



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE INTERACCIÓN *IN VIVO*
ENTRE MONÓMEROS DE LAS PROTEÍNAS
LEA DEL GRUPO 4 DE *ARABIDOPSIS*
THALIANA

TESIS

QUE PARA OBTENER - EL - TÍTULO - DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LAURA VERÓNICA MARTÍNEZ CASTRO



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

ASESOR TÉCNICO:

PAULETTE SOFÍA ROMERO PÉREZ

(Cd. Universitaria, CD.MX. 2021)



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.

Datos del jurado y sustentante

Estudiante (Sustentante)

Laura Verónica Martínez Castro
Biología, Facultad de Ciencias, UNAM

Tutora (secretaria)

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología, UNAM

Sinodal 1 (presidente)

Dr. César Luis Cuevas Velázquez
Facultad de Química, UNAM

Sinodal 2 (vocal)

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Facultad de Ciencias, UNAM

Sinodal 3 (suplente)

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Sinodal 4 (suplente)

M. en C. Paulette Sofía Romero Pérez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Datos del trabajo escrito

Martínez Castro L. V. (2021) Análisis de interacción *in vivo* entre los monómeros de las proteínas LEA del grupo 4 de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 68 pág.

*“La ciencia es una alianza de los espíritus
libres de todas las culturas, y se rebela
contra la tiranía local que cada una de
ellas imponen a sus hijos”*
Freeman Dyson

AGRADECIMIENTOS

Académicos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 22 a cargo de la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, del departamento de biología molecular de plantas del instituto de biotecnología de la UNAM.

A la Dra. Alejandra Covarrubias por su asesoramiento y guía durante este proyecto, además de brindarme un lugar con los recursos necesarios para llevar acabo el trabajo.

A Sofía Paulette Romero que fungió como asesora técnica, por su apoyo y tiempo para resolver mis dudas.

Agradezco al M.C. Carlos Alberto González encargado de la Unidad de Transformación Genética y Cultivo de Tejidos Vegetales por las plantas de *N. benthamiana* donadas y por su apoyo en los eventos de agroinfiltración realizados. Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada y a Arturo Pimentel por su ayuda brindada en la toma de fotografías. Al técnico Beatriz del laboratorio por todo el material y asesoramiento brindado. Al grupo de trabajo de la Dra. Alejandra Covarrubias y del Dr. José Luis Reyes.

A los miembros de mi comité sinodal: Cesar Luis Cuevas Velázquez, José Luis Reyes, Paulette Sofía Romero Pérez, Claudia Andrea Segal y Alejandra Alicia Covarrubias por su tiempo al corregir mi trabajo escrito.

Al psicólogo del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, por la terapia brindada a lo largo de mi estancia.

Al apoyo brindado al proyecto F-1615 221448 por parte de CONACyT México.

Por último, A la UNAM, la Facultad de Ciencias y, recientemente, al Instituto de Biotecnología por brindarme un lugar para crecer académica y personalmente, de igual manera a todo el profesorado por sus conocimientos y tiempo que me dieron para avanzar a lo largo de la carrera.

Un especial agradecimiento a las fuentes de información gratuitas que hacen del conocimiento un recurso libre, como es el caso de Sci-hub.

Personales

Gracias por existir antes, durante y después de la elaboración de este trabajo. Sin tu apoyo no habría llegado tan lejos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
Objetivos particulares	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Obtención de fragmentos relacionados con la familia AtLEA4 a partir de pENTR.....	25
Diseño, construcción y verificación de los plásmidos utilizados.....	26
Verificación de los vectores destino.....	26
Clonación de los fragmentos de DNA relacionados con la familia AtLEA4 en los vectores destino.....	28
Protocolo de transformación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> DH5α y DB3.1	28
Confirmación de la transformación.....	29
Protocolo para las reacciones de polimerización en cadena (PCR)	29
Secuenciación de los fragmentos de DNA y de los plásmidos obtenidos	30
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3010	30
Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por agro-infiltración.....	31
Preparación de muestras y obtención de las imágenes con un microscopio confocal	33
RESULTADOS.....	34
Obtención de los fragmentos AtLEA4 a partir de vectores pENTR.....	34
Inserción de los fragmentos AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5¹⁻⁷⁷ y AtLEA4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸ en los vectores destino pYFN ó pYFC.	34
Producción de transformantes transitorias de hojas de <i>N. benthamiana</i> y obtención de fotografías.....	37
Transformación de <i>A. tumefaciens</i> GV3010 y verificación de las bacterias transformadas	37
Transformación transitoria de hojas de <i>N. benthamiana</i>	38

Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agro-infiltradas con la mezcla pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5 o pYFN-AtLEA4-2/pYFC-AtLEA4-2	39
Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agro-infiltradas con la mezcla pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5, pYFN-AtLEA4-5₁₋₇₇/pYFC-AtLEA4-5₁₋₇₇ ó pYFN-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈/pYFC-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈	41
Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agro-infiltradas con la mezcla SPYNE-AtLEA4-5/SPYCE-AtLEA4-5 o SPYNE-AtLEA4-2/SPYCE-AtLEA4-2	43
Complementación de fluorescencia con las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ ó AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ expresadas en fusión con las regiones complementarias de la YFP en vectores SPY	45
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
Apéndice	63
ANEXOS	64

RESUMEN

Las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía o proteínas LEA (por sus siglas en inglés Late Embryogenesis Abundant) constituyen un amplio y diverso grupo de proteínas que en su mayoría se acumulan en los diferentes tejidos de las plantas ante condiciones en las que existe baja disponibilidad de agua. Debido a su elevada abundancia en condiciones de extrema deshidratación o desecación, como la que ocurre en las semillas y el polen durante su desarrollo, se han asociado a la tolerancia al déficit hídrico, condición presente bajo diferentes ambientes estresantes, como lo son la sequía, la alta salinidad y las altas y bajas temperaturas. Las proteínas LEA presentan una composición y secuencia de aminoácidos particular que las agrupa como proteínas intrínsecamente desordenadas; es decir, proteínas con alta flexibilidad estructural. Las proteínas LEA descritas a la fecha se agrupan en siete familias, de acuerdo con motivos conservados propios de cada grupo. *Arabidopsis thaliana*, uno de los modelos experimentales más utilizados en el estudio de las plantas, posee representantes de la mayoría de las familias de las proteínas LEA. En este trabajo me enfoqué en el estudio de la familia LEA4, que en *A. thaliana* contiene tres miembros, cuyos genes se han denominado AtLEA4-1, AtLEA4-2 y AtLEA4-5 (el último dígito se refiere al cromosoma en el que se encuentran). El trabajo previo del laboratorio en el que desarrollé esta tesis ha demostrado que las proteínas LEA en este grupo tienen la capacidad de prevenir la desnaturalización de enzimas reporteras bajo condiciones de deshidratación parcial o ante tratamientos de congelamiento-descongelamiento *in vitro*. Estos resultados se sumaron a otros que sugirieron que bajo condiciones de baja disponibilidad de agua las proteínas LEA podrían prevenir la desnaturalización/inactivación de otras proteínas al interactuar con ellas. Debido a que un incremento en la relación proteína LEA y proteína blanco permitía obtener protección aún en condiciones muy severas de deshidratación, se propuso que en estas condiciones serían necesarias más moléculas de proteínas LEA por proteína cliente (blanco) para hacer efectiva tal actividad. Al analizar la interacción de las proteínas AtLEA4 con una proteína cliente se observó la formación de posibles hetero-oligómeros con su blanco, pero también se detectaron bandas en el gel que migraban con la masa molecular esperada para homo-oligómeros de AtLEA4, un resultado que podría estar relacionado con su mecanismo de acción. En esta tesis nos planteamos la pregunta de si estas observaciones realmente reflejaban la capacidad de estas proteínas para formar oligómeros. Para abordar esta pregunta, mi trabajo de tesis siguió una estrategia de análisis *in vivo*, utilizando la técnica de complementación

bimolecular de la fluorescencia o BiFC (por sus siglas del inglés Bimolecular Fluorescence Complementation). Esta técnica fusiona a las proteínas o fragmentos de proteínas entre las que se sospecha existe una asociación con fragmentos de la proteína amarillo fluorescente (YFP), los cuales no generan fluorescencia por sí solos, pero al encontrarse cerca regeneran su capacidad de emitir fluorescencia. Esto sólo ocurrirá si los fragmentos de proteínas a los que están fusionados, cada uno por separado, interaccionan. Para ello, se generaron construcciones con las secuencias que codifican para las proteínas AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ (región amino capaz de estructurarse de la AtLEA4-5) y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ (región carboxilo de la AtLEA4-5) en dos vectores distintos que permitieran expresar y analizar el efecto de generar fusiones en los extremos amino- o carboxilo-terminal de cada una de las proteínas de interés con las regiones de la YFP. Las diferentes construcciones generadas se introdujeron en células de hojas de *Nicotiana benthamiana* por infiltración, para transformar algunas de estas células con los pares de plásmidos apropiados que permitirán entonces la expresión transitoria de las proteínas de fusión, cuya interacción se quiere determinar. Este tipo de experimentos con las diferentes construcciones generadas permitió demostrar interacciones homotípicas, es decir, entre sí mismas, para las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 de *A. thaliana*. Asimismo, se obtuvieron resultados que indican que tanto la región amino- como la carboxilo-terminal de la proteína LEA4-5 presentan interacciones homotípicas; sin embargo, los datos sugieren que la región amino terminal posee una mayor capacidad de asociación entre sí que la región carboxilo-terminal. Sugiriendo, a su vez, que la capacidad de la región amino-terminal para formar alfa-hélices pudiera estar implicada en esta interacción.

INTRODUCCIÓN

Las leyes físicas que rigen la existencia como la conocemos mantienen en constante cambio a los seres vivos, obligándolos a responder a diversos estímulos internos y externos. En el caso de las plantas, tales estímulos pueden promover una condición fisiológica que altera el equilibrio y es potencialmente desfavorable, condición que se conoce como estrés. Bajo esta condición adversa, el crecimiento, desarrollo, productividad y/o supervivencia de la planta están comprometidos. Entre las estrategias de ajuste al estrés, las plantas recurren a la aclimatación, lo que les permite responder molecular, metabólica y fisiológicamente, lo más rápido posible, a cualquier tipo de estrés. Dependiendo de las características genéticas y la historia adaptativa de cada especie o variedad, ésta responderá eficazmente o no de acuerdo con la severidad y al tiempo de duración de la condición estresante. (Lichtenthaler, 1996; Shao, *et al.*, 2008). En la naturaleza las plantas se pueden enfrentar a dos tipos de estrés: el que involucra interacciones con otros organismos conocido como estrés biótico, y el que generan diversos agentes ambientales como la cantidad de nutrientes, la temperatura, el pH, las sales en el suelo, la disponibilidad de agua, la luz, entre otros, a éste se le conoce como estrés abiótico (Buchanan *et al.*, 2015).

El estrés hídrico (cambios en la disponibilidad de agua) en los cultivos es un problema al que se enfrentan los agricultores por la disminución que éste provoca en la productividad de los cultivos y, consecuentemente, la pérdida económica que esto genera, siendo las sequías una de las principales condiciones con estas consecuencias (Kogan & Guo, 2016). No obstante, las plantas contunden con el estrés hídrico a través de diferentes estrategias y mecanismos fisiológicos o anatómicos como el cierre de estomas, control del turgor celular, disminución en el tamaño de las hojas, reducción en la velocidad de crecimiento, estrategias de absorción y acumulación de agua. También ocurren ajustes bioquímicos como la acumulación de osmolitos, poliaminas y azúcares en las células para mantener el volumen celular funcional, la disminución en la actividad fotosintética, la reducción en la actividad de Rubisco y otras enzimas del metabolismo de carbono. Entre los

ajustes moleculares se encuentran la activación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ABA, en la síntesis de enzimas antioxidantes, en la producción de canales de agua, en la biosíntesis de chaperonas y de otras proteínas protectoras, como las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (PLEAs) (Shao, *et al.*, 2008; Buchanan, *et al.*, 2015). A continuación, se muestran dos esquemas simplificando las respuestas de las plantas ante baja disponibilidad de agua.

