía, así como por tratamiento con ABA (Fig. 3; Padilla 2013). Finalmente, la expresión del transcrito *AtLEA6-3* parece estar restringida a botones florales, y se presume que esto se debe a que su acumulación se presenta en polen y anteras.

### *AtLEA6-1*

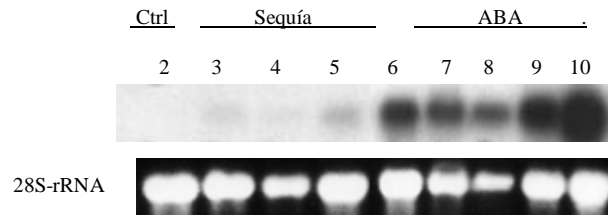


### *AtLEA6-2*



28S-rRNA

*rd29A*



**Fig. 3 Niveles de acumulación del transcrito de los genes *AtLEA6* en tratamientos de sequía y ABA.** En la figura se muestran experimentos tipo Northern donde se observa la acumulación del transcrito de las LEAs indicadas. Para estos ensayos se usó de RNA de plántulas de *A. thaliana* sometidas a sequía durante 3.5, 7, 19 y 24 horas, (carriles **3, 4, 5 y 6**) y tratadas con ABA durante 3.5, 7, 19 y 24 horas, (carriles **7, 8, 9 y 10**). Como sondas se utilizaron los ORFs de *AtLEA6-1* y *AtLEA6-2*, como control positivo de los tratamientos el gen *rd29A* y como control de carga se usó el patrón de tinción del RNA 28S con bromuro de etidio (tomada de Padilla 2013)

Parte de esta información se puede corroborar con las bases de datos de microarreglos como Genecat, Geninvestigator (Fig. 4) y Arabidopsis eFP Browser, los cuales coinciden en que la mayor acumulación del transcrito de *AtLEA6-1* se presenta en semillas, en tanto que el de *AtLEA6-2* se acumula en diversos tejidos, con niveles ligeramente mayores en semillas y que particularmente, la acumulación del transcrito de *AtLEA6-3* se restringe a polen. También en estas bases de datos se resalta que los transcritos para *AtLEA6-1* y *AtLEA6-2* se acumulan abundantemente en respuesta a condiciones de frío, salinidad y estrés osmótico (Winter et al. 2007 en <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

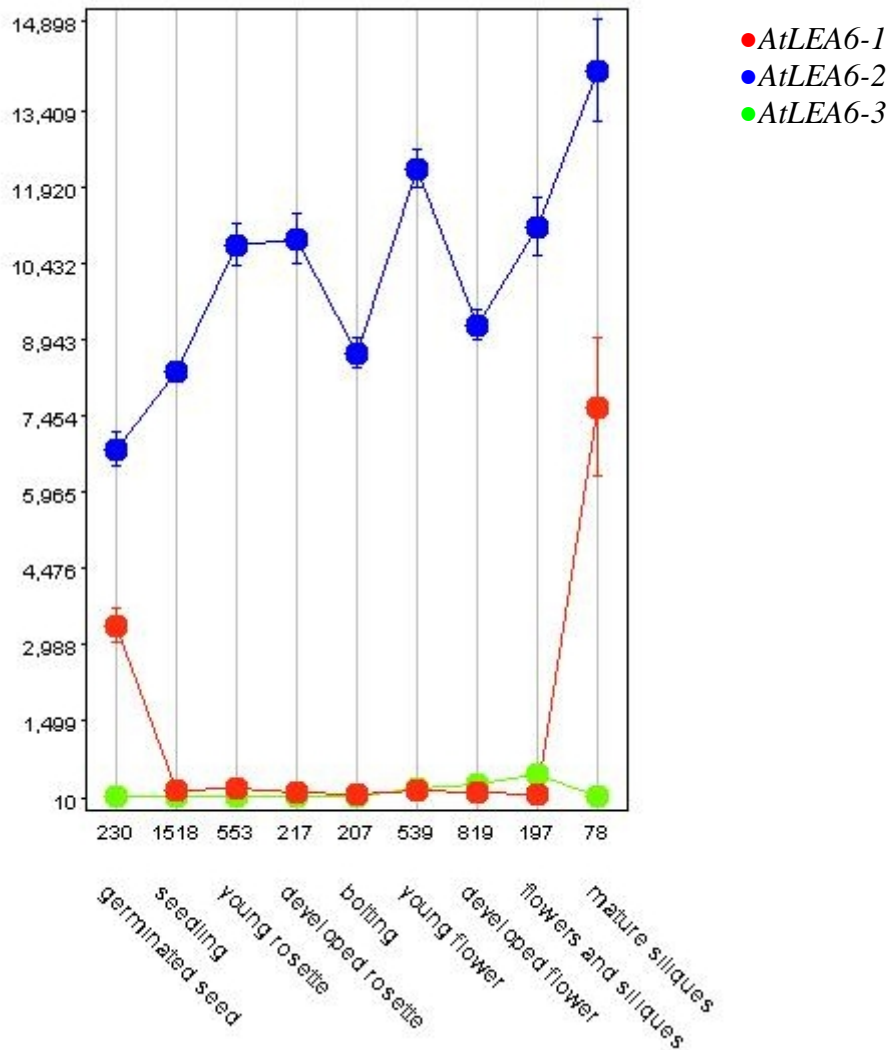


Fig. 4 Perfil de acumulación de los transcritos para la familia *LEA 6* de *Arabidopsis thaliana*. En la gráfica observamos los perfiles acumulación relativa de tres diferentes genes LEA (*AtLEA6-1*, *AtLEA6-2* y *AtLEA6-3*) en el eje Y, mientras que en el eje X, se expresa el número de ensayos de microarreglos reportados para esa condición. En la gráfica se observa que la acumulación de los diferentes transcritos es diferencial entre los órganos de la planta, lo que sugiere que funcionalmente cumplen diversos roles en las distintas etapas del desarrollo, órganos y condiciones por las que atraviesa la planta. En condiciones normales el transcrito para *AtLEA6-1* se expresa en semillas en germinación y en silicuas maduras que contienen semillas. El transcrito de *AtLEA6-2* se acumula en todas los órganos, sin embargo, tiene un aumento considerable en su acumulación en semillas; en tanto que el transcrito para *AtLEA6-3* presenta un ligero aumento en flores (modificado de <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Por lo que se refiere al análisis de las regiones promotoras de los genes miembros de la familia *AtLEA6*, éste muestra que para el gen *AtLEA6-1* y *AtLEA6-2* presentan, en sus

promotores, elementos *cis* involucrados en la respuesta a estrés; como son, los implicados en transducir la señalización mediada por ABA, así como algunos de los identificados en las vías independientes del ABA. Para el gen *AtLEA6-1* destaca un elemento de unión a factores transcripcionales tipo MYB involucrado en la regulación por ABA, dos motivos ABRE y un elemento CE (del Inglés: Coupling Elements) que forman una unidad mínima de respuesta a ABA. En el caso del promotor del gen *AtLEA6-2* destacan elementos asociados con la respuesta mediada por ABA como lo son, un elemento tipo MYB y dos motivos ABRE. También destaca un elemento implicado en la respuesta independiente de ABA, como lo es el elemento DRE. Por lo que respecta al análisis para el gen *AtLEA6-3*, no se detectó ningún elemento *cis* que se haya asociado a la respuesta a estrés, sin embargo sí fue posible identificar un elemento relacionado con la expresión en polen, (Battaglia, 2008; Padilla, 2013); lo cual correlaciona con los resultados de los ensayos *in silico* de expresión, pues se observa expresión en flores (Fig. 4).

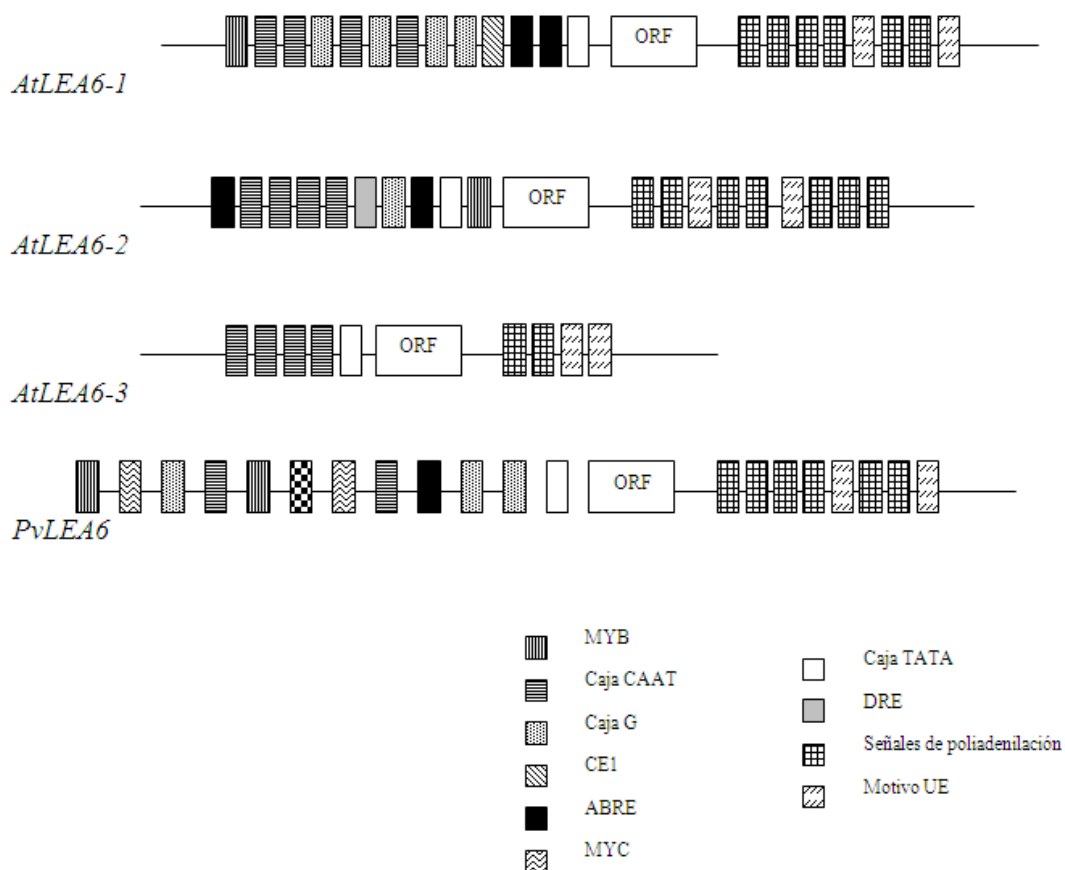




Fig. 5 **Elementos que actúan en cis de regiones 5' y 3' de los genes de la familia 6 de proteínas LEA** en *A. thaliana* y *P. vulgaris*. En cada gen se muestran los elementos en *cis* que se encuentran en el promotor y terminador. Estos son muy diferentes entre los genes lo cual seguramente está relacionado con su patrón de expresión diferencial en *A. thaliana* (Battaglia, 2008).

Además, análisis en la región reguladora 3'UTR del gen *PvLEA-6* con el gen reportero *GUS*, muestran que los patrones de expresión de *GUS* en las plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a déficit hídrico, a tratamiento con ABA o en condiciones de irrigación óptima, son similares a los observados en plántulas de frijol en condiciones normales; sin embargo, cuando la región 3' del gen *PvLEA-6* es sustituida por la región 3' no traducida (UTR) del gen para la nopalina sintasa (3' *NOS*), disminuye la acumulación de *GUS* en respuesta a ABA, y se observa también una pequeña disminución en eventos en el desarrollo y en la deshidratación. Por otro lado, también la región promotora de 2058 pb, usada en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, permite la expresión del gen durante desarrollo, en respuesta a deshidratación y en respuesta a ABA (Moreno, 2009; Moreno-fonseca & Covarrubias, 2001). Recientemente se demostró que la región 3' no traducida (3' UTR) del gen *PvLEA-6* es fundamental en la regulación traduccional de la proteína debido a que, si esta región se trunca o se sustituye por el 3' *NOS*, la eficiencia traduccional disminuye (Battaglia et al., 2008). A pesar de que se conocen los miembros de esta familia en frijol, arroz y *Arabidopsis sp.*, entre otros, no se sabe el rol funcional que tengan durante condiciones de falta de agua, ni la posible actividad que tengan debido a su acumulación en condiciones de irrigación óptima (J. M. Colmenero-Flores et al., 1999).

#### Análisis de la relación estructura-función de la familia 6 de proteínas LEA

Para determinar la función general de la familia de proteínas LEA 6 se desarrolló una estrategia integral que incluía dos enfoques diferentes: el análisis de la estructura de la proteína y el análisis funcional de la familia. Además, el análisis funcional incluía dos acercamientos, por un lado el análisis *in vitro* que contemplaba ensayos de protección enzimática y por otro lado, un análisis *in vivo* en el cual se pretendió hacer la caracterización fenotípica de líneas sobre-expresoras y mutantes con el objeto de dilucidar su participación en la respuesta a estrés (Arroyo-Mosso, 2012; Padilla, 2013; Rangel Ruíz, n.d.; José L Reyes et al., 2008; Rivera-Najera et al., 2014).

Con ensayos de dicroísmo circular para los análisis estructurales, se ha demostrado que la proteína PvLEA-6 posee una estructura flexible en medio acuoso, representada por la formación de hélices poli-L- prolina de tipo II. Sin embargo, cuando se modifican las condiciones con trifluoroetanol (TFE; utilizado para desplazar las moléculas de agua alrededor de las proteínas), se observa que esta proteína tiende a adquirir otra estructura determinada por la presencia de  $\alpha$ -hélices. También se ha visto que PvLEA-6 tiende a estructurarse diferencialmente en respuesta a altas temperaturas: mediante dicroísmo circular se ha observado que aumentando la temperatura de la proteína, ésta parece estar formando hojas beta extendidas, posiblemente modificando el equilibrio entre la estructura poli-L- prolina tipo II y hojas beta extendidas (Rivera-Najera et al., 2014)

Por otro lado, el análisis estructural mediado por dicroísmo circular también se lleva a cabo considerando diferentes condiciones (pH, temperatura, agentes desnaturizantes y alto amontonamiento molecular), pero esto no produjo ningún cambio considerable en la estructura. Con estos experimentos se prueba que la proteína es intrínsecamente desordenada y, que podrían adoptar cambios conformacionales dependiendo de las condiciones ambientales a las que se ve expuesto el organismo (Rivera-Najera et al., 2014).

Para tener un acercamiento a los mecanismos moleculares involucrados en la función de protección celular en condiciones de déficit hídrico de las proteínas LEA de la familia 6, se hicieron ensayos *in vitro* de deshidratación parcial, lo que mostró que la proteína PvLEA6 no es capaz de prevenir la inactivación de las enzimas reporteras malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH) en las condiciones de simulación de estrés analizadas, sugiriendo que esta proteína no actúa necesariamente protegiendo a proteínas de los efectos del déficit hídrico, lo cual no excluye que la LEA6 tenga una sola proteína blanco o una familia de proteínas diferentes a las probadas en estos análisis (Jose L. Reyes et al., 2005; José L Reyes et al., 2008). Otros ensayos utilizando diferentes enzimas sensibles y diferentes condiciones de simulación pueden arrojar nuevos datos acerca de los mecanismos moleculares de protección de esta familia de proteínas. Otro ensayo, con el que sugiere que la proteína PvLEA6 tiene función de chaperona de RNA, es la complementación con esta LEA de la cepa cuádruple mutante de CSPs (del Inglés: Cold Shock Protein) de *E. coli*, que muestra un fenotipo sensible a condiciones de estrés por frío (Rivera Najera, 2015). Estos ensayos se describen adelante en este trabajo.