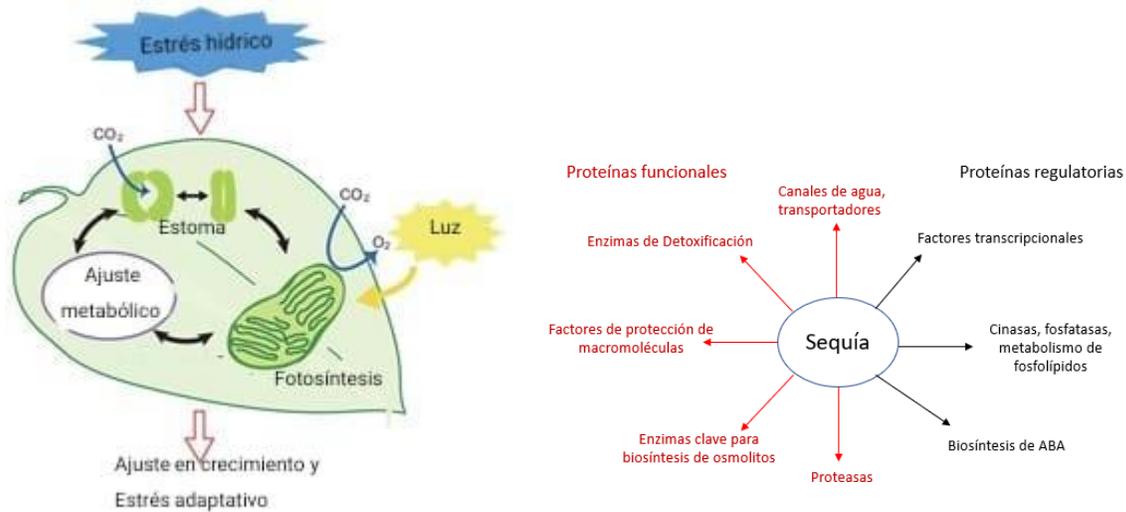


Fig. 1 Respuesta de las plantas ante estrés hídrico. De izquierda a derecha. En la primera imagen se ilustra la respuesta de los estomas y la actividad metabólica así como la actividad fotosintética ante un estrés hídrico (Modificado de Osakabe, *et al.*, 2014). En la segunda imagen se muestra la posible participación de algunas proteínas ante estrés hídrico (tomado de Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Las proteínas LEA

Las proteínas LEA fueron descritas por primera vez en la década de los 80 del siglo pasado (Dure & Galau, 1981; *et al.*, 1986; Ingram & Bartels, 1996) por la característica de acumularse abundantemente en la etapa de maduración de la semilla, cuando ésta pierde la mayor parte del contenido de agua. Posteriormente, se encontró que también se acumulaban ante condiciones de baja disponibilidad de agua en cualquier tejido y durante cualquier estadio del ciclo de vida de las plantas que va desde el estado gamético (polen) a estructuras vegetativas (hojas, raíces, etc.). Estas proteínas están presentes en todas las especies vegetales hasta ahora analizadas, y en todas ellas responden ante las condiciones de limitación de agua,

por lo que se piensa que son ubicuas en el reino vegetal y que están íntimamente ligadas a condiciones de estrés hídrico. Aunque la mayoría de las PLEA se consideran parte de un nuevo grupo conocido como “hidrofilinas” debido a sus características fisicoquímicas (i.e. alta hidrofiliidad y elevado contenido de aminoácidos pequeños), entre ellas se han agrupado en diferentes familias de acuerdo con su similitud de secuencia (Galau *et al.*, 1986; Dure *et al.*, 1989; Ingram & Bartels, 1996; Colmenero-Flores, *et al.*, 1997; Garay-Arroyo, *et al.*, 2000).

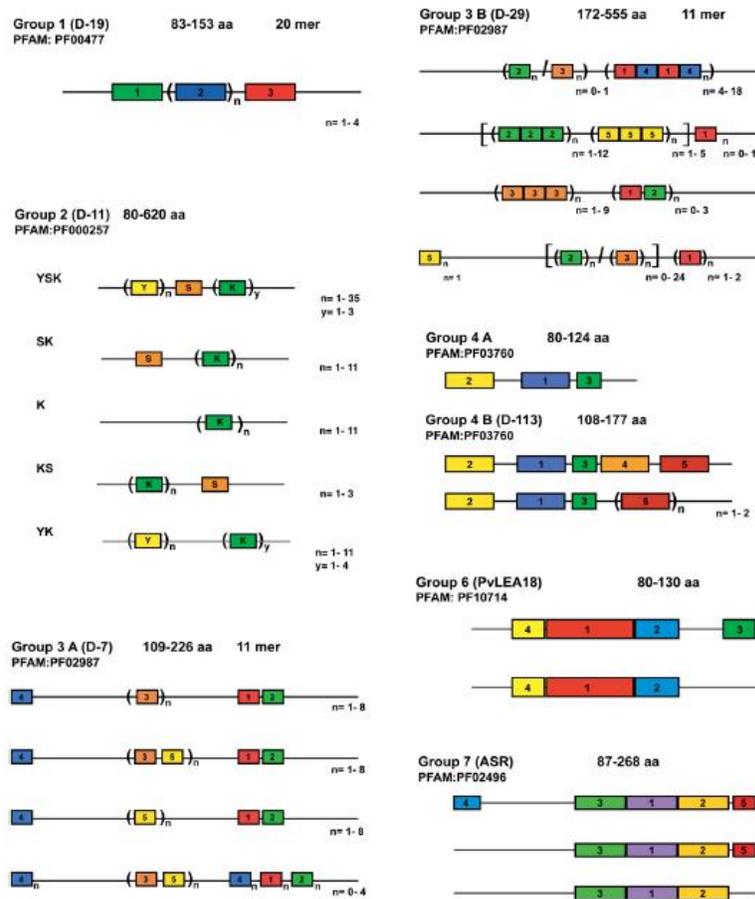


Fig. 2 Clasificación de las proteínas LEA de acuerdo a sus motivos conservados. Se muestran con etiqueta de color y número los motivos conservados de cada familia, excepto la familia 5. No hay relación entre motivos de diferentes familias. Tomado de Battaglia *et al.* (2008).

La clasificación utilizada en el presente trabajo corresponde a la propuesta por Battaglia, *et al.* (2008), que las agrupa en siete familias (Fig. 2). Las propiedades fisicoquímicas compartidas entre las familias, (alto contenido de glicina, alto índice

de hidrofiliidad y ausencia de residuos muy hidrofóbicos), exceptuando a la familia5, favorecen una organización estructural poco definida o flexible, por lo que se reconoce a la mayoría de las PLEAs como proteínas intrínsecamente desordenadas. A las PLEA con estas propiedades también se les conoce como PLEAs típicas, de las cuales más adelante se mencionarán algunas de las características que mantienen al ser proteínas intrínsecamente desordenadas.

A estas proteínas se las ha relacionado con la protección *in vitro* de enzimas reporteras (e. g. LDH, MDH, ADH, citrato sintasa, etc.) al prevenir su inactivación cuando se someten a tratamientos de congelamiento-descongelamiento o a deshidratación parcial, sin embargo, se ha reportado que la mayoría de las PLEAs no son capaces de renaturalizar proteínas previamente afectadas. También se ha demostrado que confieren estabilidad a membranas artificiales y que son capaces de unir cationes divalentes (e. g. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc.) (Artus, *et al.*, 1996; Battaglia, *et al.*, 2008; French-Pacheco, *et al.*, 2018) sumando los antecedentes en las familias de proteínas LEA 2, 4, 6 y 7 donde se ha reportado la capacidad de formar oligómeros *in vitro* o *in vivo* ante baja disponibilidad de agua o debido a la presencia de ciertos iones. Tales precedentes suponen una actividad multifuncional de las PLEA debido a su interacción con iones, a la protección obtenida ante diferentes métodos que simulan poca agua y al cambio de estado monomérico a oligomérico, sin olvidar la flexibilidad estructural al ser proteínas intrínsecamente desordenadas con capacidad de estructurarse ante cambios ambientales (Goldgur, *et al.*, 2007; Rivera-Nájera, *et al.*, 2008; Hernández-Sánchez, *et al.*, 2017; Liu, *et al.*, 2017; Romero, *et al.*, en preparación).

Además, se puede hipotetizar un mecanismo de acción si se considera la formación de coacervados o separación de fases líquido-líquido reportados en proteínas intrínsecamente desordenadas o con regiones intrínsecamente desordenadas ante diversas condiciones, favorecería la creación de microdominios y la estimulación de funciones biológicas importantes en diferentes estadios de las plantas, por ejemplo, durante la desecación de la semilla el fenómeno de separación de fases podría

formar compartimientos con moléculas blanco sensibles a la desecación y/o facilitar las interacciones transitorias multivalentes con componentes poco disponibles en condiciones normales de disponibilidad de agua (Cuevas-Velazquez, *et al.*, 2018; Dignon, *et al.*, 2019; Belott, *et al.*, 2020).

Propuesta de mecanismo

De acuerdo con los resultados de protección que se han reportado para proteínas LEA de diferentes grupos, se han propuesto dos mecanismos de acción: uno similar al realizado por las chaperonas, en la que estas proteínas protegen a su blanco por interacción directa, en tanto el otro sugiere la formación de un 'escudo molecular' en el que las proteínas LEA no interaccionan de forma directa sino a través de formar un ambiente acuoso alrededor de la proteína blanco (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2014). El primer mecanismo (Fig. 3) propone la interacción proteína-proteína por parte de la PLEA y la proteína cliente a través de sitios de unión, con una proporción 1:1, tal como se muestra en los ensayos de protección de Reyes 2005; las proteínas chaperonas al ser intrínsecamente desordenadas o al tener regiones desordenadas, pueden experimentar cambios conformacionales de desorden a orden y viceversa para efectuar su actividad, un ejemplo es la chaperona HdeA que en pH 7 se encuentra en forma de dímeros, pero en un pH ácido se separa en monómeros y ejerce su actividad de chaperona donde la región que interactúa con la proteína cliente se convierte en una región intrínsecamente desordenada (Tapley et al., 2009; Tompa & Kovacs, 2010)).

La hipótesis de escudo molecular se basa en que las proteínas LEA provocan una interferencia física que reduce los agregados de proteínas sin formar complejos que interactúan con las proteínas cliente; en otras palabras, ya sea formando una barrera alrededor de las proteínas u ocupando espacio en el medio, que evitaría las colisiones entre moléculas de proteínas, reduciendo la agregación y pérdida de función (Chakrabortee et al., 2012). En ensayos de crioprotección se ha observado que las proteínas LEA son capaces de proteger al desplegarse o tener un radio hidrodinámico grande y de requerir grandes concentraciones, de lo contrario no se

protegería a la proteína blanco (Hughes *et al.*, 2013). Ambos modelos no necesariamente son excluyentes (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2014).

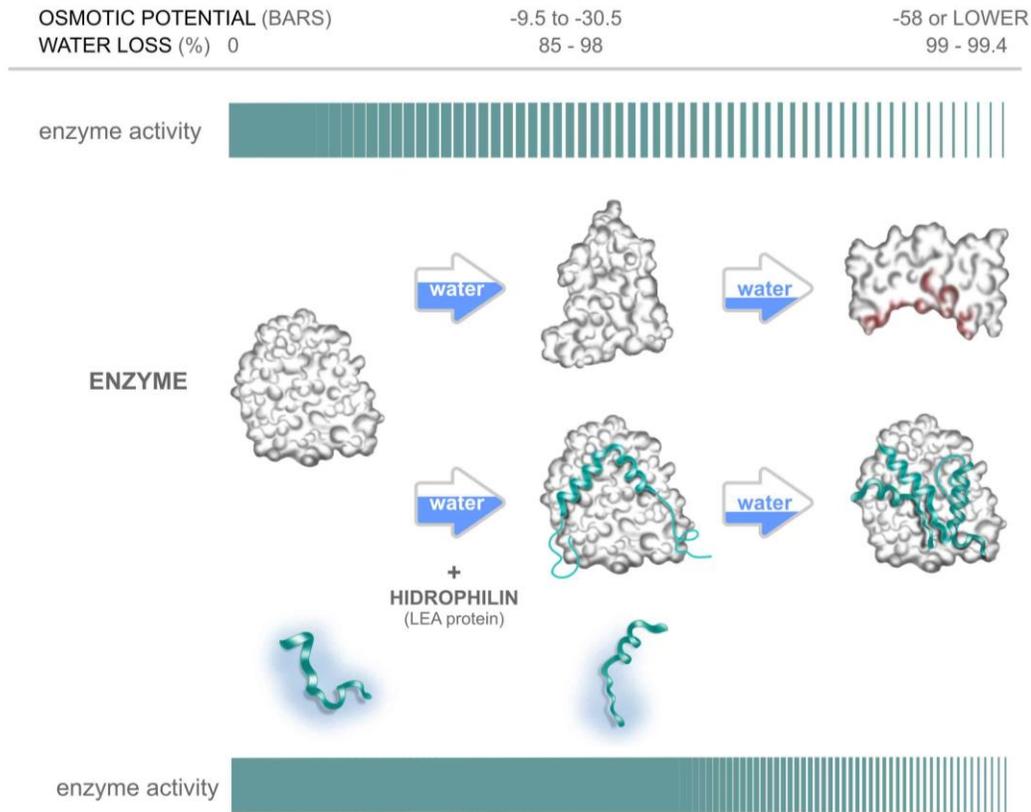


Fig. 3 Modelo hipotético tipo chaperona como mecanismo de acción las PLEAs. Se ilustra el efecto que tiene la baja disponibilidad de agua en una enzima reportera ante la presencia o ausencia de PLEAs. En la parte superior de la imagen se representa la desnaturalización de la enzima, mientras en la región inmediata inferior la enzima no sufre daño al interactuar con la proteína LEA. En la parte inferior de la imagen se ilustra una pLEA que adquiere cierto grado de estructuración ante la baja disponibilidad de agua. Tomado de Olvera-Carrillo *et al.* (2011).

Proteínas intrínsecamente desordenadas

En el siglo pasado se consideraba que las proteínas mantenían una estructura tridimensional más bien estática, incluso al interactuar con sus sustratos, dando lugar al modelo de llave y cerradura; posteriormente, se reportaron proteínas con notable dinamismo conformacional, en muchos casos asociado a su función dando lugar a interacciones dinámicas. En el primer caso, se partía de una estructura bien definida, sin cambios notorios; en tanto que, en el segundo, se considera la existencia de proteínas con mayor flexibilidad estructural. Sin embargo, es hasta

finales de siglo XX cuando se empezó a reconocer que no necesariamente se requiere de una estructura estática para que una proteína pueda realizar una función determinada, y con ello se aceleró el estudio de aquellas proteínas con mayor grado de flexibilidad estructural que no cumplían con los cánones de la relación estructura-función, en los que se preveía un plegamiento como el de las proteínas globulares (Tompa, 2009).

Ahora a estas proteínas con estructuras flexibles se les ha llamado de diversas maneras, como proteínas desplegadas, proteínas intrínsecamente no estructuradas y proteínas intrínsecamente desordenadas (PID), siendo esta última la más popular. También hay quienes prefieren el término de proteínas flexibles. Estas proteínas se caracterizan por tener una secuencia de baja complejidad (*i.e.* presencia de secuencias repetidas), un sesgo en la composición de residuos de aminoácidos flexibles o cargados, una baja abundancia de residuos hidrofóbicos, todas ellas propiedades que favorecen la flexibilidad estructural. Además, estas características también confieren resistencia a condiciones desnaturalizantes, tanto químicas (*e.g.* SDS, urea, etc.) como ambientales (*e.g.* el aumento de temperatura o la baja disponibilidad de agua) (Wright, 1999; Dunker, 2001). También es posible que las proteínas globulares (también llamadas estructuradas u ordenadas) contengan regiones con desorden estructural, a las que se les conoce como regiones intrínsecamente desordenadas (RID), las cuales pueden tener diferente longitud y se han asociado a propiedades funcionales o estructurales en este tipo de proteínas (Tompa, 2009).