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio experimental para establecer su participación *in vivo* bajo condiciones de déficit hídrico, para lo cual se inició con el análisis de las características fenotípicas de líneas que sobre-expresan a la proteína PvLEA6 en *A. thaliana*. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas sobre-expresoras de PvLEA6 presentan una mayor producción de semillas versus las líneas silvestres, bajo condiciones de sequía; además, esta línea sobre-expresora tiene una mayor tasa de germinación bajo condiciones de estrés salino (Rangel Ruíz, n.d.)

Otro enfoque en la caracterización de esta familia de proteínas ha sido el análisis funcional en *A. thaliana*, a través de análisis fenotípicos de mutantes en los miembros de la familia 6. Los resultados obtenidos a partir de ensayos de germinación sugieren que estas proteínas participan en la contención al déficit hídrico en condiciones de estrés e incluso en condiciones de déficit hídrico celular impuestas por la planta, como es el caso de las semillas. Además, ensayos hechos en plántulas de la línea mutante, crecidas en condiciones de alta osmolaridad, muestran sensibilidad a estas condiciones, lo que sugiere una participación importante de estas proteínas durante el estrés, en diferentes etapas de la vida de la planta (Arroyo-Mosso, 2012)

# Hipótesis

Algunos de los aminoácidos que destacan por su grado de conservación en la estructura primaria de las proteínas LEA de la familia 6 son mediadores en la adquisición de una conformación funcional de la proteína.

# Objetivos

## General

Determinar el papel de algunos aminoácidos altamente conservados en el funcionamiento de las proteínas LEA de la familia 6.

## Particulares

- i. Determinar si las proteínas LEA de la familia 6 tienen modificaciones post-traduccionales (particularmente la fosforilación) conservadas.
- ii. Determinar el efecto de mutaciones en los motivos altamente conservados sobre la funcionalidad de estas proteínas en ensayos de complementación.

## Materiales y métodos

### Extracción de proteínas totales.

Para la extracción de proteínas totales se utilizó un método que permite enriquecer proteínas desordenadas, entre las que se encontrarían también proteínas hidrofílicas, y que intenta conservar el estado nativo de las proteínas. Para la obtención de esta fracción de proteínas se usaron embriones extraídos de semillas de *P. vulgaris*, variedad negro Jamapa. Al colectar los embriones inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. El tejido se maceró en presencia de hielo seco en un molino de café (Krupps, Modelo 203) y se resuspendió en un volumen de 10 mL de buffer salino con inhibidores de proteasa y fosfatasas (20mM TES-KOH pH 8.8, NaCl 0.5M; Complete [Roche], 1X; 10 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>; 10 mM NaF) por cada gramo de tejido. La suspensión se agitó vigorosamente durante 5 min y la muestra se puso a baño María durante 10 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó dos veces a 14000 rpm durante 10 min. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se cambió a un tubo nuevo. La muestra ya enriquecida se precipitó con el protocolo de TCA/acetona, uno de los métodos de precipitación más comunes, ya que eliminan algunos contaminantes como sales, detergentes, ácidos nucleicos y lípidos que pueden interferir con los análisis de electroforesis en doble dimensión (2D). Para la precipitación de la proteína se realizó lo siguiente. La muestra se mezcló con acetona helada al 100% y TCA (100% p/v), en una relación 9:1, respectivamente. La muestra se guardó a -20°C durante 1 hr, para subsecuentemente centrifugar durante 15 min (14000 rpm a 4°C), se removió el sobrenadante y se lavó con acetona al 100%, helada. Este procedimiento de lavado se repitió cuatro veces. Finalmente, se eliminó toda la acetona y la pastilla se dejó secar por exposición al aire (Méchin, Damerval, & Zivy, 2007). Para los siguientes ensayos, las muestras se resuspendieron dependiendo del caso: en el buffer de fosfatos de sodio pH 8, para los tratamientos de defosforilación; en buffer de hidratación de urea (9.5 M de urea, 2% de Triton X-100, 5% de β-mercaptoetanol, 2% de anfolitos [pH 3/10 y 5/8; BIO-RAD]) para los ensayos de electroforesis en 2D; o en buffer Laemmli 2X, para los ensayos de electroforesis SDS-PAGE. Para resuspender completamente las muestras, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, con continuas agitaciones

en vortex. Finalmente, se centrifugó 10 min (14000 rpm; temperatura ambiente) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La muestra se cuantificó y se guardó a -80°C hasta su uso.

### Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas de los extractos usados en este trabajo, se hizo uso del paquete de reactivos para la cuantificación de proteínas (Protein Assay Reagent Kit) “Micro BCA™ cuyo protocolo utiliza ácido bicinconínico compatible con detergentes para la cuantificación colorimétrica de proteínas en el extracto. Las cuantificaciones se llevaron a cabo de acuerdo a los datos de manufacturación. Todas las muestras en este trabajo, se cuantificaron después de resuspender en el buffer final.

### Ensayos de desfosforilación de extractos totales.

Para la desfosforilación de extractos totales, se utilizaron muestras de extractos proteínicos a una concentración de 0.6mg/ml, en presencia de los inhibidores de proteasas (Complete 1X; Roche). Para la reacción se agregó el buffer de reacción 10X (NaCl, 100mM; Tris-HCl 50mM, pH 8; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; DTT, 1 mM) a una concentración final de 1X y 1U de la enzima fosfatasa por cada 10 µg de proteína. La muestra se incubó dos horas a 37°C. Finalmente, a las muestras se precipitaron con el protocolo de TCA/acetona antes descrito.

### Fosforilación *in vitro* de la proteína PvLEA6.

Los ensayos de fosforilación *in vitro* se realizaron con la proteína PvLEA6, purificada a partir de células de *E. coli* (obsequiada por Lucero Rivera). Ocho µg de la proteína PvLEA6 se incubaron con 10 U de cinasa de caseína II en el buffer 1X de la cinasa (New England Biolabs; P6010S) con 1 µL de ATP 10 µM y 1 µL de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (con una actividad específica de 3000 µCi/µmol). La reacción se realizó en tres viales diferentes para tomar dos tiempos de incorporación de marca radioactiva; como control, una muestra no se incubó y se mantuvo en frío; las otras muestras se incubaron a 30°C por 30 min y 120 min, respectivamente. Una vez incorporada la marca, las muestras se separaron por electroforesis en gel de acrilamida al 15% (30% T, 2.67 C) para posteriormente ser

transferidas a una membrana de nitrocelulosa con el fin de realizar análisis tipo Western (ver detalles en la sección correspondiente). La incorporación de  $^{32}\text{P}$  fue visualizada utilizando el PhosphorImager (Storm 840, Molecular Dynamics).

### Electroforesis en dos dimensiones (2D).

La electroforesis 2D se llevó a cabo en la cámara Mini-PROTEAN 2-D (BIO-RAD, # de catálogo 165-2960) y los experimentos se hicieron de acuerdo a las instrucciones de uso incluidas en el equipo. Para la separación en la primera dimensión (1D) o Isoelectroenfoco (IEF), los geles se prepararon con la siguiente solución: 8 M de Urea, 4% de acrilamida (30% T 5.4% C), 2% de Tritón X-100, 2% de anfolitos totales, 0.01% de persulfato de amonio y 0.1% de TEMED. Esta solución se disolvió calentando a menos de 37°C con agitación suave. Ya preparada la solución de geles IEF, se desgasificó durante 15 min. Se preparó el molde de los geles, que se selló por un extremo con capas de Parafilm, se colocó en posición vertical para colocar los tubos capilares. Una vez listo el molde, se agregaron los catalizadores a la solución y se vertió en los tubos capilares con una jeringa; este procedimiento se hizo con el cuidado necesario para mantener la reproducibilidad de un gel a otro y no generar burbujas. La acrilamida normalmente polimeriza antes de 1 h. Los geles en donde quedaron burbujas atrapadas se descartaron. Después de la polimerización, los tubos se limpiaron del exceso de acrilamida y se les colocaron los conectores flexibles para insertarlos en los adaptadores. Los adaptadores se colocaron firmemente en los agujeros cónicos de la cámara. En caso de no usar todos los dispositivos, se colocaron bloqueadores; en una sola corrida se pueden poner hasta 16 geles IEF. Cada reservorio de muestra se llenó con buffer superior (ver abajo) con una pipeta de punta fina; esta operación se realiza con mucho cuidado para no generar burbujas. El tanque superior se llenó con 70 mL de buffer superior (10 mM de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  desgasificado), mientras que al tanque inferior se le agregó 800 mL del buffer inferior (110 mM de NaOH, desgasificado). Si queda alguna burbuja se puede retirar con una pipeta Pasteur. Para el EIF, los geles se pre-corrieron a 200 V por 10 minutos, 300 V por 15 minutos y 400 V por 15 min, para posteriormente se sustituyeron los buffers y cargaron las muestras para su separación.

Las muestras se prepararon en buffer de urea (9.5 M de urea, 2% de Triton X-100, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2% de anfolitos [pH 3/10 y 5/8; BIO-RAD]). Dependiendo del caso, las

muestras se prepararon en el momento o se almacenaron a  $-70^{\circ}$  C. Antes de cargar las muestras, se incubaron a temperatura ambiente de 10 a 15 min. Después de la pre-electroforesis y del cambio de los buffers, primero se cargó el buffer de sobre-cubrimiento (4 M de urea, 1% de anfolitos [pH 3/10 y 5/8; BIO-RAD] y 500  $\mu$ L de bromofenol azul a una concentración de 0.05% [p/v] para un volumen final de 10 mL) con pipetas con punta fina. Es importante que éste buffer tenga una densidad menor a la de la muestra y que no genere burbujas mientras se coloque. Las muestras se cargaron en la superficie superior del gel, así la muestra no tuvo contacto con el Buffer superior. La electroforesis se realizó a 500 V por 10 minutos y 750 V por 4 horas. Al terminar la corrida se verificó la ausencia de burbujas, en el caso de que algún gel presentase burbujas se descartó, pues la presencia de burbujas puede afectar la corrida. Los geles capilares se eyectaron de los capilares de vidrio con el sistema de expulsión del producto. Los geles se usaron inmediatamente o se guardan a  $-70^{\circ}$  C.

En la segunda dimensión, los geles de IEF se incubaron con el Buffer de equilibrio (Tris-HCl, 0.0625 M pH 6.8; SDS 2.3%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y 2.5 mL de bromofenol azul 0.05% [p/v], en una solución final de 100 mL) durante 30 min. Posteriormente, se prepararon geles de 1 mm acrilamida/bis 15% (30% T, 2.67 C) de manera tradicional y de acuerdo al equipo de BIORAD. Los geles de IEF se cargaron de derecha a izquierda con una orientación que va de básico a ácido, respectivamente. El marcador de peso molecular se colocó en una orilla con una tira de papel Whatman 3MM.

La separación por SDS-PAGE se realizó durante 2 horas a 90 V. Posteriormente, se siguió el ensayo tipo Western como se describe a continuación.

Para mayor información consultar los manuales de instrucciones disponibles en [www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf](http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/BioRad.pdf) y [www.bio-rad.com/webroot/web/.../10007296.PDF](http://www.bio-rad.com/webroot/web/.../10007296.PDF)

### Ensayos tipo western

Después de la electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 15%, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) en condiciones húmedas durante 1 hora a 200 mA con buffer de transferencia (glicina 0.19 M; Tris-HCl 25 mM;



metanol 20% [Towbin et al. 1979]). La transferencia se verificó por tinción reversible de las membranas con el reactivo rojo de Ponceau S (rojo de Ponceau 0.2% en ácido acético al 1%).

Posteriormente, las membranas se bloquearon en TBST-leche (TBST: Tris, 20mM, pH 8.0; NaCl, 150mM; Tween, 0.1%; leche descremada en polvo 5%) por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación oscilatoria. Ya bloqueadas las membranas, se incubaron 1 hora con el anticuerpo primario anti-PvLEA6 diluido 1:5000. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-leche 5% por 10 min para eliminar el exceso del primer anticuerpo. En seguida se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo, acoplado a peroxidasa (Boehringer Mannheim) en una dilución 1:30000, con agitación oscilatoria a temperatura ambiente. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con TBST 1X, por 10 min cada uno. El revelado se llevó a cabo incubando las membranas con el sustrato: Luminol y peroxidasa (SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent substrate; 34079; Thermo Scientific) en una relación de 1:1 durante tres minutos. Posteriormente, a las membranas se les retiró el exceso del reactivo y se colocaron entre dos acetatos para exponerlas a una película radiográfica (Medical X-ray general purpose Blue, Kodak) dentro de un cassette que impide el paso de la luz. Se reveló según fue necesario, dependiendo de la reacción de quimioluminiscencia.

Ensayos *in silico* y otras herramientas computacionales.

En este trabajo se usaron tres diferentes herramientas computacionales para la predicción de sitios de fosforilación: SAPHIRE (Trost & Kusalik, 2013), DISPHOS (Iakoucheva, Radivojac, Brown, O'Connor, Sikes, Obradovic & a K. Dunker 2004) y PlantPhos (Lee, Bretaña, & Lu, 2011). El programa SAPHIRE es uno de los primeros programas que fue desarrollado para la predicción de fosforilación en plantas diferentes a *Arabidopsis thaliana*. Para elaborar este programa se usaron los datos existentes de soya (*Glycine max*). Por otro lado, la herramienta computacional DISPHOS fue diseñada para identificar sitios de fosforilación en proteínas intrínsecamente desordenadas. En este programa se hace uso de algunas características comunes en los sitios de fosforilación de proteínas desordenadas como composición de aminoácidos, complejidad de secuencias, hidrofobicidad, carga y

otros atributos de las secuencias que se encuentran junto a estos sitios. Finalmente, también se usó el programa PlantPhos que predice sitios de fosforilación en plantas. A diferencia del programa SAPHIRE, éste se desarrolló usando los datos de *A. thaliana*. Los ensayos *in silico* utilizando los tres programas se desarrollaron de acuerdo al manual de usuario, y los resultados se compilaron para construir la Figura 5 en el programa Word 2013.

Otros análisis *in silico* consistieron en apilamientos (alineamientos en representación gráfica) de secuencias utilizando la herramienta llamada MEME (del Inglés: Multiple Em for Motif Elicitation). Este programa se usa para el descubrimiento y análisis de motivos en secuencias de DNA o proteínas. Además, su interface muestra los datos en una gráfica de ocurrencia que te permite ver la abundancia de cada nucleótido/aminoácido. Este programa se usó de acuerdo al manual de usuario.

Para alineamientos convencionales de secuencias de ADN y proteínas, se usaron los programas EnzimeX y Clustal  $\Omega$  de acuerdo a las especificaciones.

### Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR se hicieron en una mezcla de buffer para PCR 10X (Tris, 200 mM, pH 8.4; KCl, 500 mM; Concentración final 1X), buffer de  $MgCl_2$ , 20 mM (Concentración final 2 mM), dNTPs 10  $\mu$ M (Concentración final 0.1  $\mu$ M), oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) a una concentración 25  $\mu$ M (Concentración final 0.25  $\mu$ M), Taq polimerasa (1% por reacción) y 0.1-1  $\mu$ g de templado. Los termocicladores usados fueron el Mastercycler personal Eppendorf  $\text{\textcircled{R}}$  y, para el análisis en gradiente el equipo PTC-200 PeltierThermalCycler, AlphaUnit  $\text{\textcircled{R}}$ . Los fragmentos obtenidos se identificaron por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1% (m/v), buffer TAE 1x y bromuro de etidio 2.5  $\mu$ M) utilizando como buffer de corrida TAE 1X (Tris-acetato, 0.04M; EDTA, 0.001 M, pH 8.0) y una corriente de 100 V por 30 min; los geles fueron fotografiados con una cámara GE $\text{\textcircled{R}}$  ImageQuant 300 y procesados para la cuantificación de bandas con el programa del fabricante ImageQuant, en una computadora Dell con Windows XP profesional.