Algunas funciones descritas para las PID son: presencia en las vías metabólicas al encontrarse una gran cantidad de PID o RID como factores transcripcionales propios del metabolismo, en elementos de señalización de cascadas de respuesta o en proteínas ribosomales (funciones biológicas); flexibilidad en sitios de fosforilación, actividad de chaperonas o en ensamblaje de complejos (funciones moleculares); y, siendo de gran importancia médica, la presencia de desorden en priones, involucrando cáncer, neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares,

entre otras (Tomba, 2012). Si bien ya se mencionaron algunas categorías de PID de acuerdo con Tomba, se les ha relacionado también de acuerdo con sus propiedades biofísicas, elementos funcionales o secuencias entre otras, con la finalidad de entender su mecanismo de acción (Van Der Lee, *et al.*, 2014).

Al ser proteínas con la capacidad de relacionarse simultáneamente con más de un blanco, a la capacidad de ordenarse y desordenarse ante variaciones ambientales, se le suma la característica de separación de fases líquido-líquido, es decir, la creación de microdominios ante cambios ambientales propiciando otro tipo de interacciones moleculares dinámicas específicas y transitorias (siendo un ejemplo los gránulos de estrés) dando gran importancia a las PID e RID en los procesos celulares a diferentes niveles (Cuevas-Velázquez & Dinneny, 2018; Bellot, *et al.*, 2020).

Debido a su flexibilidad no es posible cristalizarlas, por lo que las técnicas más usadas para evaluar sus características y dinámicas estructurales son la resonancia magnética nuclear (RMN) o el dicroísmo circular (DC). La aplicación de herramientas bioinformáticas también ha permitido acercarse a sus características estructurales, tanto para predecir su grado de desorden como su propensión hacia el orden (Oldfield & Dunker, 2014; Na, *et al.*, 2018).

ANTECEDENTES

Las proteínas LEA del grupo 4 (PLEA4)

En el caso de la planta modelo utilizada para análisis moleculares y genéticos, *A. thaliana*, se han descrito 51 genes que codifican para proteínas LEA; siendo el grupo 4 uno de los más pequeños, al contar con sólo tres genes (*AtLEA4-5*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-1*, en donde el último número corresponde al cromosoma en donde se ubica). Esta característica facilita su estudio, sobre todo a nivel genético y funcional, ya que se presta para la obtención de mutantes sencillas o múltiples para su posterior análisis fenotípico (Hundertmark & Hinch, 2008; Battaglia, *et al.*, 2008). A pesar de que las tres PLEA4 tienen una alta conservación de motivos en la región amino (los primeros 70-80 aminoácidos), existe gran variabilidad de tamaño y baja similitud en la región carboxilo, por lo que la familia se clasifica en dos subgrupos: el sub-grupo A conformado por las proteínas *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, con 134 y 97 residuos, respectivamente; y el sub-grupo B con la proteína *AtLEA4-5* conformada por 158 aminoácidos (Battaglia, *et al.*, 2008; Olvera-Carrillo, *et al.*, 2010). En la siguiente tabla se muestran algunas características de dos proteínas LEA del grupo 4 y de dos regiones independientes de la *AtLEA4-5* cuyo subíndice indica los residuos de aminoácidos correspondientes a la *AtLEA4-5* que serán utilizadas a lo largo de este trabajo.

Proteína	# Residuos	Peso molecular (kD)	pI	Motivos
<i>AtLEA4-5</i>	158	16.17	9.43	
<i>AtLEA4-5</i> ₁₋₇₇	77	8.48	9.52	
<i>AtLEA4-5</i> ₇₈₋₁₅₈	81	7.73	7.21	
<i>AtLEA4-2</i>	97	10.48	9.66	

Tabla. 1 Parámetros fisicoquímicos de las PLEAs de *A. thaliana*. Se muestran las características de las PLEA del grupo 4 de *A. thaliana* que se utilizaron en el presente trabajo. Los motivos hacen referencia a secuencias de aminoácidos conservados propios de la familia 4. Los esquemas fueron tomados de Battaglia, *et al.* (2008). Datos recopilados de <https://web.expasy.org/protparam/>.

Se ha propuesto que estas proteínas juegan un papel en la protección celular ante una disminución en la disponibilidad de agua, ya que se acumulan en el embrión seco y en distintos tejidos vegetativos de plantas sometidas a estas condiciones. También se han reportado datos que muestran que las proteínas de esta familia realizan una función protectora en las plantas ante el déficit hídrico: mutantes en estos genes producen un fenotipo de sensibilidad a este ambiente estresante durante la germinación, y también en la fase reproductiva, mostrando un menor número de botones florales y de semillas (Olvera-Carrillo, *et al.*, 2010; Olvera-Carrillo, *et al.* 2011). Puesto que los fenotipos de sensibilidad se evidenciaron en las mutantes sencilla y doble del gen *AtLEA4-5*, se infiere que las proteínas LEA, aún las de la misma familia, no son redundantes; es decir, que no llevan a cabo la misma función, o bien, que se expresan diferencialmente. Estos datos sumados con los obtenidos para otras mutantes en genes para proteínas LEA de otros grupos, refutan la reiterada afirmación de que estas proteínas realizan las mismas o similares funciones con posible diversidad de blancos, la cual se fundamentaba en los resultados obtenidos *in vitro*.

Propiedades estructurales de las LEA4

La caracterización estructural de dos proteínas LEA4 de *A. thaliana*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*, por RMN y por DC, demostró que son mayoritariamente desordenadas en solución acuosa. Sin embargo, si se disminuye progresivamente el agua disponible con algún soluto como glicerol o se incrementa el amontonamiento macromolecular, se observó que estas proteínas adquieren estructura tipo alfa-hélice y disminuye el desorden, también de manera gradual (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2016). Llamó la atención que los análisis bioinformáticos de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas (Fig. 4A) sugieren que sus regiones amino tienen propensión a formar estructuras tipo alfa – hélice, y que ésta es mayor que la predicha para las regiones carboxilo (Fig. 4C) las cuales mantienen tendencia al desorden (Fig. 4B). Ante el hecho de que estas proteínas se acumulan mayoritariamente bajo condiciones de baja disponibilidad de agua sugiere que estas proteínas pudieran ganar orden en forma de alfa-hélices, en estas condiciones. Un

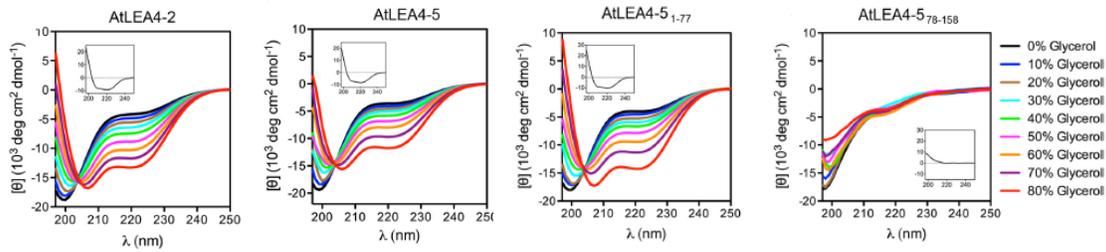


Figura 5. Espectros de dicroísmo circular a diferentes concentraciones de glicerol. De izquierda a derecha se ilustran los patrones de tendencia a formar α hélice al aumentar la concentración de glicerol. AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈. Tomado de Cuevas-Velázquez et al. (2016).

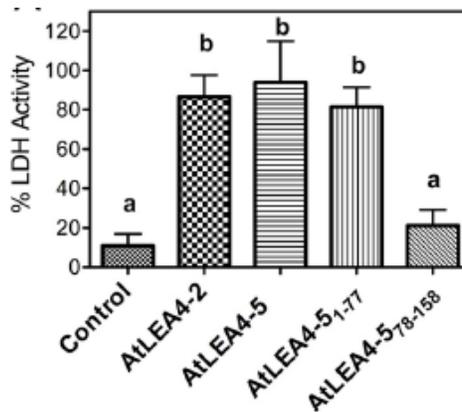


Figura 6. Actividad enzimática de la LDH ante deshidratación parcial. Gráfica que muestra el porcentaje de protección que hay hacia la actividad de la LDH de acuerdo a la PLEA o a la región de PLEA utilizada comparando con la LDH sola (control). Tomado de Cuevas-Velázquez et al. (2016).

Detección de oligomerización de las PLEA4.

Para determinar si la AtLEA4-5 interacciona *in vitro* con la enzima reportera cliente LDH, se realizaron experimentos en los que las proteínas se entrecruzaron o no, en presencia o no de LDH, usando la técnica de entrecruzamiento de proteínas no modificadas fotoinducido (por sus siglas en inglés PICUP), en la que el entrecruzador químico, en este caso el complejo Ru(II)Bpy_3^{2+} , se activa con luz por algunos segundos, en presencia de un aceptor de electrones, y sin modificaciones de las proteínas implicadas, por lo que los entrecruzamientos deben ocurrir entre regiones muy cercanas entre las proteínas (Fancy, *et al.* 2000). Los datos obtenidos de estos ensayos mostraron no sólo que la proteína AtLEA4-5 puede interactuar con la LDH, sino que también forma homo-oligómeros. Partiendo de estos

resultados, se realizaron entrecruzamientos con las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-2, AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ mostrando la formación de homo-dímeros en todos los casos, excepto en la región amino. La razón de este último resultado es que el método de PICUP requiere que los polipéptidos involucrados contengan tirosinas como sustrato para la reacción de entrecruzamiento, residuos que no están presentes en la región amino, pero sí en la región carboxilo. Sin embargo, la aplicación del entrecruzamiento químico a través de tirosinas mostró que la región amino por sí sola también es capaz de formar homo-oligómeros (Fig. 7) (Romero-Pérez *et al.*, tesis doctoral). Actualmente se están realizando experimentos adicionales *in vitro* para verificar estas observaciones.

Cabe mencionar que cuando se determina la presencia de las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 a partir de extractos totales de proteínas obtenidos de semilla seca utilizando anticuerpos específicos para cada una, en experimentos tipo Western blot, se detectan las formas monoméricas, pero también bandas que migran con una masa molecular mayor, en el caso de la AtLEA4-5 corresponde a la masa molecular esperada para el dímero, en tanto que para la AtLEA4-2, las bandas presentan masas moleculares mayores (Olvera Carrillo, *et al.*, 2010).

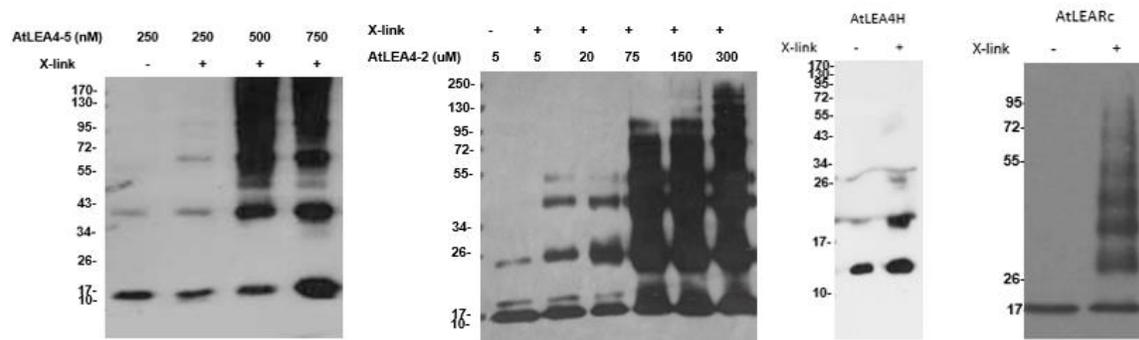


Figura 7. Entrecruzamientos de proteínas AtLEA4. De izquierda a derecha se muestran los Western blot de los entrecruzamientos de AtLEA4, AtLEA4-5, AtLEA4-2, AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈. Tomado de Romero (Tesis doctoral).

JUSTIFICACIÓN

Puesto que existen observaciones *in vitro* que apuntan hacia la posibilidad de que las PLEA4 formen oligómeros, surge la pregunta de si esta característica también ocurre *in vivo* y nos pueda brindar mayor información sobre su comportamiento en el medio celular. El modelo de trabajo propuesto por mi grupo de trabajo sugiere que las proteínas LEA podrían formar oligómeros que les permitieran aumentar su capacidad protectora bajo condiciones muy severas de deshidratación; por ejemplo, aquellas que se presentan durante la desecación de la semilla. Esto podría ocurrir incluso a través de mecanismos de protección diferentes que involucren fenómenos como la separación de fase líquido-líquido o la formación de geles o de estado vítreo, como el que se presenta en las semillas secas. También es posible que la asociación entre ellas les permita protegerse de degradación dada su flexibilidad estructural, o que en esta organización pudiera realizar otra función, entre otras opciones viables en el contexto celular. Estas diferentes observaciones nos llevaron a proponer la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

Los monómeros de las proteínas LEA del grupo 4 de *Arabidopsis thaliana* son capaces de interactuar *in vivo*, a través de sus regiones.

OBJETIVO GENERAL

Analizar mediante la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) si existe interacción entre monómeros de las proteínas AtLEA4-5 ó AtLEA4-2, y determinar cuáles regiones de estas proteínas participan en esta asociación.

Objetivos particulares

- Obtener construcciones en las que los marcos abiertos de lectura para las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2, y para las regiones amino y carboxilo de la proteína AtLEA4-5 se expresen en fusión con regiones complementables de la proteína amarillo fluorescente en vectores

diseñados para realizar la técnica de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC).

- Realizar transformaciones transitorias en *Nicotiana benthamiana* para determinar si existe complementación de la fluorescencia entre monómeros de la proteína AtLEA4-5 o entre monómeros de la proteína AtLEA4-2.
- Realizar transformaciones transitorias en *Nicotiana benthamiana* para determinar si existe complementación de la fluorescencia entre la región amino de la proteína AtLEA4-5 ó entre la región carboxilo de la misma proteína.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Método para analizar la interacción de proteínas *in vivo*

Para el estudio de interacciones de proteína-proteína *in vivo* existen diversas técnicas, como el ensayo de doble híbrido (Fields & Sternglanz, 1994), la 'Transferencia de Energía de Resonancia de Föster' (FRET por sus siglas en inglés) (Truong & Ikura, 2001) y la 'complementación bimolecular de la fluorescencia' (cuyas siglas en inglés son BiFC), esta última fue utilizada en el presente trabajo por ser una técnica sencilla, económica y rápida (Figura 8).

El sistema BiFC tiene como fundamento el uso de dos regiones de una proteína fluorescente, en este caso la proteína amarillo fluorescente YFP, que al expresarse independientemente no producen fluorescencia, a menos que se fusione con proteínas o regiones de proteínas que interactúan, de tal manera que esta interacción promueva el acercamiento de las regiones de la YFP lo suficiente para 'complementarse' y así recuperar la fluorescencia (Hu *et al.*, 2002). El sistema se ha implementado en diferentes organismos, como es el caso de células vivas de plantas donde se han desarrollado vectores específicos que contienen los fragmentos truncados de YFP ya sea en la región amino (SPYNE-SPYCE) o en la región carboxilo (PYFN43-PYFC43) de las secuencias de interés insertadas (Belda-Palazón, *et al.*, 2012; Walter, *et al.*, 2004). De modo que anteriormente se ha empleado en busca de oligomerización *in vivo* de dehidrasas (grupo 2 de las PLEAs) y PLEAs del grupo 6 (Rivera-Nájera *et al.*, 2014; Hernández-Sánchez, *et al.*, 2017). Esta técnica es ampliamente utilizada debido a su bajo costo, a la rapidez y a la sencillez con la que se realiza.

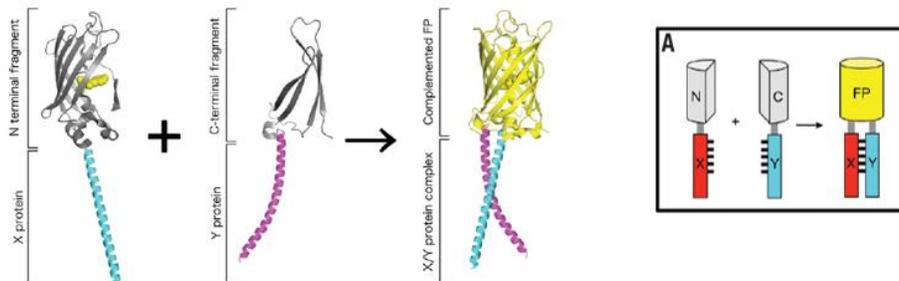


Fig. 8 Sistema BiFC. Ilustración de la complementación de fluorescencia de la proteína amarillo fluorescente. Cuando las proteínas de interés interactúan X y Y, la región N y C de la YFP se complementan y fluorescen. Tomado de Kodama & Hu 2012.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fragmentos relacionados con la familia AtLEA4 a partir de pENTR

Antes de realizar las construcciones de plásmidos que se utilizarían para la aplicación de la complementación de fluorescencia bimolecular, se verificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en colonia (Tabla 1) que las secuencias correspondientes a los marcos abiertos de lectura para las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 y para las regiones AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ fueran las correctas en los vectores pENTR (donados por D. Rendón y C. Cuevas). Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada secuencia, de acuerdo con la descripción en el Apéndice 1. Los fragmentos obtenidos se enviaron a verificar por secuenciación a la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología. Después de la corroboración, se amplificaron los fragmentos utilizando los oligonucleótidos sentido (Fw) M13 y anti-sentido (Rv) M13 para, posteriormente, realizar los experimentos de recombinación LR.

Tabla 1. Condiciones de PCR para verificar las secuencias AtLEA de interés y para la amplificación de los fragmentos correspondientes

Nombre	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones	Polimerasa utilizada
TRC*-TRC*	227-294	95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30 s; se finaliza con 72°C por 5 min.	Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)
M13Fw- M13RV	573-640	98°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s; se finaliza con 72°C por 5 min.	Pfu (<i>Pyrococcus furiosus</i>)

*Oligonucleótidos específicos para cada secuencia de AtLEA, más información en el Apéndice 1. El tamaño del fragmento abarca un rango donde el menor número corresponde o es aproximado a los fragmentos AtLEA4H, AtLEARC y AtLEA4-2, mientras el de mayor tamaño representa al fragmento obtenido de AtLEA4-5.

Se utilizaron dos versiones de las secuencias de interés a insertar, una conteniendo su codón de paro y otra sin éste. Al inicio del proyecto se contaba solamente con

las secuencias con codón de paro que se utilizaron para clonar en los vectores PYFN43-PYFC43, mientras se obtenían las segundas (sin codón de paro) para insertarse en los vectores SPYNE-SPYCE, debido a que su presencia interrumpe la traducción de la proteína amarillo fluorescente.

Los productos de PCR se separaron en geles con agarosa al 2% en una cámara de electroforesis durante 30 min a ~90 V. Posteriormente, se tomó fotografía del gel con apoyo de un foto-documentador (ImageQuant, General Electric).

Siguiendo el protocolo del paquete GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher) se purificaron los fragmentos amplificados por PCR con los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv, se cuantificaron con apoyo de un nano-espectrofotómetro (Nanodrop) y se guardaron en un tubo de 1.5 mL a -20°C.

Diseño, construcción y verificación de los plásmidos utilizados

Verificación de los vectores destino

Se utilizaron dos versiones de vectores destino (Tabla 2). En ambos casos, los vectores confieren resistencia a kanamicina y contienen al promotor 35S del virus del mosaico de la cloriflor (CaMV), así como al terminador R-Nos para su expresión en plantas. Los vectores PYFN43 y PYFC43 contienen doble promotor 35S. Para facilitar la visualización de las construcciones a obtener se muestra un esquema de los esqueletos de los cassettes (Fig. 9)

Tabla 2: Vectores destino para expresión transitoria

Nombre del vector	Posición de YFP	Región de YFP
PYFN 43¹	Río abajo del promotor 35S	Amino
PYFC 43¹	Río abajo del promotor 35S	Carboxilo
SPYNE²	Río arriba del terminador R-NOS	Amino
SPYCE²	Río arriba del terminador R-NOS	Carboxilo

¹ Primera versión de vector destino. ² segunda versión de vector destino.

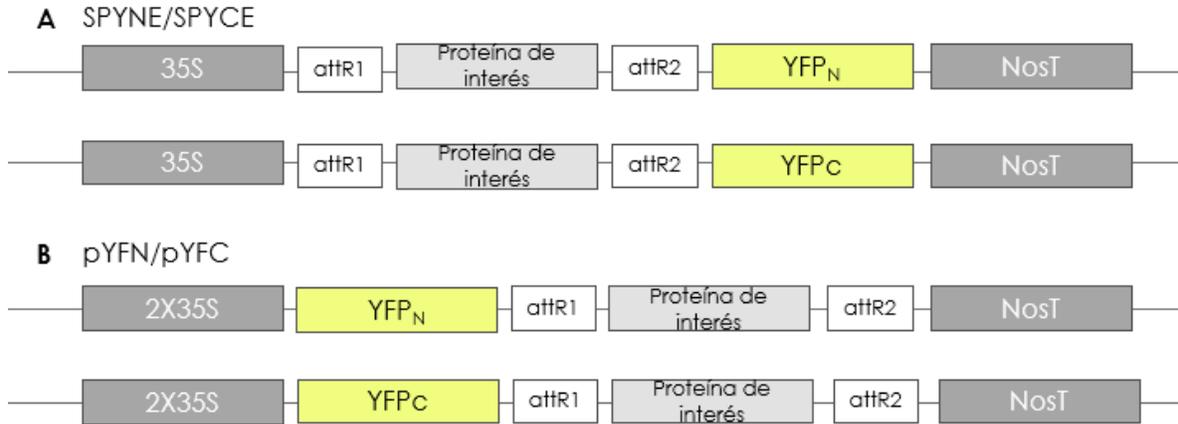


Figura 9. Esquema de los vectores a utilizar. Se ilustran los esqueletos de los cuatro diferentes vectores utilizados en el presente trabajo, en ambos se muestran las posiciones del promotor 35S, el fragmento de la YFP, los sitios de recombinación att, el terminador Nos y la región donde se inserta el gen de la proteína de interés. A) Cassette de los vectores SPYNE (arriba)/SPYCE (abajo) con el fragmento de la YFP en la región C-terminal. B) Cassettes de los vectores pYFN (arriba)/ pYFC (abajo) con el fragmento de la YFP en la región N-terminal.

Para verificar la autenticidad de los vectores destino, se realizó una PCR con el juego de oligonucleótidos citados en la Tabla 3. En el caso de los vectores PYF se realizó una reacción con la enzima *EcoRV* (*Eco321*, Thermo Fisher), utilizando 1 µg de DNA, 15 µL de agua estéril, 2 µL de Buffer R 10X y 1 µL de enzima, incubado a 37° durante 16 horas; después del tiempo de incubación, se inactivó la enzima a 80°C durante 20 min y los productos de la reacción se separaron en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos separados se fotografiaron con un fotodocumentador (ImageQuant 300, General Electrics)

Tabla 3. Condiciones de la PCR para confirmar la identidad del vector

Nombre	Tamaño aprox. del fragmento	Condiciones
35S-RNos	~600 - 1000	95°C por 5 min; 30 ciclos a 95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30 s; se finaliza con 72°C por 5 min.

*El rango del tamaño de los fragmentos esperados abarca los correspondientes a los vectores SPYNE, SPYCE, PYFN43 y PYFC43.

El DNA plasmídico (pDNA) de cada vector se introdujo por transformación a células de *Escherichia coli* cepa DB3.1, en la que se replican para su posterior purificación, cuando así se requiera. El protocolo de transformación se describe más adelante.

Clonación de los fragmentos de DNA relacionados con la familia AtLEA4 en los vectores destino.

Puesto que el vector de entrada (Entry clone) posee la misma resistencia de antibiótico que el vector destino, se optó por utilizar los productos de PCR obtenidos en el apartado '*Obtención de fragmentos de AtLEA4 a partir de pENTR*'. Empleando la enzima *LR Clonase II Enzyme* (Invitrogen), se realizó la recombinación entre los productos de PCR correspondientes a las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-5¹⁻⁷⁷, AtLEA4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸ y AtLEA4-2 (Entry clone) y los vectores destino SPYNE, SPYCE, PYFN43 y PYFC43, dando lugar a 14 construcciones (vectores conocidos como Expression clone) ya que se cuenta con 2 construcciones realizadas por la estudiante Romero (AtLEA4-5 dentro de SPYNE y SPYCE) (Apéndice 2). Los componentes de cada reacción de recombinación fueron: ~60 ng del producto del PCR linearizado, ~150 ng del vector destino (relación molar 1:1), 0.5 µL de *LR Clonase II Enzyme* y el Buffer TE (pH 8.0) necesario para alcanzar 4 µL de volumen final. Las reacciones se incubaron a 25°C durante ~16 horas y, posteriormente, se detuvieron con 0.5 µL de proteinasa K y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Todo el producto de la reacción se utilizó para transformar células quimio-competentes de *E. coli* DH5α.

Protocolo de transformación de las cepas de *Escherichia coli* DH5α y DB3.1

Las células quimiocompetentes de la cepa apropiada se descongelaron por 20 min en hielo y se añadieron 1.5 µL del DNA plasmídico (~10 ng), posteriormente, se sometieron a un choque térmico por 1 min a 42 °C y 1 min en hielo, este procedimiento se repitió dos veces. Se recuperaron las células en 1 mL de LB durante una hora a 37 °C con agitación y luego se concentraron centrifugando a 7,000 rpm, desechando 300-500 µL del sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en el sobrenadante restante, de esta suspensión se plaquearon 150 y 300 µL en cajas Petri con medio LB sólido conteniendo kanamicina [50ug/uL], para seleccionar a las células que se hubiesen transformado con los plásmidos en cuestión. Por último, las cajas se incubaron por 12-24 h a 37° C.

Confirmación de la transformación

Además de verificar el crecimiento de las bacterias transformantes en el medio de selección, se realizó PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos que flanquean la secuencia insertada en combinación con el terminador R-NOS presente en el vector destino (Tabla 4). En el caso de las construcciones en los vectores PYF, adicionalmente se realizaron digestiones con enzimas de restricción, como se describió para la verificación del vector. Las colonias seleccionadas para realizar la PCR se sembraron sobre medio sólido fresco en caja Petri, para conservarlas. Se purificó pDNA en pequeña escala utilizando el paquete GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Fisher, el pDNA obtenido se cuantificó con apoyo de un nano-espectrofotómetro (Nanodrop) y se guardó en un tubo de 1.5 mL a -20 °C.

Tabla 4. Condiciones de PCR para verificar la transformación

Nombre	Tamaño del fragmento	Condiciones
TRC*-R-NOS	~400-1000	95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30 s; se finaliza con 72°C por 5 min.

*Oligonucleótidos específicos para cada secuencia de AtLEA, más información en el Anexo1.