La purificación de DNA a partir de gel de agarosa se llevó acabo utilizando el paquete comercial de Fermentas (#K0691) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Generación de mutaciones en el gen *AtLEA6-1*

Las mutantes del gen *AtLEA6-1* utilizadas en los ensayos funcionales de *E. coli* BX04, se obtuvieron por mutagénesis sitio dirigida de acuerdo al protocolo reportado (Heckman & Pease, 2007). Un esquema de su funcionamiento se puede consultar en la Figura 9. Para realizar las mutantes se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, uno de los cuales amplifica desde el extremo 5' del gen hasta el sitio de modificación y el otro par amplificó la región desde el extremo 3' del gen hasta el sitio de modificación en el otro sentido. Los oligonucleótidos se sobrelaparon sobre el sitio a mutar, se diseñaron con la modificación de interés. Para el diseño de los oligonucleótidos usados en estos ensayos se consideró agregar al menos quince nucleótidos hacia cada extremo, a partir de sitio a modificar. Cada gen mutante diferente se construyó con dos ciclos secuenciales de PCR, generando en un primer ciclo dos fragmentos que se complementan en sus extremos 3'. En la primera ronda de PCR tiene dos diferencias importantes a lo mencionado en el protocolo de PCR anterior. De esa manera se produjeron dos fragmentos que tienen en uno de sus extremos la región a modificar. Estos fragmentos se purificaron y se usaron como templado para una nueva amplificación de PCR, en donde se utilizó a los oligonucleótidos externos. De esta manera se construyeron las versiones mutantes del gen *AtLEA6-1*, con las modificaciones de interés. Estos genes se clonaron en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO para posteriores sub-clonaciones. Los oligonucleótidos usados para la mutagénesis se muestran en el Anexo (1).

## Ensayos de choque térmico frío en *E. coli* BX04

Los marcos abiertos de lectura de los genes *AtLEA6-1* y *AtLEA6-2*, se obtuvieron de DNA genómico, ya que carecen de intrones y fueron clonados en el vector pTrc99A (Anexo 3) digerido con *NcoI-PstI*; en tanto que la del gen *AtLEA6-3* se insertó en el mismo vector digerido con *EcoRI-PstI* de pTrc99A. Las diferentes construcciones se verificaron por PCR y por secuenciación (Anexo 2). Posteriormente, se transformaron en la cepa de *E. coli* BX04, la cual carece de cuatro proteínas de respuesta a frío (CSPs), lo que le confiere un fenotipo de alta sensibilidad al frío (Xia, Ke, & Inouye, 2001). Las células de BX04 que contienen pTrc99A-*AtLEA6-1*, pTrc99A-*AtLEA6-2*, pTrc99A-*AtLEA6-3*, pTrc99A-*PvLEA6* (Rivera Najera, 2015) o, pTrc99A vacío (control negativo), se crecieron igual que a una

cepa de *E. coli* silvestre (control positivo), en medio Luria-Bertani líquido (3 ml) con espectinomicina (resistencia de la cepa *E. coli* BX04) y ampicilina (resistencia del vector pTrc99A) durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se re-inocularon en 3ml de medio LB líquido utilizando el cultivo anterior con 40 µL para las mutantes y 25 µL para la silvestre, y se crecieron sin antibióticos hasta un densidad óptica (OD) de 0.4, que se alcanzó en aproximadamente 2 horas. Al terminar el periodo de incubación, se realizó la lectura de la OD a 600 nm, y se hicieron diluciones para realizar goteos de diluciones de dos, tres y cuatro órdenes de magnitud. Para partir del mismo número de células, los cultivos se ajustaron al momento de hacer la primera dilución. Las diferentes diluciones se usaron para gotear 5 µL de muestra en cajas cuadradas. Cada caja contiene 50 mL de medio LB sin antibióticos y contiene hasta 36 gotas independientes. Puesto que se hicieron tres diluciones de cada muestra, en cada caja se gotearon 12 muestras. El experimento consiste en imponer un tratamiento de estrés por frío en donde se incuban las cajas a 15°C durante cinco días y después pasan por un proceso de recuperación a 25°C durante 32 horas; al final del periodo de recuperación se tomaron imágenes de los resultados.

Al igual que la versión silvestre, las mutantes del gen *AtLEA6-1* se clonaron en el vector pTrc99A digerido con *NcoI-PstI*, y las construcciones se verificaron por PCR y secuenciación (Anexo 2). Posteriormente, se transformaron en la mutante BX04. Los experimentos de choque térmico por frío se realizaron de acuerdo a la descripción anterior.

# Resultados

## Parte I

### Identificación de modificaciones post-traduccionales en 2D.

Experimentos de electroforesis en ensayos de 2D hechos previamente en el laboratorio, mostraron la presencia de más de una señal correspondiente a la masa molecular para la proteína PvLEA6 pero con diferente punto isoeléctrico, lo que sugiere que la proteína PvLEA6 podría presentar modificaciones post-traduccionales (J. Colmenero-Flores, Moreno, & Covarrubias, n.d.).

Para determinar la presencia de modificaciones post-traduccionales en la proteína PvLEA6 proveniente de tejidos de embriones de *Phaseolus vulgaris*, se llevaron a cabo experimentos de electroforesis en 2D (Ver detalles en Materiales y métodos). Este tipo de ensayos permiten detectar cambios en el punto isoeléctrico de la(s) proteína(s) de interés. Estos cambios los pueden causar modificaciones de algunos de sus residuos de aminoácidos. Para ello se extrajeron proteínas de embriones obtenidos de semillas secas de frijol, puesto que existe evidencia de que en estos tejidos la acumulación de PvLEA6 es mayor (J. Colmenero-Flores et al., n.d.). El extracto proteico se sometió a una separación por electroforesis en 2D; posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con el fin de detectar las diferentes isoformas de la proteína PvLEA6 con anticuerpos específicos contra esta proteína (ver detalles en Materiales y métodos).

En la figura 5 se muestra un resultado representativo de estos ensayos, el cual fue reproducible en 5 ocasiones. La imagen muestra dos puntos que presentan la misma migración que el monómero de la proteína PvLEA6, con una masa molecular aproximada de 14 kDa. El pI aproximado para cada una de ellas es de 6.6 y 7.1. El pI calculado de la proteína a partir de su secuencia de aminoácidos es de 6.4, lo cual no concuerda con lo observado, aunque ello sugiere la presencia de diferentes modificaciones post-traduccionales que alteran su punto isoeléctrico.

En la figura 5 cabe hacer notar que se detectó reacción con el anticuerpo en una región donde migraron proteínas con masas moleculares entre 35 y 40 kDa, las cuales presentan un pI aún más ácido. Esta observación es consistente con lo reportado por Rivera-Najera (2015) relativo a la propiedad de esta proteína para formar oligómeros (Rivera-Najera et al., 2014). En este caso particular, la masa molecular del punto, corresponde a lo que podría ser un trímero fosforilado de la PvLEA6 (Fig. 5). Sin embargo, en este tipo de experimentos no es posible definir si esta señal u otras que se detectan con una masa molecular aún mayor (aprox. 70 kDa) correspondan a homo-oligómeros o hetero-oligómeros de esta proteína.

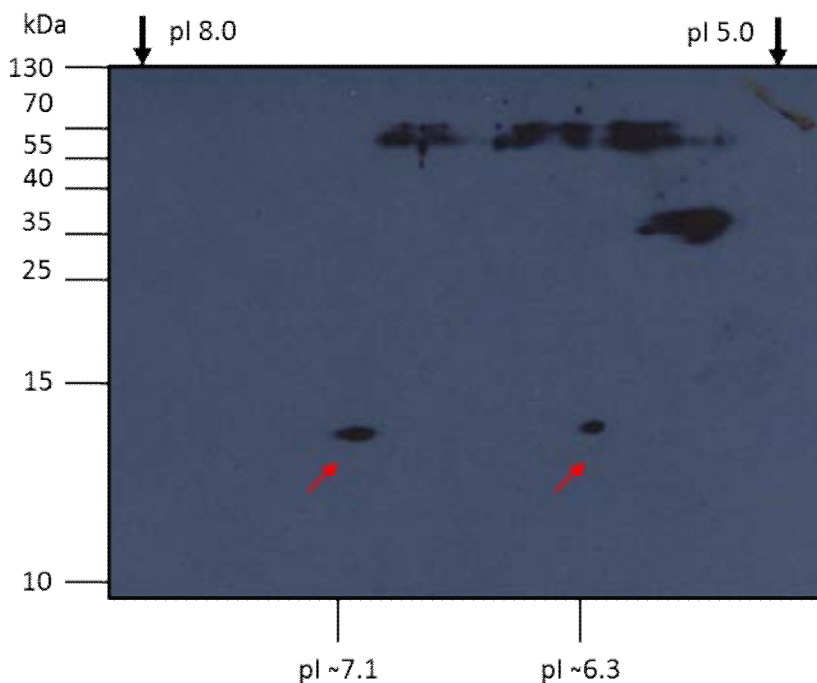
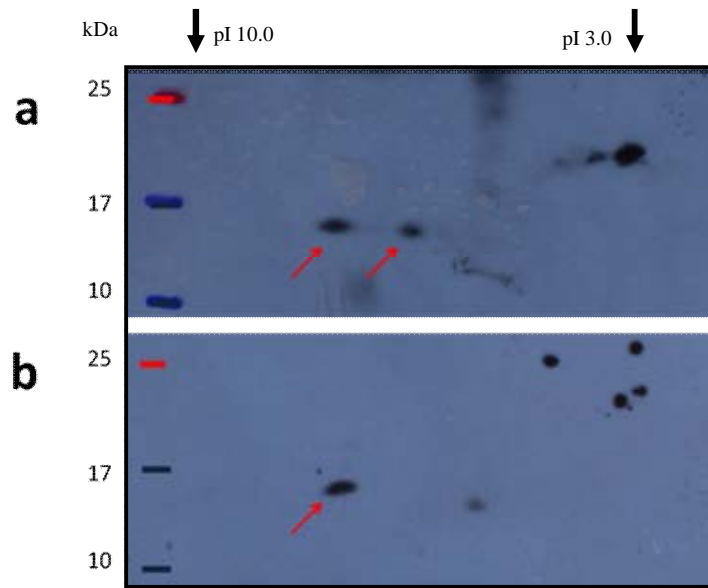


Fig 5. **Ensayo tipo western de extractos totales de embrión de *Phaseolus vulgaris*.** En esta figura se muestra el ensayo tipo Western utilizando el anticuerpo policlonal anti-PvLEA6 sobre extractos totales de tejido de embrión de frijol separados por electroforesis en 2D. Las flechas indican las señales que corresponden a una masa molecular aproximada de 14 kDa, correspondiente al de la proteína PvLEA6. Además, se pueden observar otras formas con mayor peso molecular que pueden corresponder a homo-oligómeros o hetero-oligómeros de esta proteína. El rango de pI de los anfolitos utilizados para la 1D de la electroforesis fue de 5-8, como se indica en la parte superior de la figura. La orientación de la migración del electroisoeñofoque tiene una dirección de izquierda a derecha, es decir, de básico a ácido. La electroforesis desnaturizante de la 2D se realizó en un gel de acrilamida (15 %) más SDS. Los anticuerpos se utilizaron en las siguientes diluciones: anticuerpo primario (Anti.PvLEA6) 1:2,000; anticuerpo secundario (Anti-Peroxidasa) 1:30,000.



**Fig. 6. Ensayo de comprobación de fosforilación.** Ensayos tipo western utilizando el anticuerpo policlonal anti-PvLEA6 sobre extractos totales de tejido de embrión sin tratamiento (**a**) o con tratamiento de desfosforilación (**b**; para detalles ir a Materiales y métodos), separados por electroforesis en 2D. Las flechas indican en ambos paneles las señales que migraron con una masa molecular aproximada de 14 kDa, que corresponde a la proteína PvLEA6. En la imagen se puede observar que mientras en el panel 'a' se observan dos señales, en el panel 'b' se observa sólo una. El rango de pI de los anfolitos utilizados para la 1D de la electroforesis fue de 3-10, como se indica en la parte superior de la figura. La orientación de la migración del electroisoeñofoque tiene una dirección de izquierda a derecha, es decir de básico a ácido. La electroforesis desnaturizante de la 2D se realizó en un gel de acrilamida (15 %) más SDS. Los anticuerpos se utilizaron en las siguientes diluciones: anticuerpo primario (anti-PvLEA6) 1:2,000; anticuerpo secundario (anti-Peroxidasa) 1:30,000.

Con el fin de demostrar si alguna de las isoformas de la proteína PvLEA6 que se habían detectado por electroforesis en 2D eran el producto de modificaciones por fosforilación, se llevó a cabo un tratamiento con fosfatasa alcalina (FA) del extracto de proteínas; de tal forma que la señal correspondiente a aquellos polipéptidos fosforilados disminuiría después del tratamiento de desfosforilación. La figura 6 muestra una comparación de los resultados obtenidos de este tipo de experimentos entre extractos con y sin tratamiento de FA, sometidos a una separación por electroforesis en 2D y analizados en ensayos tipo western utilizando el anticuerpo anti-PvLEA6. La muestra del extracto de proteínas que no fue tratado con FA dio un resultado muy similar al mostrado en la figura 5; es decir, se aprecian dos puntos que migran con el peso molecular aparente de 14 kDa correspondiente al monómero de la proteína PvLEA6 y que presentan pI en el rango previamente detectado (Fig. 5 y 6a). Por otro lado, en el extracto tratado con FA se detecta mayoritariamente la

isoforma con un pI más básico (correspondiente al predicho a partir de la secuencia de aminoácidos sin fosforilar), en tanto que la señal de la isoforma más ácida, que correspondía, ya no es detectable (Fig. 6b). Este resultado indica que la proteína PvLEA6 se fosforila *in vivo* y que en el embrión seco se acumulan ambas isoformas de esta proteína, la fosforilada y la no fosforilada.

### Predicción de fosforilación en proteínas de la familia LEA 6

Con el objetivo de investigar posibles modificaciones post-traduccionales de las proteínas LEA del grupo 6, en este trabajo se llevó a cabo análisis *in silico*, utilizando programas disponibles en la red. Para identificar los sitios potenciales de fosforilación se utilizaron los programas SAPHIRE (Trost & Kusalik, 2013), DISPHOS (Iakoucheva et al., 2004b) y PlantPhos (Lee et al., 2011).

Aunque la evidencia que motivó este análisis se obtuvo originalmente para la proteína PvLEA6, en este ensayo se incluyeron los miembros de esta familia en *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max*, con la finalidad de buscar tendencias en los sitios predichos de fosforilación.

En la Figura 7, se muestran los resultados obtenidos de este estudio, del cual destaca la concentración de los potenciales sitios de fosforilación en dos regiones de estas proteínas, lo cual coincide entre los resultados de los diferentes programas (Fig. 7). En ambos casos, el aminoácido fosforilable se encuentra altamente conservado en esta familia (Fig. 9); además de que el posible evento de fosforilación en estos residuos, con todos los programas usados, se predijo con un alto índice de probabilidad de acierto.

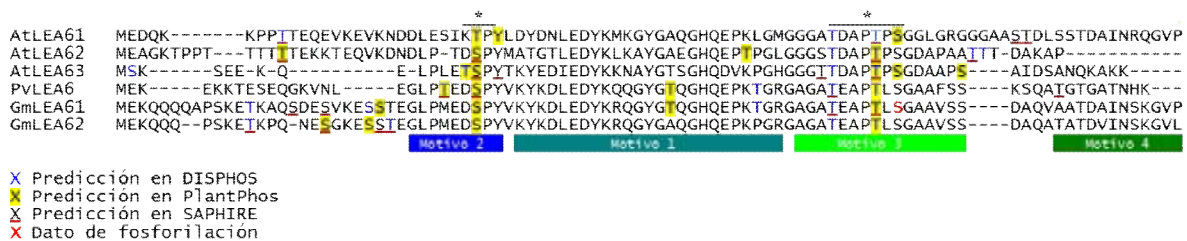


Fig. 7. **Compilación del análisis *in silico* y P<sup>3</sup>BD.** Compilación de los resultados obtenidos de los predictores de fosforilación, PlantPhos, SAPHIRE y DISPHOS y un dato de la base de datos de fosforilación en plantas, P<sup>3</sup>BD. Para realizarlo de cada programa se tomaron las cuatro mejores predicciones de fosforilación para cada



proteína, en cada predictor, y se marcaron en el alineamiento de secuencia realizado manualmente. Adicionalmente se indican con asteriscos dos regiones que presentan una alta incidencia de aparición en los mejores candidatos de cada predictor. Finalmente se muestran las posiciones de los motivos en el alineamiento con diferentes colores; el motivo más conservado es el número 1.