Los fragmentos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, en tanto que los productos de digestión con enzimas de restricción se separaron en geles de agarosa al 1%. En ambos casos la electroforesis se corrió por 30 min a ~90 V. Posteriormente, se tomó fotografía del gel con apoyo de un fotodocumentador.

Protocolo para las reacciones de polimerización en cadena (PCR)

Los componentes de las PCR para cada uno de los fragmentos de DNA amplificados con la enzima Taq fueron: 2 µL de buffer 10x, 0.4 µL de dNTPs 10 mM, 0.24 µL del oligonucleótido Fw 10 ng/µL, 0.24 µL del oligonucleótido Rv 10 ng/µL, 1 µL de enzima, 1 µL de la muestra 10 ng/µL, o la cantidad de colonia obtenida con la punta de un palillo estéril, y 15.12-16.12 µL de agua libre de nucleasas. Para las

PCR realizadas con la enzima *Pfu* la mezcla fue como sigue: 5 μ L de buffer con $MgSO_4$ 10x, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L del oligonucleótido Fw 10 ng/ μ l, 1 μ L del oligonucleótido Rv 10 ng/ μ L, 1 μ L de la muestra de DNA 10 ng/ μ L, 1 μ L de enzima y 39 μ L de agua libre de nucleasas dando un volumen final de 50 μ L.

Secuenciación de los fragmentos de DNA y de los plásmidos obtenidos

La secuencia de nucleótidos tanto de los vectores como de las construcciones finales y los plásmidos con los fragmentos que codifican secuencias relacionadas con la familia AtLEA4 se obtuvo a través de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología. Las muestras se enviaron en un volumen final de 16 μ L conteniendo 1 μ L del oligonucleótido a 10 ng y de 300-1000 ng de DNA.

Preparación de las mezclas para la conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas, conteniendo cada una de las construcciones que se obtuvieron, se prepararon para su conservación a largo plazo. Para ello, se crecieron los cultivos bacterianos en medio rico (LB) con el antibiótico indicado durante 12-16 h, a la temperatura óptima de crecimiento para cada caso; de este cultivo se tomaron 500 μ L y se adicionaron 500 μ L de glicerol estéril al 50%. Esta suspensión se homogenizó muy bien y se transfirió a tubos estériles de 1.5 mL. Los tubos se conservaron a $-80^{\circ}C$ para su uso posterior. La toma de células de estas muestras de reserva se realizó con un asa bajo condiciones de esterilidad, sin descongelar la muestra, para evitar cambios bruscos de temperatura, lo cual iría disminuyendo su viabilidad.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV3010

Con modificaciones del protocolo de Miranda-Brasileiro y Vera Tavares (1998), se transformaron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* GV3010 como se describe a continuación. Las células se descongelaron durante 20 min en hielo, se añadieron \sim 100 ng de DNA plasmídico y se dejaron reposar nuevamente en hielo entre 10-20 min, después se colocaron en N_2 por 2 min, y se descongelaron a $37^{\circ}C$ por 3-5 min. Posteriormente, se incubaron en hielo por 1 min, y transcurrido este

tiempo, se les agregó 1 mL de LB, y se incubaron por 2 horas a 28°C con agitación. En seguida, se plaquearon 50 y 150 µL del cultivo en cajas con LB sólido, adicionado con kanamicina y rifampicina [50ug7uL], los antibióticos necesarios para seleccionar a las células de *A. tumefaciens* que se hubiesen transformado con los plásmidos en cuestión. Se incubaron durante dos días a 28°C y las colonias crecidas en este medio de selección se utilizaron para corroborar la presencia del plásmido de interés correspondiente por PCR en colonia.

Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* por agro-infiltración.

Partiendo del protocolo modificado de Luna-Valdez (2019), se completó el siguiente proceso. Se preparó un precultivo en 1 mL de LB suplementado con kanamicina y rifampicina por cada cepa transgénica de *A. tumefaciens* a utilizar, en cada caso se incluyó *A. tumefaciens* que expresaran la proteína de tomate la cepa auxiliar p19, la cual es un supresor del silenciamiento y permite una mayor expresión de las proteínas de interés (Voinnet, *et al.*, 2003; Leuzinger, *et al.*, 2013). Los cultivos se incubaron durante 12-16 horas a 28 °C en agitación; posteriormente, se inocularon 25 mL de LB fresco, suplementado con kanamicina y rifampicina, con 1 mL del precultivo, el cual se incubó bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura y agitación. Al término de este tiempo, los cultivos se cosecharon por centrifugación en tubos cónicos de 50 mL a 8,000 rpm (rotor JA20) durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente la pastilla de células en 5 mL de MgCl₂ 10 mM. Para determinar la densidad celular de los cultivos por absorbancia, se hicieron diluciones 1:20 (que denominaremos (**Fd**)) de cada cultivo (por triplicado), y la turbidez se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los cálculos se realizaron obteniendo la media aritmética de la absorbancia de cada muestra (que denominamos **A_{20x}** por el factor de dilución 1:20). Se ajustó el volumen de cada cultivo para obtener una absorbancia (a 600 nm) final de 0.75 (**A_n**) en 5 mL de MgCl₂ 10 mM (**V₂**). Para conocer el volumen necesario a utilizar de las células resuspendidas, se aplicó la siguiente fórmula: **V_ix= (V₂*A_n) / (A_{20x}*F_d)**

Se mezcló el volumen resultante de la fórmula de $V_{ix} + V_{ip19} + V_{iy}$ donde V_{ix} son las construcciones con la región amino y V_{iy} son las construcciones con la región carboxilo, dando una absorbancia total de 2.25 (Tabla 5). Por último, para promover la transformación, se añadieron 5 μ L de acetosiringona 1000x (50 μ g/mL) y los cultivos se incubaron durante 3 horas 25°C. La mezcla de bacterias se infiltró en hojas de *N. benthamiana* utilizando una jeringa sin aguja, presionando suavemente contra el envés de las hojas mientras se aplicaba una ligera presión en el émbolo. El área agroinfiltrada se delimitó y marcó con un plumón. Las hojas agroinfiltradas con las construcciones de PYFN/C se procesaron después de 48 horas; en tanto que las construcciones de SPYNE/SPYCE se analizaron después de 72 horas. La mezcla de bacterias estaba constituida por aquellas que contenían las construcciones con la secuencia de interés (AtLEA4-5, At.LEA4-2, AtLEA4-5₁₋₇₇ ó AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈) insertada en el vector destino fusionada a la región amino de la proteína amarillo fluorescente (ya sea PYFN o SPYNE), las células conteniendo las construcciones con la misma secuencia insertada en el vector destino fusionada a la región carboxilo de la proteína amarillo fluorescente (PYFC o SPYCE), y las bacterias que llevaban el plásmido expresando p19. Estas bacterias ingresarán con cierta probabilidad a algunas células de los tejidos vegetales, en donde los plásmidos con las secuencias de interés podrán expresar las proteínas correspondientes; la presencia de dos proteínas de fusión con las regiones complementarias de la YFP en una célula vegetal podrá regenerar la fluorescencia en caso de que interaccionen entre sí. En el presente trabajo de tesis solamente se emplearon las mezclas homotípicas de las proteínas de interés (Tabla 5).

Tabla 5. Mezclas de construcciones

VECTOR PYFN/PYFC	VECTOR SPYNE/SPYCE
PYFN-ATLEA4-5 ₁₋₇₇ / PYFC- ATLEA4-5 ₁₋₇₇	SPYNE-ATLEA4-5 ₁₋₇₇ / ATLEA4-5 ₁₋₇₇
PYFN- ATLEA4-5 ₇₈₋₁₅₈ / PYFC- ATLEA4-5 ₇₈₋₁₅₈	SPYNE-ATLEA4-5 ₇₈₋₁₅₈ /SPYCE-ATLEA4-5 ₇₈₋₁₅₈
PYFN-ATLEA4-2 / PYFC-ATLEA4-2	SPYNE-ATLEA4-2 / SPYCE-ATLEA4-2
PYFN-ATLEA4-5 / PYFC-ATLEA4-5	SPYNE-ATLEA4-5 / SPYCE-ATLEA4-5
PYFN / PYFC*	SPYNE / SPYCE*

*Control negativo que representa los vectores destino sin secuencia insertada.

Preparación de muestras y obtención de las imágenes con un microscopio confocal

Se obtuvieron aleatoriamente círculos de 0.6 mm de diámetro con apoyo de un sacabocados, a partir de las zonas infiltradas de las hojas de *N. benthamiana*; estos círculos se colocaron en un portaobjetos sobre una gota de agua y se les cubrió con un cubreobjetos, se dejaron reposando 10 min y se montaron en un microscopio confocal (Yokogawa). Las observaciones se realizaron con el apoyo del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) localizado en el IBt-UNAM.

Las condiciones técnicas utilizadas en el microscopio confocal Yokogawa consistieron en el uso de una cámara Ixon, con el objetivo 20X, en el canal de 515 (frecuencia de excitación), con stacks en z, 15 micras arriba y 15 micras abajo, con 16 cuadros alrededor del centro. El tiempo de exposición y la intensidad del láser se establecieron de acuerdo con las muestras utilizadas. En el Apéndice 3 se muestran los ajustes de observación utilizados en cada caso. Se obtuvo un mosaico de fotografías en formato *slidebook* (.sld), el cual se procesó con el programa ImageJ (FIJI). El contraste se ajustó sólo en el caso de las imágenes correspondientes a las hojas infiltradas con bacterias conteniendo las construcciones en los vectores SPYNE-SPYC; este ajuste fue el mismo entre todas las muestras provenientes del mismo evento de observación.

RESULTADOS

Obtención de las construcciones en los vectores para expresión transitoria de las proteínas AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈

Obtención de los fragmentos AtLEA4 a partir de vectores pENTR

De acuerdo con el primer objetivo, se realizaron PCRs para amplificar los fragmentos codificantes para las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 y para los fragmentos correspondientes a la región amino-terminal (AtLEA4-5₁₋₇₇) y carboxi-terminal (AtLEA4-5₇₇₋₁₅₈) de AtLEA4-5 (en algunas ocasiones me referiré a todos estos fragmentos como 'fragmentos AtLEA4'), los cuales se encontraban insertados en plásmidos de 'entrada' llamado pENTR. Estos fragmentos se obtuvieron usando oligonucleótidos que apareaban justo después de los sitios de recombinación *att* y cuyo tamaño final fue 573 pb para AtLEA4-5₁₋₇₇, 598 pb para AtLEA4-5₇₇₋₁₅₈, 640 pb para AtLEA4-2 y 800 pb para AtLEA4-5 (Anexo 1.1). Una vez amplificados, se verificaron por secuenciación de DNA y se demostró que la secuencia era la correcta en cada uno de los casos (Anexo 1.2).

Antes de introducir los fragmentos obtenidos en los vectores destino para la expresión de cada uno de los polipéptidos de interés, los vectores se verificaron tanto a través de PCR como con enzimas de restricción, cuyos productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa para comprobar su tamaño (Anexo 2.1).

Inserción de los fragmentos AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ en los vectores destino pYFN ó pYFC.

Una vez obtenidos y verificados los vectores, así como los fragmentos AtLEA4, se realizaron las clonaciones correspondientes (Tabla 5) y la transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* (ver Materiales y métodos). Una vez seleccionadas las colonias positivas en los medios adecuados, se tomaron varias colonias para

realizar experimentos de PCR, confirmando con ello la inserción en los vectores destino de acuerdo al tamaño de los fragmentos esperados en cada caso: 400-474 pb para las construcciones pYFN4-5₁₋₇₇, pYFC4-5₁₋₇₇, pYFN4-5₇₈₋₁₅₈, pYFC4-5₇₈₋₁₅₈, pYFN4-2 y pYFC4-2 (Fig. 10); y 800 pb para las construcciones pYFN4-5 y pYFC4-5 (Fig. 10 E, Fig.10F).

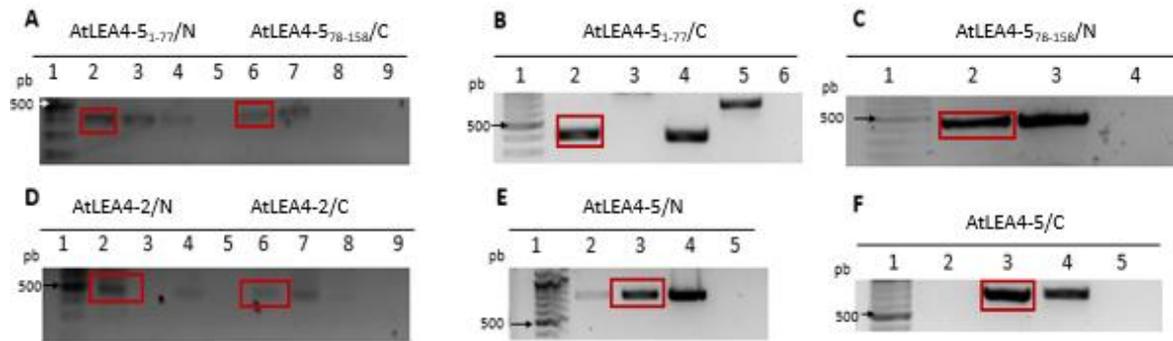


Figura 10. Verificación de las construcciones en los vectores pYFN o pYFC. Separación de los fragmentos obtenidos por PCR por electroforesis en geles de agarosa. A) En los carriles 2 - 4 se muestran los fragmentos obtenidos a partir del plásmido pYFN4-5₁₋₇₇, el carril 5 corresponde a su control negativo respectivo; los carriles 6 - 8 muestran los fragmentos obtenidos a partir de pYFC4-5₇₈₋₁₅₈, y el carril 9 corresponde a su control negativo. B) Los carriles 2 - 5 muestran los fragmentos obtenidos a partir de pYFC4-5₁₋₇₇ y el carril 6 es su control negativo. C) Los carriles 2 y 3 muestra los fragmentos amplificados a partir pYFN4-5₇₈₋₁₅₈ y el carril 4 muestra al control negativo. D) Los carriles 2 - 4 muestra los fragmentos amplificados a partir del pYFN4-2 y el carril 5 corresponde al control negativo; los carriles 6 - 8 muestran los fragmentos obtenidos a partir del pYFC4-2 y el control negativo se muestra en el carril 9. E) y F) En los carriles 3 y 4 se muestran fragmentos provenientes de pYFN4-5 y de pYFC4-5 respectivamente, y en los carriles 5 los controles negativos respectivos. Los recuadros rojos marcan la colonia que se seleccionó en cada caso.

En el caso de los ensayos de PCR a partir de las construcciones con los vectores SPYNE/SPYCE, se obtuvieron fragmentos de un tamaño aproximado de 700 pb para AtLEA4-5₁₋₇₇ y para AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈, y de 760 pb para AtLEA4-2 (Fig. 11). En todos los casos que aquí se muestran se demostró que las construcciones en los plásmidos destino contenían el fragmento del tamaño esperado. La identidad de los fragmentos en todos los casos se verificó por secuenciación de DNA; el análisis de las secuencias obtenidas demostró que los fragmentos se habían insertado correctamente y que las fusiones estaban en las fases de lectura adecuadas (Anexo 3).

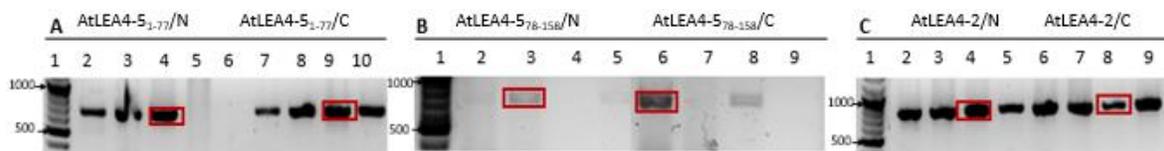


Figura 11. Verificación de las construcciones en SPYNE y SPYCE. Ensayos de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de colonia de las recombinaciones dentro de los vectores destino SPYNE y SPYCE. A) Carriles 2-5 SPYNE4-5₁₋₇₇, carril 6 control negativo de SPYNE/CE4-5₁₋₇₇, carriles 7-10 SPYCE4-5₁₋₇₇. B) Carriles 2-5 SPYNE4-5₇₈₋₁₅₈, carriles 6-8 SPYCE4-5₇₈₋₁₅₈, carril 9 control negativo de SPYNE/SPYCERC. C) Carriles 2-5 SPYNE4-2, carriles 6-9 SPYCE4-2. Los recuadros rojos señalan las colonias seleccionadas.

Con el fin de no dejar duda sobre la orientación de las inserciones en los vectores destino pYFN o pYFC, las construcciones se verificaron también por digestión con la enzima *Eco321* (Thermo Fisher). Al separar los productos de las reacciones en geles de agarosa se obtuvieron las tres bandas esperadas en el caso de los vectores vacíos (Fig. 12, carriles 7 y 11). En el caso de la inserción de cualquiera de los fragmentos AtLEA4 en el vector pYFN, desaparece la segunda banda que corresponde a un fragmento de 3,566 pb, consistente con la presencia de una alteración de este, en tanto que las bandas correspondientes a fragmentos de 6,060 pb y de 2,625 pb se mantienen. En el caso de la inserción de AtLEA4-5₁₋₇₇ y de AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ se generó una banda de ~2,350 pb (Fig. 12, carriles 2 y 3); cuando ocurrió la inserción de los fragmentos codificantes de AtLEA4-2 y de AtLE4-5, las bandas obtenidas fueron de ~2,590 pb (Fig. 12, carril 4) y de ~2,620 pb (Fig. 12, carril 5), respectivamente. Para el caso de las inserciones en el vector pYFC de los fragmentos AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ se obtuvo una banda de 2,150 pb (Fig. 12, carriles 7 y 8, respectivamente), para la inserción de la secuencia codificante de AtLEA4-2 la banda obtenida mostró un tamaño de 2,380 pb (Fig. 12, carril 9), en tanto que cuando la secuencia completa de AtLEA4-5 se encontró en este vector, la banda generada fue de 2,410 pb (Fig. 12, carril 10).

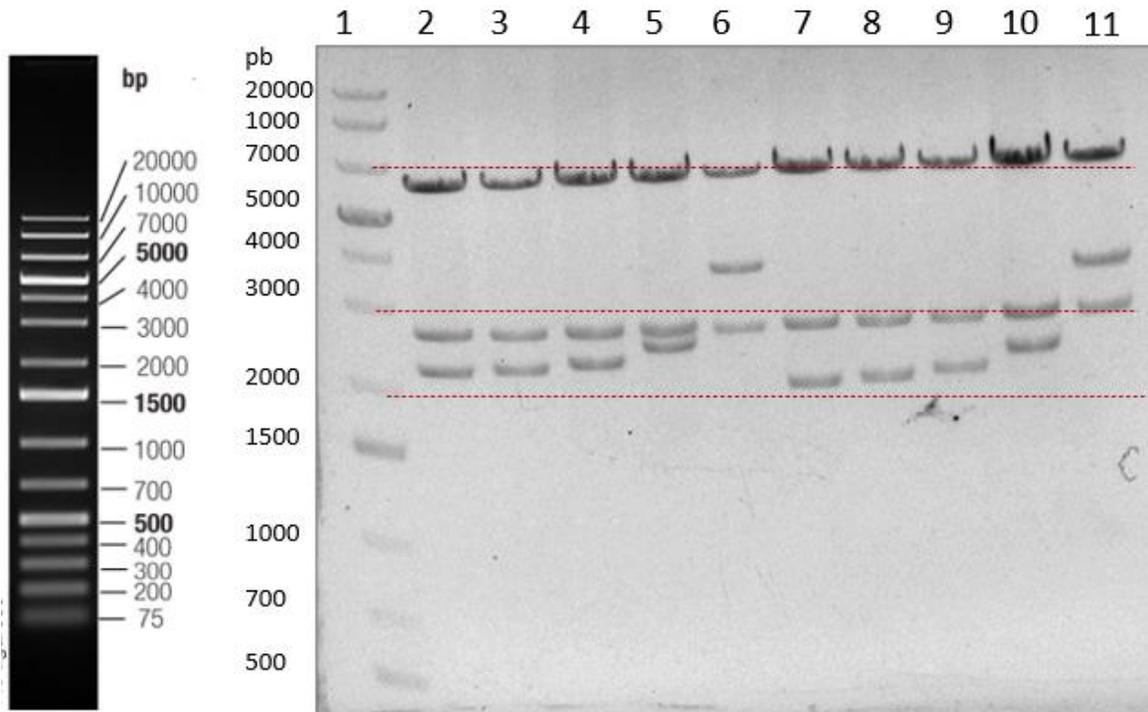


Figura 12. Verificación de la inserción de los fragmentos de interés en los vectores pYFN y pYFC mediante digestiones con enzimas de restricción. Los productos de cada una de las reacciones de restricción con *Eco321*, se separaron en un gel de agarosa al 1%. Los carriles 2 - 5 corresponden a los patrones de restricción obtenidos de las construcciones pYFN4-5₁₋₇₇, pYFN4-5₇₈₋₁₅₈, pYFN4-5, pYFN4-2; el carril 6 muestra el patrón para el vector vacío. Los carriles 7 - 10 corresponden a los patrones de restricción obtenidos de las construcciones pYFC4-5₁₋₇₇, pYFC4-5₇₈₋₁₅₈, pYFC4-5, pYFC4-2; el carril 11 muestra el patrón para el vector vacío. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño, mientras las líneas rojas permiten ubicar el tamaño del fragmento. A la izquierda se colocó como referencia la imagen del marcador SM1331 dada por el proveedor Thermo Fisher.

Producción de transformantes transitorias de hojas de *N. benthamiana* y obtención de fotografías

Transformación de *A. tumefaciens* GV3010 y verificación de las bacterias transformadas

Una vez verificadas las construcciones en los vectores adecuados para el análisis de interacción homotípica entre cada una de las proteínas de interés, se introdujeron en *A. tumefaciens* por transformación, como se describe en materiales y métodos. Las bacterias transformadas se seleccionaron con los marcadores correspondientes y la identidad de los plásmidos en cada caso se verificó por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos adecuados para cada plásmido. Los resultados

obtenidos se muestran en la figura 13, en donde se puede apreciar que el tamaño de los fragmentos es el esperado. Cabe hacer notar que las construcciones SPYNE4-5 y SPYCE4-5 fueron donadas por P. S. Romero.

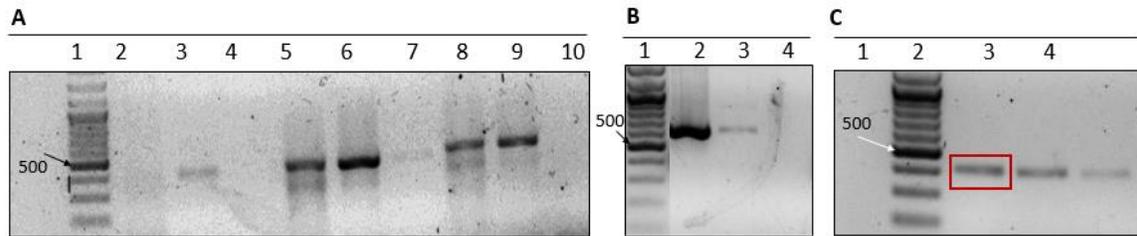


Figura 13. Verificación de la identidad de los plásmidos introducidos por transformación en *A. tumefaciens*. A) Los carriles 2-3 muestran los fragmentos AtLEA4-5₁₋₇₇ obtenidos en pYFN y pYFC, respectivamente; el carril 4 corresponde a su control negativo; los carriles 5 y 6 muestran a los fragmentos AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ en los vectores pYFN y pYFC, respectivamente; el carril 7 corresponde a su control negativo; los carriles 8 y 9 muestran al fragmento correspondiente a AtLEA4-2 en pYFN y pYFC, respectivamente, y el carril 10 contiene a la muestra del control negativo. B) Carriles 2, 3 y 4 muestran los fragmentos correspondientes al fragmento AtLEA4-5 proveniente de pYFN y pYFC y al control negativo, respectivamente. C) Carril 2-4 son los fragmentos de pYFN4-5₁₋₇₇.

Los productos de PCR de las construcciones dentro del vector SPYNE tienen un tamaño aproximado de 1000 pb, mientras que las construcciones en el vector SPYCE son de cerca de 700 pb para AtLEA4-5₁₋₇₇ y AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ y de 810 pb en AtLEA4-2 y AtLEA4-5 (Fig. 14), concordando con lo esperado.

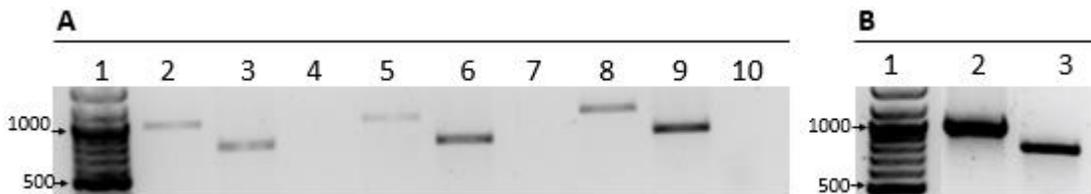


Figura 14. Verificación de la transformación de *A. tumefaciens* con las construcciones dentro de los vectores SPYNE y SPYCE. A) Los carriles 2-3 representan los fragmentos obtenidos de SPYNE4-5₁₋₇₇ y SPYCE4-5₁₋₇₇, mientras el carril 4 es su control negativo respectivo, los carriles 5 y 6 corresponden a los fragmentos de SPYNE4-5₇₈₋₁₅₈ y SPYCE4-5₇₈₋₁₅₈ con el carril 7 como negativo, los carriles 8 y 9 pertenecen a SPYNE4-2 y SPYCE4-2 con su control negativo en el carril 10. B) Los carriles 2 y 3 representan los fragmentos de SPYNE4-5 y SPYCE4-5.

Transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*

Para abordar el segundo y tercer objetivo de este proyecto, las bacterias de *A. tumefaciens* conteniendo los plásmidos con las construcciones verificadas se utilizaron para llevar a cabo la transformación transitoria de hojas de *N.*

benthamiana. Este método ha sido ampliamente aplicado como una de las técnicas para determinar la interacción física *in vivo* de diferentes proteínas o fragmentos de estas, ya sea con ellas mismas (homotípica) o con otras (heterotípica). Como se describe en la sección de materiales y métodos, cada uno de los cultivos de células de *A. tumefaciens* con las construcciones descritas (Tabla 5) se infiltró en hojas de *N. benthamiana* y, después del período indicado, las hojas se sometieron a observación de fluorescencia en un microscopio confocal. En el caso de que las proteínas fusionadas con las regiones complementarias de la YFP se asociaran entre sí, se esperaría la reconstitución de la funcionalidad de la YFP y, por tanto, la emisión de fluorescencia en aquellas células vegetales en las que, al menos, dos plásmidos con las construcciones complementarias hubiesen penetrado y expresado las proteínas de fusión correspondientes.

Análisis de las hojas transformadas

Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agro-infiltradas con la mezcla pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5 o pYFN-AtLEA4-2/pYFC-AtLEA4-2

Los tres eventos de agro-infiltración de las hojas de *N. benthamiana* con las mezclas pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5 ó pYFN-AtLEA4-2/pYFC-AtLEA4-2 mostraron una clara señal fluorescente, indicando que las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 interaccionan consigo mismas en las condiciones normales de estas células vegetales, es decir, sin someterse a ningún tipo de estrés (Fig. 15). La señal de fluorescencia detectada en la mayoría de las hojas transformadas con la mezcla pYFN-AtLEA4-2/pYFC-AtLEA4-2 fue mayor que la obtenida en las hojas agro-infiltradas con la mezcla pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5 (Fig. 15). Por tanto, estos resultados sugieren fuertemente que las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 pueden interaccionar consigo mismas en un ambiente celular normal.