Al menos, la predicción de fosforilación del residuo de Ser 73 de la proteína GmLEA6-1 se pudo confirmar a partir de la base de datos de fosforilación de proteínas de plantas (Yao, Bollinger, Gao, Xu, & Thelen, 2012) en la que de acuerdo a datos de espectrometría de masas de alta resolución, presenta un evento de fosforilación (Fig. 7, letra en rojo). Por tanto, estos resultados corroboran que este tipo de modificación post-traducciona ocurre y se encuentra conservado en soya.

Por estas evidencias y por el efecto que estas modificaciones pudieran tener sobre la función de estas proteínas, como ocurre en otras proteínas desordenadas (Gao, Iangjiong, & Xu, 2012), se decidió explorar experimentalmente la fosforilación de la proteína LEA6 de frijol, (PvLEA6).

#### Ensayos de fosforilación *in vitro* en la proteína PvLEA6

Para determinar si la proteína PvLEA6 es blanco de fosforilación, fue el desarrollo de experimentos *in vitro* usando la cinasa de caseína 2 (conocida como CK2). En estos ensayos la proteína recombinante de *P. vulgaris* se incubó con la CK2 y ATP, en condiciones óptimas, durante 60 y 120 min (ver Materiales y métodos para los detalles del procedimiento). Como control de fosforilación se incluyó la misma CK2 sin la proteína de interés, ya que esta enzima es capaz de auto-fosforilarse.

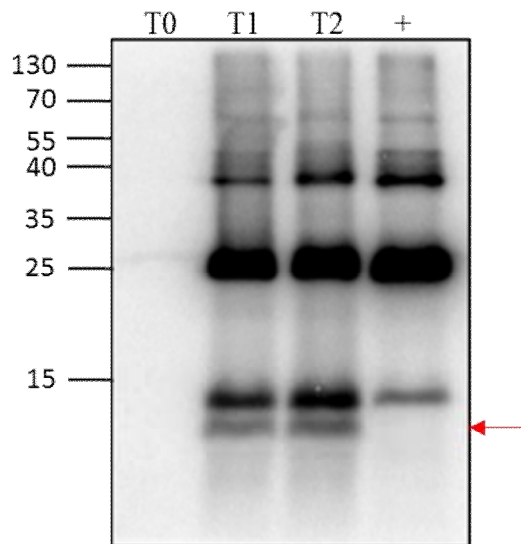


Fig. 8. **Ensayos de fosforilación *in vitro***. Fosforilación de la proteína recombinante PvLEA6 con CK2 en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . La marca radioactiva se visualizó en un PhosphorImager (STORM). Para la electroforesis SDS-PAGE se usaron 500 ng de PvLEA6 marcada durante 0, 60 y 120 min. Los carriles aparecen de izquierda a derecha en el siguiente orden: los productos de las reacciones de fosforilación durante 0 min (T0), 30 min (T1), 120 min (T2). Como control positivo de fosforilación se incluyó una reacción con la enzima CK2 (+). La flecha roja indica la posición de las bandas correspondientes a la proteína PvLEA6, que corresponde con el tamaño de ~14 kDa.

En la figura 8 se observa que la proteína PvLEA6 se fosforiló (Flecha roja; Fig 6) ya que se puede detectar una banda radioactiva con la masa molecular aparente correspondiente a esta proteína (14 kDa; Fig. 6). Cabe hacer notar que en los carriles T1 y T2 además de la banda correspondiente a la proteína PvLEA6 (Flecha roja; Fig 6), se detecta una banda de mayor masa molecular que correspondería a la CK2. Estos resultados demuestran que la proteína PvLEA6 puede ser sustrato de fosforilación en las condiciones mostradas, lo que sugiere que ésta podría ser fosforilada *in vivo*.

## Parte II

Otro de los objetivos de esta tesis fue el generar mutaciones en una de las proteínas LEA del grupo 6 con la intención de investigar cuáles regiones en esta proteína son relevantes para su función. Para este objetivo se decidió utilizar uno de los genes de *A. thaliana* debido a la facilidad que representa este sistema modelo para realizar experimentos que permitan un análisis funcional en planta.

Puesto que durante mi trabajo de tesis de Licenciatura se demostró que una mutante nula de *A. thaliana* en el gen para la proteína LEA6, resulta en un fenotipo de sensibilidad a limitación de agua, se consideró que un análisis funcional futuro habría que realizarlo sobre la proteína AtLEA6-1, ya que, esto nos permitiría llevar a cabo experimentos de complementación sobre la mutante *atlea6-1*. Basados en estos objetivos y los mencionados más adelante, se realizaron los experimentos mostrados a continuación.

### Ensayos de mutagénesis dirigida en el gen *AtLEA6-1*

Para determinar el papel de algunos aminoácidos en la familia 6 de proteínas LEA, se realizó un análisis comparativo entre las secuencias de los miembros de esta familia para identificar aquellos aminoácidos o motivos que presentaran una alta conservación.

Para determinar la conservación de los aminoácidos en la familia de proteínas LEA 6 se realizó un análisis tipo MEME (Bailey et al., 2009). Este programa es una herramienta de análisis de motivos en una secuencia de proteínas, con la que es posible presentar los datos en gráficos en donde el tamaño de la letra correspondiente a un aminoácido indica la conservación del mismo basado en modelos estadísticos que determinan la frecuencia en la ocurrencia de aminoácidos individuales, a partir de un grupo de secuencias determinado (Bailey et al., 2009). Con este sistema se identificaron los motivos altamente conservados y los aminoácidos más representativos en cada motivo (Fig. 9). De este análisis destacan algunas firmas y/o aminoácidos que inclusive no presentan ningún cambio entre las proteínas utilizadas en este análisis, lo que denota que algunas de estas regiones pueden tener relevancia funcional en la planta.

A partir de estos datos se eligió modificar, debido a su alta conservación y potencial relevancia funcional, los siguientes aminoácidos de la proteína AtLEA6-1: la tirosina en las posiciones 29, 31, 38 y 42 respectivamente; la histidina en la posición 48 y la treonina en la posición 64. Asimismo, se decidió modificar las firmas SPY (27, 28, 29) y LEDYK, (35, 36, 37, 38, 39) el desarrollo de estas dos mutantes estuvo a cargo de la Biol. D Méndez. La figura 10 muestra los aminoácidos a modificar en el gen *AtLEA6-1*, y los cambios que se realizaron en las mutantes.

Por otro lado, aunque algunos otros aminoácidos y firmas fueron considerados a lo largo del proyecto, en este trabajo sólo se presentan los resultados de estas modificaciones.

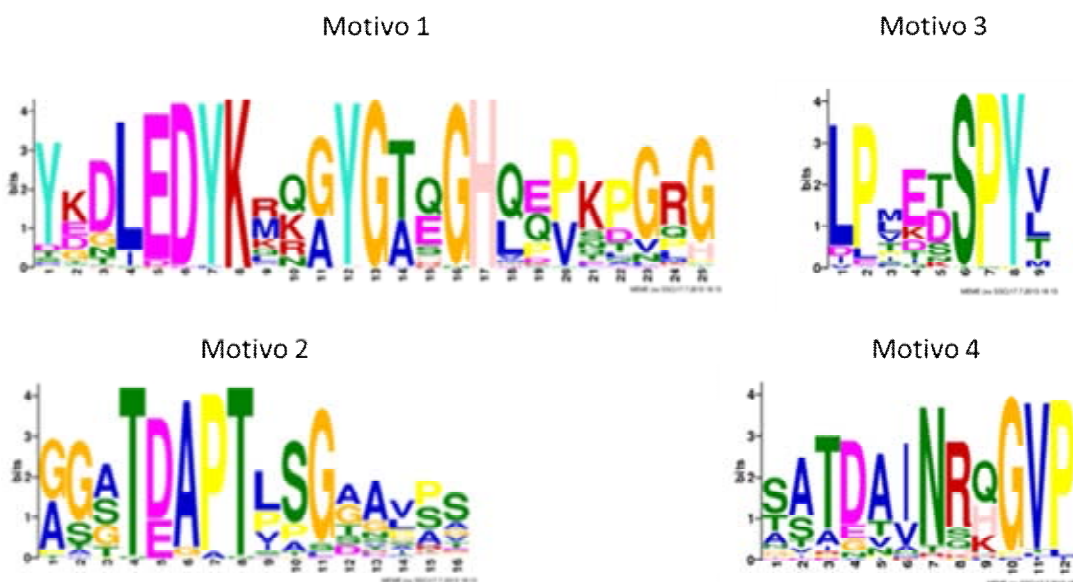


Fig. 9 **Análisis de la conservación de los aminoácidos en los diferentes motivos distintivos de la familia 6 de proteínas LEA.** En este esquema se observan los cuatro motivos de la familia 6 de proteínas LEA, en donde se muestra la conservación de los aminoácidos de acuerdo al tamaño de las letras, en este sentido, entre más grande sean, mayor es la conservación.

Una cuestión importante en la generación de las mutantes fue la selección del aminoácido a sustituir en los sitios de interés; en estos ensayos la mayoría de las mutaciones se diseñaron para sustituir el aminoácido a modificarse con alanina (A). La alanina es el aminoácido más pequeño, después de la glicina, y es de carácter hidrofóbico. Este aminoácido es el que se utiliza con mayor frecuencia para las sustituciones en la mutagénesis sitio dirigida, ya que permite observar mejor el efecto de la ausencia del aminoácido de interés, frente al uso de otros aminoácidos. Sin embargo, para el aminoácido treonina (T) en la posición 64, además de generar la sustitución por alanina, también se realizó la sustitución por un ácido aspártico (D), este otro sitio tiene la finalidad de mimetizar una fosforilación (Dissmeyer & Schnittger, 2011); ya que de acuerdo a los análisis bioinformáticos (Fig 7), este sitio es un fuerte candidato para ser blanco de fosforilación. En la Figura 10 se muestran los aminoácidos modificados y la modificación de sus respectivos codones.

Para realizar la modificación de aminoácidos se usó la técnica de mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El esquema en la Figura 11 muestra los detalles de esta estrategia. Este ensayo consistió en dos PCRs secuenciales en el que se usaron cuatro oligonucleótidos, dos de los cuales fueron externos al gen *AtLEA6-1* y los otros dos fueron complementarios a la sección del gen que se deseaba modificar; además estos oligonucleótidos internos se diseñaron de acuerdo a la modificación que se deseaba introducir en el gen *AtLEA6-1*.

M	E	D	Q	K	K	P	P	T	T	E	Q	E	V	K	E	V	K	N	D	D	L	E
ATG	GAG	GAT	CAG	AAA	AAG	CCA	CCA	ACG	ACC	GAG	CAA	GAA	GTG	AAA	GAA	GTT	AAA	AAC	GAC	GAC	CTC	GAG
TAC	CTC	CTA	GTC	TTT	TTC	GGT	GGT	TGC	TGG	CTC	GTT	CTT	CAC	TTT	CTT	CAA	TTT	TTG	CTG	CTG	GAG	CTC
S	I	K	T	P	Y	L	D	Y	D	N	L	E	D	Y	K	M	K	G	Y	G	A	Q
TCT	ATC	AAG	ACC	CCA	TAC	TTG	GAC	TAT	GAT	AAC	TTG	GAA	GAT	TAC	AAG	ATG	AAA	GGT	TAC	GGA	GCA	CAA
AGA	TAG	TTC	TGG	GGT	ATG	AAC	CTG	ATA	CTA	TTG	AAC	CTT	CTA	ATG	TTC	TAC	TTT	CCA	ATG	CCT	CGT	GTT
G	H	Q	E	P	K	L	G	M	G	G	G	A	T	D	A	P	T	P	S	G	G	L
GGC	CAC	CAA	GAG	CCT	AAA	CTC	GGT	ATG	GGA	GGT	GGA	GCC	ACC	GAT	GCT	CCC	ACT	CCT	TCA	GGC	GGT	CTT
CCG	GTG	GTT	CTC	GGA	TTT	GAG	CCA	TAC	CCT	CCA	CCT	CGG	TGG	CTA	CGA	GGG	TGA	GGA	AGT	CCG	CCA	GAA
G	R	G	G	G	A	A	S	T	D	L	S	S	T	D	A	I	N	R	Q	G	V	P
GGA	CGC	GGT	GGA	GGC	GCT	GCA	TCG	ACG	GAT	CTT	TCT	TCT	ACC	GAT	GCG	ATT	AAC	CGT	CAG	GGC	GTT	CCG
CCT	GCG	CCA	CCT	CCG	CGA	CGT	AGC	TGC	CTA	GAA	AGA	AGA	TGG	CTA	CGC	TAA	TTG	GCA	GTC	CCG	CAA	GGC
-																						
TGA																						
ACT																						
M	E	D	Q	K	K	P	P	T	T	E	Q	E	V	K	E	V	K	N	D	D	L	E
ATG	GAG	GAT	CAG	AAA	AAG	CCA	CCA	ACG	ACC	GAG	CAA	GAA	GTG	AAA	GAA	GTT	AAA	AAC	GAC	GAC	CTC	GAG
TAC	CTC	CTA	GTC	TTT	TTC	GGT	GGT	TGC	TGG	CTC	GTT	CTT	CAC	TTT	CTT	CAA	TTT	TTG	CTG	CTG	GAG	CTC
S	I	K	A	A	A	L	D	A	D	N	A	A	A	A	A	M	K	G	A	G	A	Q
TCT	ATC	AAG	GCC	GCA	GCC	TTG	GAC	GCT	GAT	AAC	GCG	GCA	GCT	GCC	GCG	ATG	AAA	GGT	GCC	GGA	GCA	CAA
AGA	TAG	TTC	CGG	CGT	CGG	AAC	CTG	CGA	CTA	TTG	CGC	CGT	CGA	CGG	CGC	TAC	TTT	CCA	CGG	CCT	CGT	GTT
G	A	Q	E	P	K	L	G	M	G	G	G	A	T	D	A	P	A/D	P	S	G	G	L
GGC	GCC	CAA	GAG	CCT	AAA	CTC	GGT	ATG	GGA	GGT	GGA	GCC	ACC	GAT	GCT	CCC	GMT	CCT	TCA	GGC	GGT	CTT
CCG	CGG	GTT	CTC	GGA	TTT	GAG	CCA	TAC	CCT	CCA	CCT	CGG	TGG	CTA	CGA	GGG	CKA	GGA	AGT	CCG	CCA	GAA
G	R	G	G	G	A	A	S	T	D	L	S	S	T	D	A	I	N	R	Q	G	V	P
GGA	CGC	GGT	GGA	GGC	GCT	GCA	TCG	ACG	GAT	CTT	TCT	TCT	ACC	GAT	GCG	ATT	AAC	CGT	CAG	GGC	GTT	CCG
CCT	GCG	CCA	CCT	CCG	CGA	CGT	AGC	TGC	CTA	GAA	AGA	AGA	TGG	CTA	CGC	TAA	TTG	GCA	GTC	CCG	CAA	GGC
-																						
TGA																						
ACT																						

Fig. 10 **Diseño de las mutantes en para el gen *AtLEA6-1***. En la parte superior se muestra la secuencia del gen *AtLEA6-1* silvestre en donde se muestra en letras rojas los aminoácidos que se modificaron con sus respectivos codones. Mientras que la secuencia de la parte inferior muestra al gen *AtLEA6-1* con los aminoácidos modificados y los codones que se usaron para generar esas modificaciones. En el caso de la modificación de la T64, los oligonucleótidos usados para generar las mutaciones se diseñaron usando bases degeneradas en el que se implementó el siguiente código de una letra: M=CA y K=GT.