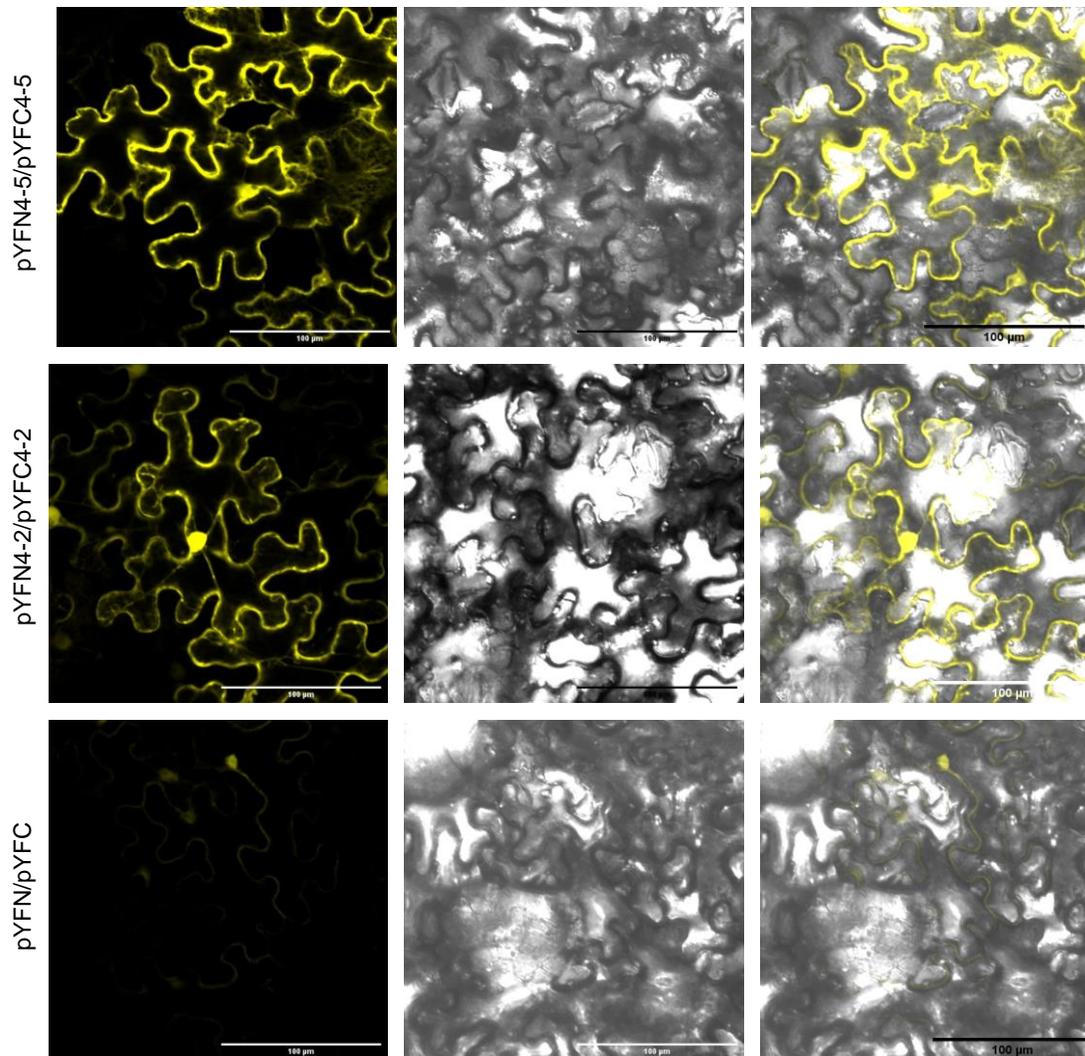


Figura 15. Complementación de la fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones pYFN-4-5/pYFC-4-5 ó pYFN -4-2/ pYFN -4-2. En esta figura se muestran imágenes representativas de cuatro eventos de agro-infiltración, once hojas diferentes en total. La primera fila corresponde a hojas transformadas con pYFN-4-5/pYFC-4-5; en tanto que la segunda fila muestra la fluorescencia detectada en hojas transformadas con la mezcla pYFN-4-2/pYFC-4-2. La tercera fila corresponde al control negativo, en el cual se agro-infiltró la mezcla de los vectores vacíos utilizados pYFN/pYFC. Columna de izquierda a derecha, fluorescencia, campo claro y superposición de campo claro y fluorescencia. Escala de 100 µm.

Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agroinfiltradas con la mezcla pYFN-AtLEA4-5/pYFC-AtLEA4-5, pYFN-AtLEA4-5₁₋₇₇/pYFC-AtLEA4-5₁₋₇₇ ó pYFN-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈/pYFC-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈

Con la finalidad de determinar cuáles regiones de la proteína AtLEA4-5, amino o carboxilo, participaban en la asociación con ella misma, el sistema BIFC se aplicó a construcciones que produjeran fusiones de YFP con la región amino, AtLEA4-5₁₋₇₇, o con la región carboxilo, AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈. Para ello, se utilizaron las mezclas pYFN-4-5/pYFC-4-5, pYFN-4-5₁₋₇₇/pYFC-4-5₁₋₇₇ y pYFN-4-5₇₈₋₁₅₈/pYFC-4-5₇₈₋₁₅₈ para agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana*. La mezcla pYFN-4-5/pYFC-4-5, al ser la proteína AtLEA4-5 completa, sirve de comparación con sus regiones expresadas de manera independiente.

El análisis de la fluorescencia en este experimento mostró que todas las muestras correspondientes a las mezclas pYFN-4-5₁₋₇₇/pYFC-4-5₁₋₇₇ y pYFN-4-5₇₈₋₁₅₈/pYFC-4-5₇₈₋₁₅₈ emitieron una señal de fluorescencia mayor a la registrada en los controles negativos (Fig. 16) e incluso, en algunos casos, similar a la obtenida con la mezcla pYFN-4-5/pYFC-4-5 (Fig. 16). Estos resultados indican que ambas regiones de la proteína AtLEA4-5 pueden interaccionar consigo mismas; sin embargo, dada la limitación intrínseca de este método, no fue posible determinar si la asociación es más o menos fuerte entre la región amino o entre la región carboxilo. Las imágenes sugieren que la interacción entre sí de la región amino AtLEA4-5₁₋₇₇ es muy similar a la que ocurre entre la proteína AtLEA4-5 completa, en tanto que la interacción de la región carboxilo AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ parece ser menor.

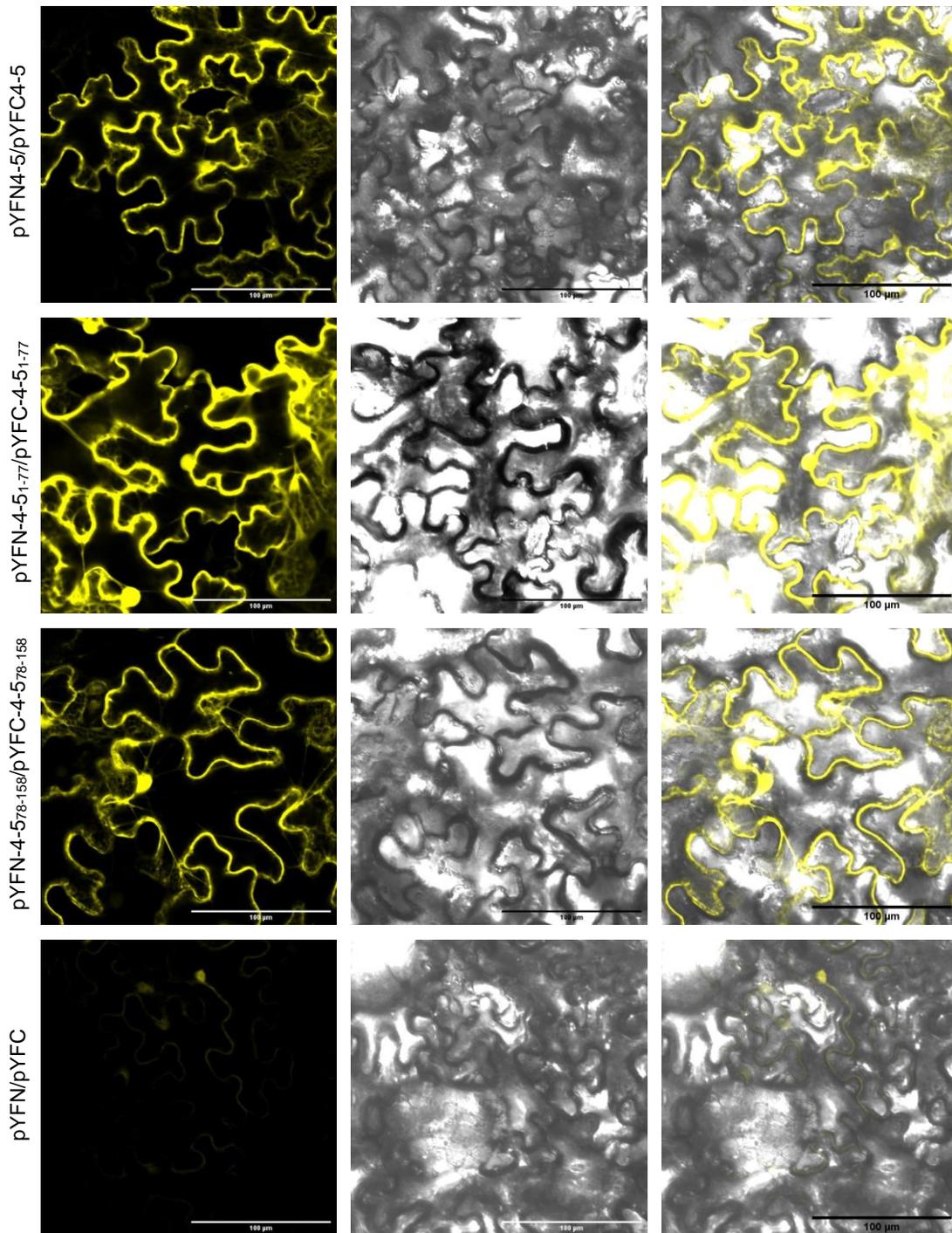


Figura 16. Complementación de la fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones pYFN-4-5/pYFC-4-5, pYFN-4-5¹⁻⁷⁷/pYFC-4-5¹⁻⁷⁷ y pYFN-4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸/pYFC-4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸. En esta figura se muestran imágenes representativas de cuatro eventos de agro-infiltración, once hojas diferentes que se obtuvieron en conjunto con las imágenes mostradas en la figura 15. La primera fila corresponde a las muestras de hojas transformadas con la mezcla pYFN-4-5/pYFC-4-5. La segunda fila muestra imágenes representativas de hojas transformadas con la mezcla pYFN-4-5¹⁻⁷⁷/pYFC-4-5¹⁻⁷⁷. La tercera fila corresponde a la mezcla pYFN-4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸/pYFC-4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸. La cuarta fila muestra imágenes representativas de controles negativos con la mezcla pYFN/pYFC. Columna de izquierda a derecha, fluorescencia, campo claro y señal de fluorescencia y campo claro superpuestos. Escala de 100 µm.

Observación de la complementación de la fluorescencia en hojas agro-infiltradas con la mezcla SPYNE-AtLEA4-5/SPYCE-AtLEA4-5 o SPYNE-AtLEA4-2/SPYCE-AtLEA4-2.

Para determinar si las fusiones en algunos de los extremos de las proteínas de interés tenían algún efecto en la asociación entre ellas, también se agro-infiltraron las construcciones en las que las regiones complementarias de la YFP (YFP^N o YFP^C) ahora se fusionaron al extremo carboxilo de las proteínas de interés. Como se describió antes, en este caso se utilizaron los vectores SPYNE (YFP^N) y SPYCE (YFP^C). En la figura 17 se muestra que en los experimentos con estas construcciones la emisión de fluorescencia fue menor que en los casos en los que se utilizaron los vectores pYFN y pYFC. La razón es que en el caso de los vectores pYFN y pYFC, la expresión de las proteínas de fusión está dirigida por dos promotores 35S en *tandem*; en tanto que en los vectores SPYNE y SPYCE, la expresión de las proteínas de fusión proviene de un solo promotor 35S.

Los resultados de la observación de las imágenes obtenidas a partir de los diferentes eventos de transformación de hojas de *N. benthamiana* con estas últimas construcciones mostraron que sólo se detectó emisión de fluorescencia cuando los vectores expresaban las proteínas AtLEA4-5 ó AtLEA4-2 en fusión con las regiones complementarias de la YFP en comparación con el control negativo; es decir, nuevamente se puede inferir que AtLEA4-5 puede interaccionar entre sí, lo mismo para la AtLEA4-2 (Fig. 17).