En la primera ronda de PCR se generaron dos segmentos del gen, a partir de oligonucleótidos que flanquean el gen y de los oligonucleótidos internos que portan la mutación de interés. Estos fragmentos, que se sobreponen en el extremo de los

oligonucleótidos internos, fueron usados posteriormente como templados en una segunda ronda de PCR, con la que se ensambla el gen completo con la mutación de interés. Los oligonucleótidos internos tuvieron la función de empalmar regiones complementarias en su región 3' terminal, además de introducir las sustituciones, inserciones o supresiones en el segmento intermedio a través de esta mutagénesis sitio dirigida. Al empalmarse las hebras de estos productos intermedios, que hibridaron en su región 3', y que con un ensayo de PCR subsecuente se generó el producto total amplificado, el cual contenía las mutaciones deseadas. Esta estrategia permite diseñar el segmento para sub-clonarlo en el vector de interés, al incluir en los oligonucleótidos externos las secuencias deseadas para tal fin. (Fig. 11; Heckman & Pease, 2007).

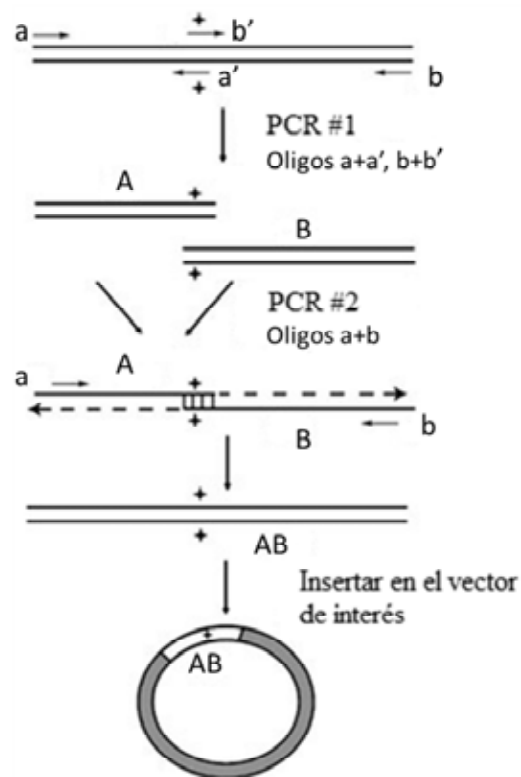


Fig. 11 **Esquema de la mutagénesis sitio dirigida por PCR.** En el esquema se muestra la secuencia de interés y la distribución de los cuatro oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos internos ( $a$  y  $b$ ) se modificaron para introducir las mutaciones deseadas en el gen de interés (*AtLEA6-1*). En una primera ronda de PCR se realizaron ampliaciones usando los juegos de oligonucleótidos  $a-a'$  y  $b'-b$ , lo que produjo los fragmentos  $AB$  y  $CD$  que a su vez son complementarios en la región 3'. Estas secuencias se llevaron a una

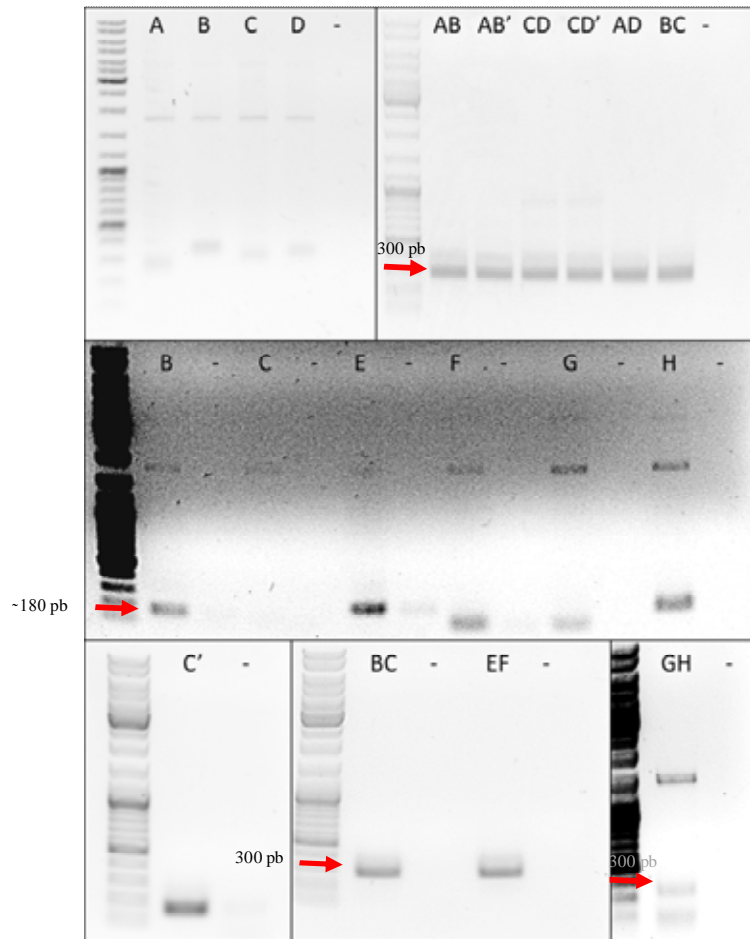
nueva reacción de PCR en donde se usaron los oligonucleótidos externos (a y b) para generar la secuencia completa AB con las mutaciones incluidas (Heckman & Pease, 2007). Finalmente este fragmento se inserta en el vector de interés, en este caso pTrc99A.

Para la generación de las mutantes en el gen *AtLEA6-1*, se produjeron diferentes juegos de oligonucleótidos. Algunos de estos oligonucleótidos presentan degeneraciones con la finalidad de poder acoplar las diferentes mutantes en una sola construcción y/o generar más de una mutante con un solo juego de oligonucleótidos (Anexo 1).

Los oligonucleótidos que se muestran en el Anexo 1 se utilizaron de acuerdo al esquema de la Figura 10, lo cual resultó en los productos que se muestran en la Figura 12. En éstos ensayos se usaron oligonucleótidos correspondientes al gen *AtLEA6-1* y cuatro pares de oligonucleótidos más, en este caso internos al segmento, para sustituir seis de los aminoácidos altamente conservados: Y29-Y32, Y38-Y43, T64 y H58.

Los ensayos de PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en gel (Fig. 12). Los productos de PCR se purificaron y se usaron como templado para el siguiente ciclo de PCR en el que se usaron los pares de fragmentos AB, CD, EF y GH, para reconstituir la región codificadora del gen *AtLEA6-1* con las mutantes. Además, se aprovechó que los fragmentos reconstituidos B y C comparten una pequeña región que puede empalmarse, lo que permitiría obtener la mutante de la proteína *AtLEA6-1* sin las cuatro tirosinas.

Los oligonucleótidos usados en el segundo ciclo de PCR se diseñaron con sitios de restricción en los extremos con la finalidad de clonar el producto obtenido en el vector pTrc99A, en este caso usando los sitios BamHI y PstI. Los fragmentos se purificaron del gel y se digirieron con las enzimas BamHI y PstI al igual que el vector pTrc99A. El fragmento del vector que se utilizó para clonar se separó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos productos de las PCRs, se ligaron independientemente al fragmento del vector, a 16° C durante toda la noche. La reacción de ligación se realizó en una relación molar de 5:1 de los fragmentos respecto al vector. En esta la parte del trabajo no se tomaron imágenes de los geles que contenían a los fragmentos obtenidos, para evitar en medida de lo posible el daño producido por la luz UV al material genético que se usó.

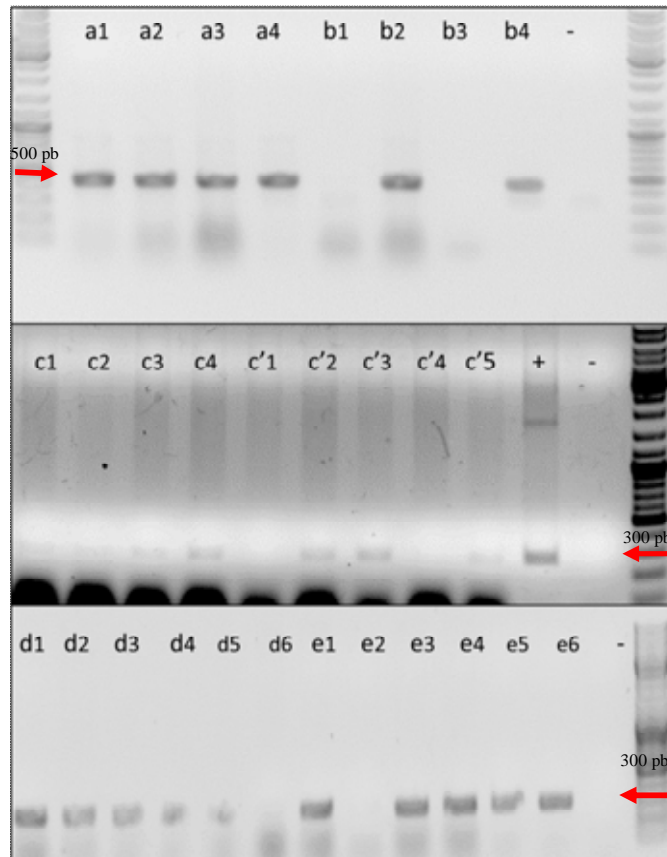


**Fig. 12 Generación de mutantes del gen *AtLEA6-1* por mutagénesis sitio dirigida.** En esta figura se muestran ensayos de electroforesis en gel donde se muestran los fragmentos obtenidos de la primera fase de PCR (A, B, C, D, E, F, G y H las letras que tienen el símbolo [ ] son repeticiones); los tamaños observados corresponden con su diseño. Para la segunda fase de PCR que tiene la finalidad de reconstruir el gen con la mutación de interés, se usaron los oligonucleótidos externos del gen *AtLEA6-1*, por lo que se esperó un producto aproximado de 280 pb. Las flechas rojas señalan el peso molecular que corresponde a 300 pb en el marcador. En la imagen, los productos obtenidos se muestran con los siguientes códigos: AB, CD, BC, EF y GH; que corresponden a las mutantes Y29:32A Y38:43A, T64AD y H58A respectivamente. Además, se amplificaron los productos AD y BC, con los cuales se intentó generar la cuádruple mutante, Y29:32:38:43A. Finalmente, estos fragmentos se purificaron y usaron para la clonación en el vector pTrc99A.

Los productos de ligación en pTrc99A se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De la transformación se obtuvieron clonas para cada uno de los fragmentos, conteniendo las mutaciones de interés. Las clonas obtenidas se verificaron por PCR (Fig. 13). Finalmente, para verificar que las mutantes obtenidas correspondieran a las mutantes diseñadas, se verificó toda la secuencia del segmento insertado en el vector de destino. Para ello se extrajo DNA de plásmido de estas cepas y se solicitó su secuencia



nucleotídica correspondiente (Anexo 2). Los resultados obtenidos mostraron que todas las líneas correspondieron a su diseño, excepto la mutante de la histidina, que no se pudo obtener en las diferentes repeticiones en las que se intentó. Por lo que se procedió con los experimentos planeados sin incluir a la mutante de la *AtLEA6-1* en la histidina 48.



**Fig. 13 Comprobación de la inserción en las clonas de posibles mutantes en el gen *AtLEA6-1* en ensayos de PCR.** En la imagen se muestra el resultado de análisis por PCR de las clonas que se obtuvieron de los ensayos de ligación en el vector pTrc99A. Este ensayo se realizó usando los oligonucleótidos del vector pTrc99A que amplifican un fragmento aproximado de 480 pb (letras a y b) y oligonucleótidos del gen *AtLEA6-1* que amplifican un fragmento aproximado de 280 pb (letras c, d y e). Las flechas rojas señalan el peso molecular marcador a 300 o 500 pb según sea el caso. Las letras corresponden a las diferentes líneas de mutantes que se generaron: a, Y29:32A; b, Y38:43A; c, Y29:32:38:43A; d, T64A-D; e, H58A. De cada línea se analizaron varias colonias, como se observa en la imagen. Para la cuádruple mutante (Y29:32:38:43A) en tirosinas se probaron las dos versiones que se generaron (Fig. 12). De estos resultados se eligieron las cepas que se usarían para los ensayos de complementación de la cepa de *E coli* BX04.

## Análisis funcional de las proteínas LEA de la familia 6

Para determinar la función de la familia 6 de proteínas LEA se efectuaron ensayos de complementación de la cepa mutante de *E. coli* BX04, la cual carece de cuatro chaperonas moleculares que participan en la contención del estrés por frío. Análisis previos en esta cepa de *E. coli* produciendo la proteína PvLEA6, mostraron que la presencia de esta proteína era capaz de complementar uno de los fenotipos que esta cepa presenta en respuesta a tratamientos por bajas temperaturas (Rivera Najera, 2015). Para determinar si otras proteínas LEA de la familia tenían el mismo efecto, se probaron las tres proteínas de la familia 6 de *A. thaliana*.

Para este ensayo, las regiones codificadoras de los genes *AtLEA6-1*, *AtLEA6-2* y *AtLEA6-3* se clonaron a partir de DNA genómico ya que carecen de intrones (Fig. 14). La inserción de los fragmentos de DNA correspondientes se llevó a cabo en el vector pTrc99A, el cual contiene un promotor inducible por IPTG. Después de la comprobación de las construcciones, éstas se transformaron en la cepa BX04.

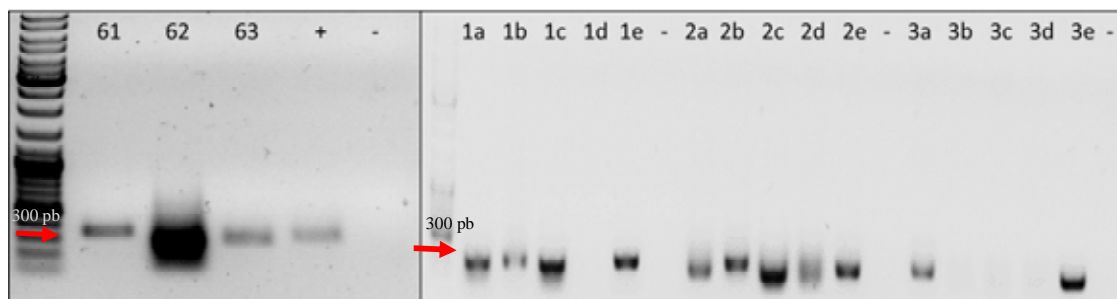


Fig. 14 **Clonación de los genes de la familia LEA 6 de *A. thaliana* en pTRC99a.** En la primera imagen (izquierda) se muestra el resultado del ensayo de PCR para amplificar los genes *AtLEA6-1* (61), *AtLEA6-2* (62) y *AtLEA6-3* (63) a partir de DNA genómico; estos fragmentos tienen un tamaño de 279, 252 y 216 respectivamente, como control positivo (+) se usó un vector verificado con el gen *AtLEA6-1*. La amplificación del gen *AtLEA6-2* se realizó en un experimento independiente, con condiciones diferentes, lo que explica las diferencias con el resto de las muestras. Las flechas rojas señalan el peso molecular marcado a 300 pb. En la segunda imagen (derecha) se muestra el resultado de PCR de colonia de algunas de las clonas obtenidas después de la clonación de los insertos de la primera imagen, en el vector. De las líneas que amplificaron, se seleccionaron 2 de cada línea y se enviaron a analizar por secuenciación.

Después de validar la presencia de las construcciones de interés en la cepa BX04, se llevó al ensayo de choque térmico por frío (ver Materiales y métodos). En este ensayo se usaron cepas con el fondo genético de BX04 que expresaban las proteínas LEA6 de *A. thaliana* y *P. vulgaris*. Como control se utilizaron, la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC99a vacío (negativo) y una cepa silvestre de *E. coli* (positivo).

	s/IPTG			25 $\mu$ M IPTG			100 $\mu$ M IPTG		
	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>
BX04/pTRC99A AtLEA61				●	●				
BX04/pTRC99A AtLEA62				●			●	●	●
BX04/pTRC99A AtLEA63				●	●		●	●	●
BX04/pTRC99A PvLEA6				●	●		●	●	●
BX04/pTRC99A							●		
DH5 $\alpha$ silvestre	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Fig. 15 **Complementación fenotípica de la mutante BX04 con las proteínas LEA 6 de *A. thaliana* y *P. vulgaris*.** En estos ensayos se usaron los genes *AtLEA6-1*, *AtLEA6-2*, *AtLEA6-3* y *PvLEA6* para complementar la cepa de *E. coli* BX04. En la imagen se observan tres columnas que tienen diferentes condiciones de inducción: sin IPTG, 25  $\mu$ M de IPTG y 100  $\mu$ M de IPTG. En ellas se aprecia que las cepas que expresan a las proteínas LEA 6 son capaces de crecer ante los tratamientos de estrés por frío, en contraste con la cepa mutante y las cepas que no expresan a las LEAs 6. Aunque se observa cierto crecimiento en la cepa BX04 que expresa el vector vacío, los niveles de crecimiento son muy bajos respecto a los de complementación con los de las proteínas LEA.

En este ensayo se usaron diferentes diluciones de los cultivos de las diferentes líneas celulares que se manejaron, para posteriormente usarlas en ensayos de goteo en cajas de LB con diferentes concentraciones de IPTG. Las cajas se incubaron a 15°C durante 5 días y se recuperaron a 25°C por 30 horas. Ante este tratamiento la cepa mutante BX04 es incapaz de crecer (Fig. 15); en cambio, las cepas con los plásmidos de donde se espera se expresen las proteínas PvLEA6, AtLEA6-1, AtLEA6-2 y AtLEA6-3 muestran crecimiento, en diferentes niveles, tras su inducción con IPTG (Fig. 15). Para el caso de la proteína AtLEA6-1, se observaron menores niveles de complementación tras la inducción con 25  $\mu$ M de IPTG, y no se observó un incremento a mayores concentraciones de IPTG (100  $\mu$ M). En tanto que para las proteínas AtLEA6-2 y PvLEA6, se detectaron bajos niveles de complementación tras la inducción con 25  $\mu$ M de IPTG y una mayor complementación (más crecimiento) al aumentar la concentración

de IPTG a 100  $\mu$ M. Finalmente, para el caso de la proteína AtLEA6-3, resultó que los niveles de complementación son muy similares tras la inducción con las dos concentraciones de IPTG utilizadas. Estos resultados indican que las proteínas LEA del grupo 6 son capaces de disminuir la sensibilidad de la cepa BX04 al tratamiento de baja temperatura impuesto, debido a la falta de las chaperonas cspA (Xia et al., 2001). Estos resultados sugieren que las proteínas LEA de la familia 6 tienen la capacidad de funcionar como chaperonas de RNA, un mecanismo molecular de acción que no se había sugerido para las proteínas LEA.

Por otro lado y, con el objetivo de determinar la relevancia funcional de algunas de las secuencias más conservadas en esta familia, en la función que complementa la sensibilidad a frío de la cepa BX04, se determinó la capacidad de complementación de este fenotipo en la cepa BX04, con las mutantes obtenidas en el gen AtLEA6-1.

En la figura 16 se muestran los resultados de los ensayos de complementación en BX04 de las dobles mutantes en tirosinas del gen *AtLEA6-1* (Y29:32A y Y38:43A). Estas tirosinas destacan por ser algunos de los aminoácidos más conservados dentro de la proteína, entre las diferentes especies donde se encuentre representada esta familia. Los ensayos de complementación de la mutante BX04 mostraron que estas mutaciones no afectan la capacidad de la proteína AtLEA6-1 para complementar el fenotipo de sensibilidad a bajas temperaturas de la cepa BX04.

	s/IPTG			25 $\mu$ M IPTG			100 $\mu$ M IPTG		
	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>
BX04/pTRC99A AtLEA61									
BX04/pTRC99A AtLEA61 Y29:32A									
BX04/pTRC99A AtLEA61 Y38:43A									
BX04/pTRC99A PvLEA6									
BX04/pTRC99A									
DH5 $\alpha$ silvestre									

Fig. 16 **Complementación fenotípica de la mutante BX04 con mutantes del gen *Atlea6-1*.** En estos ensayos se probaron las mutantes en las tirosinas (Y29:32A y Y38:43A) del gen *AtLEA6-1* en la complementación de BX04. En la imagen se observa que sin IPTG ninguna de las construcciones es capaz de complementar a la cepa BX04, pero a diferentes concentraciones de IPTG (25 y 100uM) si son capaces de complementar parcialmente el fenotipo de la mutante BX04, aunque ninguna de las mutantes del gen *AtLEA6-1* fue deficiente en la complementación de la mutante BX04.

Por otro lado, también se realizaron este tipo de ensayos con las mutantes de la proteína *AtLEA6-1* en los motivos TPY y LEDYK los cuales muestran una alta conservación en esta familia (Fig. 9). Al igual que en el caso anterior, los resultados de estos ensayos mostraron que tampoco estas mutaciones afectan la capacidad de complementación de esta proteína (Fig. 17). Inclusive, la mutante en la cual los aminoácidos de los dos motivos fueron modificados, por lo cual esta proteína mutante contendría ocho mutaciones puntuales, tampoco se detectaron defectos en esta capacidad funcional (Fig. 17).

	s/IPTG			25 $\mu$ M IPTG			100 $\mu$ M IPTG		
	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>-4</sup>
BX04/pTRC99A AtLEA61									
BX04/pTRC99A AtLEA61 T27A, P28A, Y29A									
BX04/pTRC99A AtLEA61 L35A, E36A, D37A, Y38A, K39A									
BX04/pTRC99A AtLEA61 T27A, P28A, Y29A, L35A, E36A, D37A, Y38A, K39A									
BX04/pTRC99A PvLEA6									
BX04/pTRC99A									
DH5 $\alpha$ silvestre									

Fig. 17 **Complementación fenotípica de la mutante BX04 con mutantes del gen *AtLEA6-1*.** En estos ensayos se probaron las mutantes en las firmas LEDYK y TPY del gen *AtLEA6-1* para la complementación de la mutante BX04. En la imagen se observa que sin IPTG, ninguna de las construcciones es capaz de complementar a la cepa BX04, pero a diferentes concentraciones de IPTG (25 y 100  $\mu$ M) sí son capaces de complementar parcialmente el fenotipo de la mutante BX04. En estos ensayos ninguna de las mutantes del gen *AtLEA6-1* fue deficiente en la complementación.

Finalmente, en los ensayos de BX04 también se probaron las mutantes dirigidas al aminoácido T en la posición 64 (Fig. 18), que corresponde a uno de los candidatos a ser blanco modificaciones post-traduccionales de acuerdo a los datos de predicción de fosforilación. Para este residuo se realizaron dos mutaciones de sustitución de base, por un lado la treonina se sustituyó por alanina, con el objetivo de determinar el efecto de la falta de este aminoácido en la función de la proteína. Y por otro lado, se realizó el cambio de la treonina por ácido aspártico. Este cambio se denomina mutación mimética, pues presenta características similares a las que presentaría el aminoácido fosforilado. Este cambio tiene por objetivo determinar cómo afecta la fosforilación de la proteína en la complementación de la cepa mutante BX04. En estos ensayos, las mutantes parecen tener cierto efecto en los niveles de complementación, pero sin análisis cuantitativos sólo se puede sugerir que ensayos más robustos u otra clase de análisis podrían exacerbar estas pequeñas diferencias.

	s/IPTG			25 $\mu$ M IPTG			100 $\mu$ M IPTG		
	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$
BX04/pTRC99A AtLEA61									
BX04/pTRC99A AtLEA61 T64A									
BX04/pTRC99A AtLEA61 T64D									
BX04/pTRC99A PvLEA6									
BX04/pTRC99A									
DH5 $\alpha$ silvestre									

Fig. 18 **Complementación fenotípica de la mutante BX04 con mutantes del gen AtLEA6-1.** En estos ensayos se probaron las mutantes en la treonina 64 del gen *AtLEA6-1* para la complementación de BX04. En la imagen podemos observar que sin IPTG ninguna de las construcciones es capaz de complementar a la cepa BX04, pero a diferentes concentraciones de IPTG (25 y 100 $\mu$ M) sí son capaces de complementar parcialmente el fenotipo de la mutante BX04.

## Discusión

En los últimos tiempos el concepto de desorden al hablar de proteínas se ha ido extendiendo a tal grado de que se le considere un fenómeno general. Ahora se sabe que las proteínas desordenadas, o que tienen regiones desordenadas, están involucradas en todas las funciones importantes de los seres vivos. Este hecho abre la puerta a un nuevo paradigma de la estructura-función de las proteínas (Tompa, 2010).

En plantas, las IUPs que se conocen, han sido poco estudiadas estructural y funcionalmente. Tal es el caso de las proteínas LEA típicas, que si bien algunas han sido ampliamente caracterizadas (dehidrinas), la mayoría de ellas han sido trabajadas poco, como es el caso de la familia 6 de proteínas LEA, una de las familias más conservadas. En este trabajo se investigan algunas características de las proteínas LEA de la familia 6.

### Parte I

#### Identificación de modificaciones post-traduccionales en 2D

En el frijol común (*P. vulgaris*) se analizó la posibilidad de que el miembro de la familia 6 de proteínas LEA de esta planta tuviera modificaciones post-traduccionales. El análisis con ensayos de 2D mostró un patrón que sugería que la proteína PvLEA6 es blanco de modificaciones post-traduccionales. En estos ensayos de 2D se observaron dos puntos que coinciden con el peso molecular aparente de la proteína PvLEA6, pero con pIs diferentes. Con este resultado propusimos que una de las isoformas es la proteína nativa, mientras que la otra isoforma corresponde a la proteína PvLEA6 modificada post-traduccionamente. Este resultado sugiere inmediatamente una forma de regulación que ha sido poco explorada en el mundo de las proteínas LEA, y que sin embargo puede tener importantes repercusiones en su relación estructura-función, por lo que es trascendental considerarlo para los ensayos funcionales y estructurales, ya que este tipo de modificaciones pueden ser la clave para determinar los mecanismos moleculares de acción de estas proteínas y a su vez, entender sus mecanismos de regulación. Además, es importante mencionar que en casi todos los trabajos realizados



sobre la estructura-función de las proteínas LEA, casi no se ha considerado su regulación post-transcripcional, siendo que esto es algo común en estas proteínas (Tompa, 2010).

En estos mismos ensayos de 2D se observaron señales con altos pesos moleculares, que coinciden con los datos de ensayos previos en el laboratorio (Rivera-Najera et al., 2014) que demuestran que la proteína monomérica puede formar varias estructuras oligoméricas, sin embargo, los datos actuales no descartan la formación de hetero-oligómeros, que estarían dados por la interacción de la LEA6 con posibles blancos, o entre proteínas LEA6 fosforiladas o no.

Basados en los datos que hay acerca de otras IUPs, especulamos que estas proteínas LEA pueden tener más de un blanco. La promiscuidad de las proteínas intrínsecamente desordenadas ya ha sido descrita en otras familias de proteínas (Tompa, 2010), en donde ésta característica permite la unión específica y transitoria con una gran variedad de blancos. La promiscuidad es una característica ventajosa en diferentes procesos biológicos como regulación de la transcripción, señalización, organización nuclear, interacción de proteínas con RNA y estrés (Tompa, 2010).

Con los ensayos de 2D, descritos en este trabajo, no se puede determinar el tipo de MPT que presenta la proteína de interés, por ello nos apoyamos en herramientas bioinformáticas para determinar las posibles MPT en las proteínas LEA de la familia 6. Con los resultados obtenidos en los análisis *in silico* y los de fosforilación *in vitro*, se planteó realizar los análisis de desfosforilación de la proteína, para comprobar que la fosforilación era la causa del patrón observado en los resultados de 2D. Con los ensayos de desfosforilación (Fig. 6) se demostró que la proteína PvLEA6 es blanco de este tipo de modificaciones y es probable que este tipo de regulación se encuentre extendido en toda la familia.

Aunque este trabajo estuvo enfocado principalmente a la fosforilación como evento de MPT, no se descartan otra clase de modificaciones post-traduccionales, aunque otras MPT no han sido exploradas en las proteínas LEA. Para determinar esta y otras interrogantes como en qué posición se encuentra fosforilada la proteína o si tiene más de un evento de fosforilación, se intenta purificar la proteína nativa de embriones para realizar un análisis con espectrometría de masas que nos dé más información acerca de las modificaciones post-traduccionales en esta proteína.

## Predicción de fosforilación en proteínas de la familia LEA 6.

Muchas líneas de investigación han mostrado que las proteínas intrínsecamente desordenadas son blanco de modificaciones post-traduccionales (Gao et al., 2012). Además, se sabe que muchas MPT tienen una ocurrencia preferencial en regiones desordenadas, como lo son las modificaciones por fosfo-serina/-treonina/-tirosina, hidroxilo, sulfotirosina, glutamina desaminada, 4-carboxiglutamato, entre otras (Gao et al., 2012). Curiosamente las proteínas que generan estas modificaciones post-traduccionales tienen alta afinidad por elementos que contienen las IUPs, como su exposición estructural, zonas de reconocimiento y flexibilidad en la región que va a ser modificada, lo que hace que estas proteínas sean blancos idóneos de las proteínas modificadoras (Tompa, 2010). Además, análisis estructurales hechos con NMR sugieren, que modificaciones de fosfo-serina/treonina/tirosina producen transiciones orden-desorden, lo que podría ser una pista para entender los mecanismos moleculares de acción de estas proteínas (Kurotani et al., 2014; Tompa, 2010).

Debido a la alta conservación a nivel de secuencia de esta familia de proteínas LEA (Fig. 10), investigamos si los sitios potenciales de fosforilación también estaban conservados, y para ello se realizaron análisis *in silico* de los miembros de familia 6 de proteínas LEA en *A. thaliana*, *P. vulgaris* y *G. max*. Para obtener un análisis robusto, éste se realizó con tres diferentes programas que cumplían con perfiles diferentes en la búsqueda de sitios de fosforilación. Estos programas se diseñaron para identificar sitios de fosforilación en proteínas desordenadas (DISPHOS), proteínas de plantas en general (PlantPhos) y proteínas parecidas a soja (SAPHIRE). El perfil de búsqueda de estos tres programas se fundamenta en las bases de datos de proteínas fosforiladas, conocidas para cada grupo, y analizan la probabilidad de ocurrencia de acuerdo a su contexto de aminoácidos. Debido a que los tres enfoques son diferentes, los contextos de aminoácidos para predecir un evento de fosforilación pueden o no coincidir.

Entonces con estos tres diferentes programas que tienen diferentes enfoques para la predicción de MPT, se encontró que las fosforilaciones en estas proteínas tienen un alto índice de ocurrencia, y que los aminoácidos encontrados tienen una alta probabilidad de que *in vivo* sean blancos de fosforilación. Este análisis también mostró dos regiones que coincidían entre los diferentes programas en la búsqueda de sitios de fosforilación, pero además cada sitio con un alto índice de ocurrencia, pues los datos mostraron a los 4

mejores aminoácidos candidatos de cada programa para cada proteína (Fig. 5), lo que sugiere que este fenómeno no es un evento aislado y restringido a leguminosas, como lo indican nuestros datos y lo encontrado en el fosfo-proteoma de soja (Yao et al., 2012), en el cual la proteína GmLEA6-1 presenta un evento de fosforilación en la Ser 73 (Fig. 5), que coincide con lo predicho. Finalmente, es importante considerar que estos análisis se han realizado en condiciones muy particulares, pues en soja fueron realizados a partir de tejidos vegetativos, con irrigación óptima (Yao et al., 2012), mientras que en frijol se hicieron de embriones de semilla seca. Esto nos indica que hay muchas otras condiciones en las que la regulación de estas proteínas puede darse a través de diferentes mecanismos.

#### Ensayos de fosforilación *in vitro*

Con las evidencias anteriores se prosiguió con un análisis *in vitro* para determinar el potencial de la proteína PvLEA6 recombinante de ser blanco de fosforilación de la cinasa de caseína II (CKII). Este ensayo mostró que la proteína sí es capaz ser fosforilada en las condiciones probadas (Fig. 7). Con este resultado se sugiere que la proteína CKII puede participar en la fosforilación de la PvLEA6 en condiciones *in vivo*. Sin embargo, se sabe que esta cinasa puede modificar proteínas y sitios en éstas que naturalmente no sean sus blancos, por lo que análisis posteriores serán necesarios para entender cómo funciona la regulación de estas proteínas.

La CKII tiene un papel importante en todos los eucariontes incluidas las plantas, y se sabe que participa en la respuesta a estrés por salinidad (Mulekar, Bu, Chen, & Huq, 2012). Por otro lado la proteína LEA 6-1 de *Arabidopsis thaliana* participa en la contención al estrés por salinidad (Arroyo-Mosso 2012). Por lo tanto existe la posibilidad de que *in vivo*, las proteínas LEA de la familia 6, sean blancos de la CKII.

#### Ensayos de mutagénesis dirigida en el gen *AtLEA6-1*

La familia 6 de proteínas LEA es una de las más conservadas, y destacan algunos de sus firmas o aminoácidos que prácticamente no cambian entre los miembros de las distintas especies. Este grado de conservación sugiere inmediatamente relevancia funcional y/o estructural. Por lo tanto se eligió a una de las proteínas LEA de la familia 6 de *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de identificar a las regiones claves en la proteína y generar mutantes de estas regiones en la proteína AtLEA6-1. La elección de los

aminoácidos a modificar no fue sencilla, pues hay muchos aminoácidos altamente conservados dentro de la familia, como se puede observar en la Figura 9. Finalmente, se eligieron los siguientes aminoácidos: tirosinas (Y) en las posiciones 29, 32, 38, 43, la histidina (H) en la posición 48 y la treonina (T) en la posición 64. Además y de manera paralela a este trabajo, Méndez D. generó las mutantes para el gen *AtLEA6-1* en las firmas LEDYK (35-39) y TPY (27-29), que fueron usadas en este trabajo. La elección de los aminoácidos se realizó principalmente por el nivel de conservación que tenían los candidatos, pero también consideramos la posible relevancia funcional que pudiera tener, como el caso de las tirosinas que además de que pueden ser blanco de modificaciones post-traduccionales, pueden participar en el colapso de la proteína para formar una estructura definida. Aunque el aminoácido es polar debido al grupo hidroxilo, su anillo aromático es fuertemente hidrofóbico; debido a esto en la proteína un conjunto de tirosinas tiene el potencial de formar un núcleo hidrofóbico que puede llevar a una estructura tridimensional (Dyson, Wright, & Scheraga, 2006). Por otro lado, la treonina de acuerdo a nuestros datos bioinformáticos, tiene altas posibilidades de ser blanco de fosforilación. La presencia del aminoácido histidina en una secuencia primaria, está asociado con la interacción a otras proteínas y catálisis; aunado a los análisis de conservación de los aminoácidos individuales en toda la familia 6 de proteínas LEA, donde esta única histidina tiene una alta conservación, se eligió realizar la mutante de la proteína *AtLEA6-1* en este aminoácido. A pesar de que en este trabajo se realizaron las construcciones de esta mutante, no se muestran análisis posteriores.

Finalmente también se decidió mutar firmas completas, debido al grado de conservación, como el caso de la firma LEDYK y la firma TPY en el gen *AtLEA6-1*. Curiosamente en la firma TPY (Fig. 9), la treonina no se encuentra conservada, pues en la mayoría de las otras LEAs la secuencia es SPY, sin embargo, la treonina mantiene el carácter polar del residuo.

Por otro lado, también se discutió acerca de qué aminoácido(s) deberían de sustituir a éstos. En estos primeros ensayos se eligió al aminoácido alanina (A) por ser pequeño y relativamente neutro. Estas características nos permitirían ver el efecto de la falta del aminoácido de interés (Fig. 10) y no un efecto emergente, sin relación con la falta del mismo. Además, este tipo de modificación se prefirió frente a otras opciones como la delección, para no modificar los arreglos espaciales en la proteína.

Sólo para un aminoácido se realizó una modificación diferente, la treonina 64, que se

sustituyó también por ácido aspártico (D), en un tipo de ensayo que se denomina mimético de fosforilación, porque el carácter ácido del ácido aspártico simula el carácter que tiene un aminoácido fosforilado (Fig. 10). Con esta modificación se pretende hacer análisis de complementación con el objetivo de determinar el efecto de esta mutante en la actividad de la proteína.

## Parte II

### Análisis funcional de las proteínas LEA de la familia 6

Una de las grandes interrogantes en el estudio de las proteínas LEA es la determinación de sus mecanismos moleculares de acción, es decir, cómo funcionan dentro de cada célula. Para resolver esta pregunta se han abordado diferentes enfoques para probar cómo funcionan estas proteínas. Uno de estos enfoques son los ensayos *in vivo*, y en este trabajo usamos el ensayo de complementación del fenotipo de sensibilidad al frío de la mutante BX04 de *Escherichia coli* (Xia et al., 2001) un ensayo comúnmente usado para probar que una proteína tiene actividad de chaperona de RNA.

Con estos ensayos se probó que las diferentes proteínas LEA 6 usadas en este trabajo complementan parcialmente el fenotipo de sensibilidad al frío de la mutante BX04 de *E. coli* (Fig. 15). En estos ensayos se esperaba que en la complementación se cumpliera lo siguiente: mayores niveles de inducción con IPTG provocarían mayor expresión de la proteína de interés y por lo tanto mayor sería el nivel de protección, lo que implicaría una mejor complementación del fenotipo. Sin embargo, los resultados obtenidos no parecen correlacionar con estos supuestos, ya que las proteínas AtLEA6-1 y AtLEA6-3, se comportan de otra manera. En el caso de la proteína AtLEA6-1 se observó que la complementación se presentó en bajos niveles de inducción (25  $\mu$ M), pero no a mayores niveles de inducción (100  $\mu$ M; Fig. 15) lo que sugiere que podría deberse a un efecto tóxico de esta proteína dentro de la bacteria. Por otro lado, la proteína AtLEA6-3 se comporta de manera similar entre las diferentes concentraciones del inductor. Para el caso de la proteína AtLEA6-2 su comportamiento es similar a la proteína PvLEA6, y parece cumplir con el supuesto, pues a mayores niveles de inducción con IPTG mayores son los niveles de complementación como se observa en la Figura 15. Independiente de las diferencias, con estos ensayos se probó que estas proteínas son capaces de complementar el fenotipo de sensibilidad al frío de la mutante BX04, posiblemente por

que presenten actividad de chaperona de RNA, aunque se necesitan realizar ensayos complementarios para determinar que el mecanismo de acción y comprobar esta hipótesis.

Las diferencias en el comportamiento de las diferentes LEAs parecen ser el resultado de diferencias puntuales entre cada una de las proteínas que involucren la tasa de degradación, la toxicidad y la eficiencia en la capacidad de protección (ya sea por actividad de chaperona de RNA o no).

Una de las perspectivas inmediatas es analizar los niveles de acumulación de transcrito y proteínas LEA en estos ensayos, para descartar que algunas de estas diferencias sean producto de diferentes niveles de acumulación. Sin embargo, no pareciera ser el caso y sugiero que estas diferencias (Arroyo-Mosso 2012) implican mecanismos de acción diferentes, pues incluso en *Arabidopsis thaliana* parecen coincidir espacial y temporalmente, mas sin embargo, no parecen complementarse (Arroyo-Mosso 2012).

Finalmente, aunque con estos resultados podemos sugerir que estas proteínas funcionan como chaperonas de RNA, no descartamos que el mecanismo de protección sea por una vía diferente.

Con los ensayos de complementación de BX04 también se probaron las mutantes del gen *AtLEA6-1* (Fig. 16, 17 y 18), sin embargo, las distintas mutantes probadas se comportaban de la misma manera que la proteína silvestre. Por lo tanto parece que estos aminoácidos no parecen participar en la actividad de la proteína que permite ver el fenotipo encontrado. Aunque ligeras diferencias se pueden observar entre algunas de las mutantes, como es el caso de las mutantes en la treonina 64, estas diferencias no se pueden probar sin encontrar una manera de hacer este ensayo cuantitativo.

Es bastante insólito que a pesar de todas las mutantes que se probaron ninguna tuviera un efecto drástico en el fenotipo de complementación de BX04, lo cual puede ser debido a que no se afectó por un lado regiones clave o de interacción de estas proteínas, y que esta proteína fuese muy robusta a los cambios efectuados y se mantuviera su función.

A pesar de que los ensayos en BX04 no dieron los resultados esperados en la prueba de las mutantes, como perspectiva inmediata se tratará de probar estas mutantes en el gen

*AtLEA6-1* en la mutante por inserción del mismo gen en *A. thaliana*, para analizar cómo son capaces de complementar. Estos ensayos serán esenciales para determinar la importancia de los aminoácidos individuales y firmas en la función de estas proteínas, con lo que finalmente se podrá trabajar en los mecanismos de acción de estas proteínas.

## Bibliografía

- Arroyo-Mosso, I. A. (2012). *Caracterización fenotípica de mutantes en genes para proteínas LEA de la familia 6 en respuesta a déficit hídrico en Arabidopsis thaliana*. UNAM.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. a, Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W202–8. doi:10.1093/nar/gkp335
- Battaglia, M. (2008). *Análisis de la participación de la región 3' no traducida del gen PvLEA-18 en la regulación de su expresión en respuesta a déficit hídrico*. UNAM.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. a. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6–24. doi:10.1104/pp.108.120725
- Branco-Price, C., Kaiser, K. a, Jang, C. J. H., Larive, C. K., & Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 56(5), 743–55. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03642.x
- Bray, E. A. (1993). Responses to Water Deficit ', 1035–1040.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit, 1385(96).
- Bray, E. a. (2002). Classification of Genes Differentially Expressed during Water-deficit Stress in Arabidopsis thaliana: an Analysis using Microarray and Differential Expression Data. *Annals of Botany*, 89(7), 803–811. doi:10.1093/aob/mcf104
- Bray, E., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In W. Gruissem, B. Buchanan, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1158–1249). Rockville, MD.
- Caramelo, J. J., & Iusem, N. D. (2009). When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 99(1), 1–6. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.001



- Chandler, P., & Robertson, M. (1994). Gene Expression Regulated by Abscisic Acid and its Relation to Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 113–141.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L. P., Smith, C. E., & Covarrubias, A. A. (1999). Pvlea-18, a Member of a New Late-Embryogenesis-Abundant Protein Family That Accumulates during Water. *Plant Physiology*, 120(May), 93–103.
- Colmenero-Flores, J., Moreno, L. P., & Covarrubias, A. (n.d.). *Datos no publicados*.
- Colmenero-flores, M., Campos, F., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (1997). Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit : identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology*, 35, 393–405.
- Cushman, J. C. (2001). Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture. *Integrative and Comparative Biology*, 41(4), 758–769. doi:10.1093/icb/41.4.758
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). *Abscisic acid: emergence of a core signaling network*. *Annual review of plant biology* (Vol. 61, pp. 651–79). doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112122
- Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2011). *Plant Kinases*. (N. Dissmeyer & A. Schnittger, Eds.) (Vol. 779). Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-264-9
- Dure III, L. (1993). A repeating I l-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 3(3), 363–369.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H., Mundy, J., Quatrano, R., ... Sung, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12(5), 475–86. doi:10.1007/BF00036962
- Dyson, H. J., Wright, P. E., & Scheraga, H. a. (2006). The role of hydrophobic interactions in initiation and propagation of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13057–61. doi:10.1073/pnas.0605504103
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., ... Yamaguchi-shinozaki, K. (2005). AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(December), 3470–3488. doi:10.1105/tpc.105.035659.1
- Galau, C. A., Wang, H. Y., & Hughes, D. W. (1993). Cotton lea5 and lea14 Encode Atypical late Embryogenesis-Abundant Proteins. *Plant Physiology*, 101, 695–696.

- Gao, J., Iangjiong, & Xu, D. (2012). CORRELATION BETWEEN POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION AND. In *Pacific symposium Biocomputing* (pp. 94–103).
- Goday, A., Jensen, A. B., Culiáñez-macia, F. A., Alba, M. M., & Figueras, M. (1994). The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear Localization Signals. *The Plant Cell*, 6(March), 351–360.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. R., & Pereira, A. (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology*, 154(3), 1254–71. doi:10.1104/pp.110.161752
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2(4), 924–32. doi:10.1038/nprot.2007.132
- Heyen, B. J., Alsheikh, M. K., Smith, E. A., Torvik, C. F., Seals, D. F., & Randall, S. K. (2014). The Calcium-Binding Activity of a Vacuole-Associated, Dehydrin-Like Protein Is Regulated by Phosphorylation 1. *Plant Physiology*, 130, 675–687. doi:10.1104/pp.002550.sites.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 61(6), 1041–52. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x
- Hobo, T., Asada, M., Kowiyama, Y., & Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), 679–689. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00565.x
- Hunault, G., & Jaspard, E. (2010). LEAPdb : a database for the late embryogenesis abundant proteins. *BMC Genomics*, 11(221), 1471–2164.
- Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O'Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z., & Dunker, A. K. (2004a). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1037–1049. doi:10.1093/nar/gkh253
- Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O'Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z., & Dunker, A. K. (2004b). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1037–49. doi:10.1093/nar/gkh253
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377–403. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.377

- Kovacs, D., Agoston, B., & Tompa, P. (2008). Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signaling & Behavior*, 3(9), 710–3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2634567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kurotani, A., Tokmakov, A. A., Kuroda, Y., Fukami, Y., Shino-, K., & Sakurai, T. (2014). Sequence analysis Correlations between protein disorder and post-translational modifications in plants, 1–9.
- Lee, T.-Y., Bretaña, N. A., & Lu, C.-T. (2011). PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 261. doi:10.1186/1471-2105-12-261
- Méchin, V., Damerval, C., & Zivy, M. (2007). Total protein extraction with TCA-acetone. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 355, pp. 1–8). doi:10.1385/1-59745-227-0:1
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453–67. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
- Moreno, P. L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico . Una revisión Plant responses to water deficit stress . A review. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179–191.
- Moreno-fonseca, L. P., & Covarrubias, A. A. (2001). Downstream DNA sequences are required to modulate Pvlea -18 gene expression in response to dehydration. *Plant Molecular Biology*, 45(5), 501–515.
- Mouillon, J., Gustafsson, P., & Harryson, P. (2006). Structural Investigation of Disordered Stress Proteins . Comparison of Full-Length Dehydrins with Isolated Peptides of Their Conserved Segments 1. *Plant Physiology*, 141(June), 638–650. doi:10.1104/pp.106.079848.molecular
- Mouillon, J.-M., Eriksson, S. K., & Harryson, P. (2008). Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiology*, 148(4), 1925–37. doi:10.1104/pp.108.124099
- Mulekar, J. J., Bu, Q., Chen, F., & Huq, E. (2012). Casein kinase II  $\alpha$  subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 69(2), 343–54. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04794.x
- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Chua, N.-H. (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(February), 1406–1410.

- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J. L., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. a. (2010). Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(1), 373–90. doi:10.1104/pp.110.158964
- Padilla, W. (2013). *Análisis molecular de la familia de genes tipo LEA18 de Arabidopsis thaliana*. UNAM.
- Rangel Ruíz, G. A. (n.d.). *Análisis funcional de genes del grupo 6 de las proteínas LEA de plantas superiores*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., & Covarrubias, A. a. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell & Environment*, 31(12), 1781–90. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01879.x
- Reyes, J. L., Rodrigo, M.-J., Colmenero-Flores, J. M., Gil, J.-V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., ... Covarrubias, A. a. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*, 28(6), 709–718. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01317.x
- Ried, J. L., & Walker-Simmons, M. K. (1993). Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat. *Plant Physiology*, 102, 125–131.
- Rivera Najera, L. Y. (2015). *Análisis estructural de la proteína PvLEA6 de Phaseolus vulgaris*. UNAM.
- Rivera-Najera, L. Y., Saab-Rincón, G., Battaglia, M., Amero, C., Pulido, N. O., García-hernández, E., ... Covarrubias, A. A. (2014). A group 6 LEA protein is structurally disordered and forms oligomers. *JBC*, (1001).
- Rohrig, H., Schmidt, J., Colby, T., Brautigam, A., Hufnagel, P., & Bartels, D. (2006). Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant, Cell and Environment*, 29(8), 1606–1617. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01537.x
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 45(2), 237–49. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02603.x
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M., & Allen, G. J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410(6826), 327–330.

- Shih, M. D. E. R., Hoekstra, F. A., & Hsing, Y. U. E. I. E. C. (2008). Late Embryogenesis Abundant Proteins Laboratory of Plant Physiology, School of Experimental Plant, 2296(08). doi:10.1016/S0065-2296(08)00404-7
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology*, 115(1997), 327–334.
- Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H. E., ... Xu, H. E. (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6064), 85–8. doi:10.1126/science.1215106
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (Fifth., p. 782). Sinauer Associates.
- Tompa, P. (2010). *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. *Vasa*. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Tompa, P., & Kovacs, D. (2010). Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 88, 167–174. doi:10.1139/O09-163
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Trost, B., & Kusalik, A. (2013). Computational phosphorylation site prediction in plants using random forests and organism-specific instance weights. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(6), 686–94. doi:10.1093/bioinformatics/btt031
- Umezawa, T., & Hirayama, T. (2011). *Plant Responses to Drought and Salinity Stress - Developments in a Post-Genomic Era*. *Plant Responses to drought and Salinity stress: Developments in a Post-Genomic Era* (1st ed., Vol. 57, pp. 201–248). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-387692-8.00006-0
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11632–7. doi:10.1073/pnas.190309197
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V, & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS One*, 2(8), e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718
- Xia, B., Ke, H., & Inouye, M. (2001). Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in

Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 40(1), 179–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298285>

Yao, Q., Bollinger, C., Gao, J., Xu, D., & Thelen, J. J. (2012). P(3)DB: An Integrated Database for Plant Protein Phosphorylation. *Frontiers in Plant Science*, 3(September), 206. doi:10.3389/fpls.2012.00206

# Anexos

## Anexo 1

### Lista de oligos

Oligo	Clave	Año	Secuencia	Características	TM
FWcaccatg61	6365	2011	cac cat gga gga tca gaa aaa gcc	Para clonar AtLEA6-1 en pENTR	56
Rv61 s/stop	4243	2012	cgg aac gcc ctg acg g	Para clonar en pENTR	56
Rv61c/stop	6366	2011	tca cgg aac gcc ctg acg g	Para clonar en pENTR	60
FwNcoI_AtLEA6-1	2774	2012	ggg ggt cca tgg agg atc aga aaa agc c	Para clonar en pTRC99a	60
RvPstI_AtLEA6-1	7316	2010	ggg ggt ctg cag tca tca cgg aac gcc ctg acg	Para clonar en pTRC99a	60
FwNcoI_AtLEA6-2	110	2013	gg tgg tcc atg gag gcc ggg aaa aca c	Para clonar en pTRC99a	60
RvPstI_AtLEA6-2	7318	2010	ggg ggt ctg cag tca tca cgg agc ttt cgc atc	Para clonar en pTRC99a	60
FwEcoRI_AtLEA6-3	111	2013	gggtgccatggcgaagagtgaagagaac	Para clonar en pTRC99a	60
RvPstI_AtLEA6-3	112	2013	gggtgctcagtcacactctttagcttttggtag	Para clonar en pTRC99a	60
pTRC99aFw	3219	2012	cat ccg gct cgt ata atg tg	Secuenciación de pTRC	60
Fw AtLEA6-1 m Y1-2	612	2012	ct atc aag acc cca gcc ttg gac gct gat aac ttg gaa gat t	Generación de mutante	42
Rv AtLEA6-1 m Y1-2	613	2012	a atc ttc caa gtt atc agc gtc caa ggc tgg ggt ctt gat ag	Generación de mutante	42
Fw AtLEA6-1 m Y3-4	614	2012	gat aac ttg gaa gat gcc aag atg aaa ggt gcc ggc gca caa ggc cac c	Generación de mutante	42
Rv AtLEA6-1 m Y3-4	615	2012	g gtg gcc ttg tgc gcc ggc acc ttt cat ctt ggc atc ttc caa gtt atc	Generación de mutante	42
Fw AtLEA6-1 m T64	6582	2013	gcc acc gat gct ccc gmt cct tca ggc ggt ctt g	Generación de mutante	42
Rv AtLEA6-1 m T64	6583	2013	caa gac cgc cag aag gak cgg gag cat cgg tgg c	Generación de mutante	42
Fw AtLEA6-1 m H	7602	2013	gk mcg gag cac aag ggc ccc aag agc cta aac tcg	Generación de mutante	42
Rv AtLEA6-1 m H	6581	2013	cga gtt tag gct ctt ggg cgc ctt gtg ctc cgk mac	Generación de mutante	42
T7	2666	2009	taa tac gac tca cta tag gg	Secuenciación	50
M13 (-20)	527	2009	gta aaa cga cgg cca g	Secuenciación	50

## Anexo 2

Alineamiento con los resultados de secuenciación de vectores con mutantes del gen *AtLEA6-1*

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

at2g23110          -----ATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGC
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) CAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGC
*****

at2g23110          AAGAAGTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGACT
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) AAGAAGTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCAGCCTTGGACG
*****

at2g23110          ATGATAACTTGGAAAGATTAC AAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAAGGCCACCAAGAGCCTA
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) CTGATAACTTGGAAAGATTAC AAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAAGGCCACCAAGAGCCTA
*****

at2g23110          AACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCG
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) AACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCG
*****

at2g23110          GTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTTTCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTC
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) GTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTTTCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTC
*****

at2g23110          CGTGA-----
AtLEA6-1mutY1-2_(3875) CGTGAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGC
*****
```

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

at2g23110          -----ATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAAGAAGTTAAA
AtLEA6-1mutY3-4_(3878) TTCACCATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAAGAAGTTAAA
*****

at2g23110          AACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGACTATGATAACTTGGAAAGATTAC
AtLEA6-1mutY3-4_(3878) AACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGACTATGATAACTTGGAAAGATGCC
*****

at2g23110          AAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGA
AtLEA6-1mutY3-4_(3878) AAGATGAAAGGTGCCGGCGCACAAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGA
*****

at2g23110          GCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACG
AtLEA6-1mutY3-4_(3878) GCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACG
*****

at2g23110          GATCTTTCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTCCTGTGA-----
AtLEA6-1mutY3-4_(3878) GATCTTTCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTCCTGTGAAGGGTGGGCGCGCC
*****
```



CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
AtLEA6-1 -----ATGGAGGATCAGAAAAAGCC
AtLEA6-1mutT64_(16298) CGCGGCCGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGCCCTTCACCATGGAGGATCAGAAAAAGCC
*****

AtLEA6-1 ACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGAC
AtLEA6-1mutT64_(16298) ACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGAC
*****

AtLEA6-1 CCCATACTTGACTATGATAACTTGAAGATTACAAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAGG
AtLEA6-1mutT64_(16298) CCCATACTTGACTATGATAACTTGAAGATTACAAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAGG
*****

AtLEA6-1 CCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGG
AtLEA6-1mutT64_(16298) CCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGG
*****

AtLEA6-1 CGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTTCTTCTACCGATGCGATTAA
AtLEA6-1mutT64_(16298) CGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTTCTTCTACCGATGCGATTAA
*****

AtLEA6-1 CCGTCAGGGCGTTCCGTGA-----
AtLEA6-1mutT64_(16298) CCGTCAGGGCGTTCCGTGAAGGGTGGGCGGCCGACCCAGCTTCTTGACAAAAGTTGG
*****
```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
AtLEA6-1 -----ATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAA
AtLEA6-1mutYx4_(16293) TTTAAGAAGGAGCCCTTCACCATGGAGGATCAGAAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAA
*****

AtLEA6-1 GTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGAATGAT
AtLEA6-1mutYx4_(16293) GTGAAAGAAGTTAAAAACGACGACCTCGAGTCTATCAAGACCCAGCTTGGACGCTGAT
*****

AtLEA6-1 AACTTGAAGATTACAAGATGAAAGGTTACGGAGCACAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTC
AtLEA6-1mutYx4_(16293) AACTTGAAGATTACAAGATGAAAGGTTGCGGCGCACAAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTC
*****

AtLEA6-1 GGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGA
AtLEA6-1mutYx4_(16293) GGTATGGGAGGTGGAGCCACCGATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGA
*****

AtLEA6-1 GGCCTGCATCGACGGATCTTCTTCTACCGATGCGATTAAACCGTCAGGGCGTTCCGTGA
AtLEA6-1mutYx4_(16293) GGCCTGCATCGACGGATCTTCTTCTACCGATGCGATTAAACCGTCAGGGCGTTCCGTGA
*****

AtLEA6-1 -----
AtLEA6-1mutYx4_(16293) AAGGGTGGGCGGCCGACCCAGCTTCTTGACAAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGC
```

Alineamiento con los resultados de secuenciación de vectores con los genes *AtLEA6-1*, *AtLEA6-2\** y *AtLEA6-3\**

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
AtLEA6-1          ATGGAGGATCAGAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAGAAGTTAAAAACGAC
SeqAtLEA6-1(11003) ATGGAGGATCAGAAAAGCCACCAACGACCGAGCAAGAAGTGAAGAAGTTAAAAACGAC
*****

AtLEA6-1          GACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGACTATGATAACTTGGGAAGATTACAAGATG
SeqAtLEA6-1(11003) GACCTCGAGTCTATCAAGACCCATACTTGGACTATGATAACTTGGGAAGATTACAAGATG
*****

AtLEA6-1          AAAGGTTACGGAGCACAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACC
SeqAtLEA6-1(11003) AAAGGTTACGGAGCACAAGGCCACCAAGAGCCTAAACTCGGTATGGGAGGTGGAGCCACC
*****

AtLEA6-1          GATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTT
SeqAtLEA6-1(11003) GATGCTCCCACTCCTTCAGGCGGTCTTGGACGCGGTGGAGGCGCTGCATCGACGGATCTT
*****

AtLEA6-1          TCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTCCTGTGA
SeqAtLEA6-1(11003) TCTTCTACCGATGCGATTAACCGTCAGGGCGTTCCTGTGA
*****
```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
seqRvAtLEA6-2(10622) TTCACACAGGAAACAGACCATGGAGGCCGGGAAAACACCACCGACGACGACAACAACGAC
AtLEA6-2          -----ATGGAGGCCGGGAAAACACCACCGACGACGACAACAACGAC
seqFwAtLEA6-2(8633) -----CATGGCAGGCGGGTAGACASCACCGACGACGACAACAACGAC
*****
      .,*  *;* ,*.* ,*****

seqRvAtLEA6-2(10622) GGAGAAGAAAACGGAGCAAGTGAAGACAACGACTTGCCGACC GATAGCCCTTACATGGC
AtLEA6-2          GGAGAAGAAAACGGAGCAAGTGAAGACAACGACTTGCCGACC GATAGCCCTTACATGGC
seqFwAtLEA6-2(8633) GGAGaAGAAAACGGAGCAAGTGAAGACAACGACTTGCCGACC GATAGCCCTTACATGGC
*****

seqRvAtLEA6-2(10622) GACGGGTACTTTGGAAGATTACAAATTGAAAGCTTATGGAGCCGAAGGTCACCAAGAGCC
AtLEA6-2          GACGGGTACTTTGGAAGATTACAAATTGAAAGCTTATGGAGCCGAAGGTCACCAAGAGCC
seqFwAtLEA6-2(8633) GACGGGTACTTTGGAAGATTACAAATTGAAAGCTTATGGAGCCGAAGGTCACCAAGAGCC
*****

seqRvAtLEA6-2(10622) TACTCCTGGTCTTGGAGGTGGCTCCACCGATGCTCCTACTCCTCTGCRGMC CCGCG ---
AtLEA6-2          TACTCCTGGTCTTGGAGGTGGCTCCACCGATGCTCCTACTCCTCTGCGGACGCACCCGC
seqFwAtLEA6-2(8633) TACTCCTGGTCTTGGAGGTGGCTCCACCGATGCTCCTACTCCTCTGCGGACGCACCCGC
*****
      * * * ,*

seqRvAtLEA6-2(10622) -----
AtLEA6-2          CGCCACTACCACCGATGCGAAAGCTCCGTGA -----
seqFwAtLEA6-2(8633) CGCCACTACCACCGATGCGAAAGCTCCGTGATGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTT
```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

seqFwAtLEA6-3(14418) -----
AtLEA6-3 -----ATGTTCG
seqRvAtLEA6-3(10625) ATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGGATGTCG

seqFwAtLEA6-3(14418) -----AGAGGTTGCCACTAG-AACAAGTCCGTATACAAAGTACGAGGAT
AtLEA6-3 AAGAGTGAAGAGAAACAAGAGTTGCCACTAGAAACAAGTCCGTATACAAAGTACGAGGAT
seqRvAtLEA6-3(10625) AAGAGTGAAGAGAAACAAGAGTTGCCACTAGAAACAAGTCCGTATACAAAGTACGAGGAT
                        *..*****

seqFwAtLEA6-3(14418) ATAGAGGATTACAAGAAGAATGCTTATGGAACTTCCGGTCACCAGGACGTTAAGCCTGGC
AtLEA6-3 ATAGAGGATTACAAGAAGAATGCTTATGGAACTTCCGGTCACCAGGACGTTAAGCCTGGC
seqRvAtLEA6-3(10625) ATAGAGGATTACAAGAAGAATGCTTATGGAACTTCCGGTCACCAGGACGTTAAGCCTGGC
                        *****

seqFwAtLEA6-3(14418) CACGGCGGCGGCACAACCGACGCACCGACCCCTCCGGTGATGCTGCTCCCTCCGCCATA
AtLEA6-3 CACGGCGGCGGCACAACCGACGCACCGACCCCTCCGGTGATGCTGCTCCCTCCGCCATA
seqRvAtLEA6-3(10625) CACGGCGGCGGCACAACCGACGCACCGACCCCTCCGGTGATGCTGCTCCCTCCGCCATA
                        *****

seqFwAtLEA6-3(14418) GATTCCGCTAACCAAAAAGCTAAGAAGTGATGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTT
AtLEA6-3 GATTCCGCTAACCAAAAAGCTAAGAAGTGA-----
seqRvAtLEA6-3(10625) GATCCTG-----
                        *** *

```

\*estas líneas se secuenciaron por el extremo 5' y 3' del gen, pues así pudimos obtener la secuenciación del gen completo.

### Anexo 3

### Mapa del vector pTRC99a