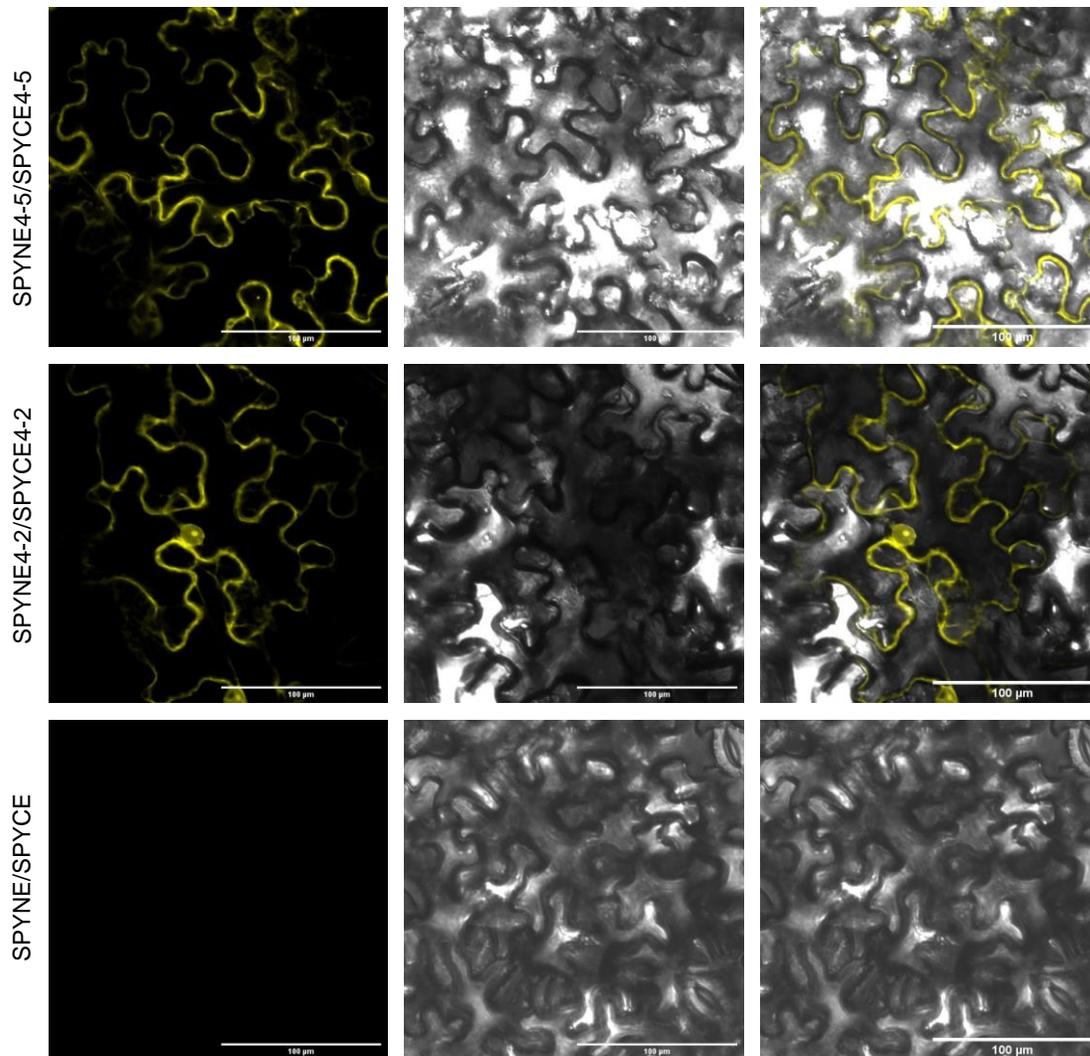


Figura 17. Complementación de la fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones SPYNE/SPYCE-4-5 ó SPYNE-4-2/SPYCE-4-2. En esta figura se muestran imágenes representativas de cuatro eventos de agro-infiltración, once hojas diferentes en total. La primera fila corresponde a hojas transformadas con SPYNE-4-5/SPYCE-4-5; en tanto que la segunda fila muestra la fluorescencia detectada en hojas transformadas con la mezcla SPYNE-4-2/SPYCE-4-2. La tercera fila corresponde al control negativo, en el cual se agro-infiltró la mezcla de los vectores vacíos utilizados SPYNE/SPYCE. Columna de izquierda a derecha, señal de fluorescencia, campo claro y señal de fluorescencia y campo claro superpuestos. Escala de 100 µm.

Complementación de fluorescencia con las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇ ó AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ expresadas en fusión con las regiones complementarias de la YFP en vectores SPY

Como en los casos anteriores, en donde las proteínas de fusión se expresaron de vectores tipo SPY, las mezclas con las construcciones SPYNE-4-5₁₋₇₇/SPYCE-4-5₁₋₇₇ mostraron una intensidad de fluorescencia similar (Fig.18), y en algunos casos un poco menor (anexo 4.2), a SPYNE4-5/SPYCE4-5 sugiriendo que existe una interacción entre AtLEA4-5₁₋₇₇/AtLEA4-5₁₋₇₇ consigo misma. En contraste, las muestras en donde se agro-infiltraron las hojas con la mezcla SPYNE-4-5₇₈₋₁₅₈/SPYCE-4-5₇₈₋₁₅₈, la señal de fluorescencia fue mucho más débil y difusa (Fig.18), al grado que en algunas muestras sólo se detectó el fondo como en el caso de los controles negativos (anexo 4.2). Estos datos indican que la región carboxilo de la proteína AtLEA4-5 (AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈) en estas construcciones tiene una interacción mucho más débil con ella misma bajo estas condiciones.

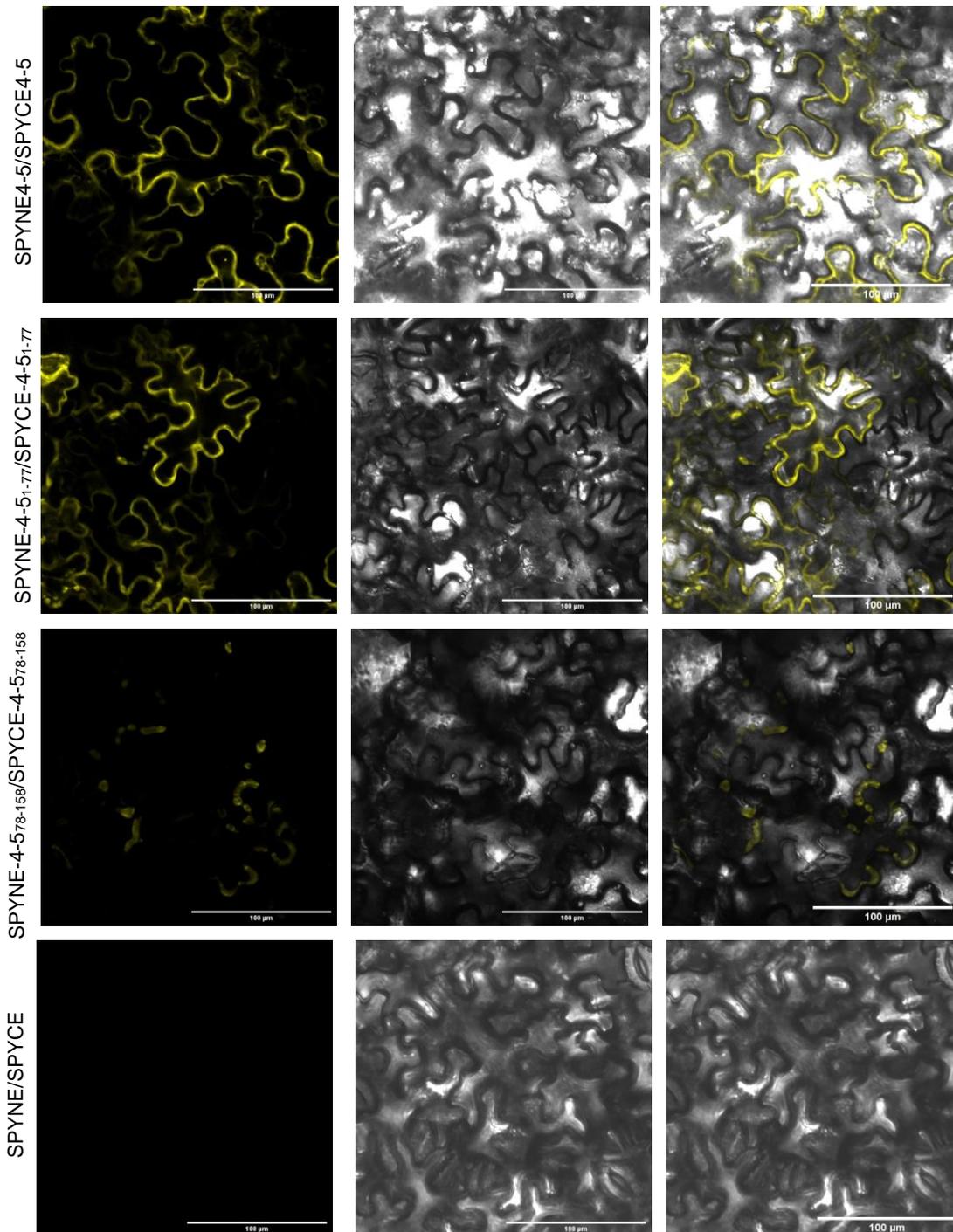


Figura 18. Complementación de la fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones SPYNE-4-5/SPYCE-4-5, SPYNE-4-5₁₋₇₇/SPYCE-4-5₁₋₇₇ y SPYNE-4-5₇₈₋₁₅₈/SPYCE-4-5₇₈₋₁₅₈. En esta figura se muestran imágenes representativas de cuatro eventos de agro-infiltración, once hojas diferentes obtenidas en conjunto con las imágenes de la figura 17. La primera fila corresponde a las muestras de hojas transformadas con la mezcla SPYNE-4-5/SPYCE-4-5. La segunda fila muestra imágenes representativas de hojas transformadas con la mezcla SPYNE-4-5₁₋₇₇/SPYCE-4-5₁₋₇₇. La tercera fila corresponde a la mezcla SPYNE-4-5₇₈₋₁₅₈/SPYCE-4-5₇₈₋₁₅₈. La cuarta fila muestra imágenes representativas de controles negativos con la mezcla SPYNE/SPYCE. Columna de izquierda a derecha, fluorescencia, campo claro y señal de fluorescencia y campo claro superpuestos. Escala de 100 μ m.

DISCUSIÓN

¿Las proteínas LEA son capaces de interactuar consigo mismas *in vivo*? Es la pregunta principal de este proyecto y sobre la cual se ha trabajado anteriormente en el laboratorio. El interés sobre las proteínas LEA surge al ser proteínas que se acumulan en diferentes estadios del desarrollo de las plantas ante baja disponibilidad de agua. Posteriormente, se reportaron diversos trabajos sobre su actividad *in vitro*, como la atribución de proteger la integridad de membranas biológicas, la prevención de la inactivación de enzimas reporteras en tratamientos de deshidratación parcial o congelamiento-descongelamiento y la capacidad de unir cationes divalentes (French-Pacheco, *et al.*, 2018). Además, la característica de ser proteínas intrínsecamente desordenadas despertó el interés de conocer cuál es el mecanismo de acción por el que ejercen su actividad protectora *in vitro* (Hara, *et al.*, 2005; Battaglia, *et al.*, 2008; Reyes, *et al.*, 2008; Koag, *et al.*, 2009).

Existe evidencia que indica que las proteínas LEA del grupo 2 tienen la capacidad de formar homo y heterodímeros (Hernández-Sánchez, *et al.*, 2017), mientras que las proteínas LEA del grupo 6 son capaces de homo-oligomerizar (Rivera-Nájera, *et al.*, 2014). Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron la formación de posibles homo-dímeros de proteínas LEA del grupo 4 a partir de extractos de proteínas totales obtenidos de semillas secas. Asimismo, entrecruzamientos *in vitro* de proteínas LEA4 mostraron la capacidad de estas proteínas para formar homo-oligómeros. Estos y otros datos publicados, llevaron a proponer un mecanismo de acción para las proteínas LEA, en el cual estas interactúan con sus proteínas blanco, en relaciones molares bajas durante condiciones de deficiencia moderada de agua; sin embargo, se considera que cuando la deshidratación llega a ser severa, se podría requerir un mayor número de proteínas LEA por molécula activa de la proteína cliente, suponiendo entonces que, en estas condiciones, se podrían requerir oligómeros de las proteínas LEA. En este punto, cabe destacar que datos ya publicados muestran que la presencia de estas proteínas está íntimamente relacionada con condiciones de baja disponibilidad de agua, y demuestran que las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 se pliegan en una conformación tipo alfa-hélice

cuando existe un elevado amontonamiento macromolecular y/o baja disponibilidad de agua *in vitro* (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2016). También sabemos que la región capaz de estructurarse (AtLEA4-5₁₋₇₇) mantiene la actividad de proteger la enzima blanco en ensayos de deshidratación y, no así, la región que se mantiene desordenada (AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈) (Cuevas-Velázquez, *et al.* 2016). Estas observaciones indican que la conformación de estas proteínas cambia dependiendo de la condición ambiental en la que se encuentren, y sugieren que estos cambios conformacionales se requieren para modular su actividad protectora, así como para favorecer la formación de oligómeros.

Aun cuando plantas que carecen de alguna de las proteínas LEA4 muestran una menor tolerancia a la limitación de agua que las plantas silvestres, a la fecha no ha sido posible corroborar totalmente *in vivo* el modelo propuesto, debido a la dificultad de controlar las condiciones ambientales y determinar los cambios estructurales. Por tanto, aunque las condiciones simuladas en los ensayos *in vitro* pueden no ser una buena aproximación a lo que realmente sucede en un contexto celular, debido a las limitaciones técnicas y experimentales que solo permiten manejar un número muy limitado de variables y a la falta de más información estructural de las proteínas mismas, es posible abordar *in vivo* al menos algunas de las preguntas y obtener diferentes piezas del rompecabezas que en un momento dado se podrían ensamblar.

Entre las observaciones que cabe resaltar está el hecho de que la única condición en la que se ha detectado que estas proteínas están desordenadas, o en donde presentan mayor flexibilidad estructural, es en soluciones acuosas *in vitro*; no obstante en el citoplasma existe un amontonamiento macromolecular que restringe el movimiento de las macromoléculas que ahí se encuentran, y dada la enorme cantidad de compuestos que constituyen el citosol, la disponibilidad de agua es menor que cuando las proteínas están en solución *in vitro* (Zhou, *et al.*, 2008; Yuan, *et al.*, 2008). Esto nos redirige a la idea de que *in vivo* las proteínas podrían estar en conformaciones diversas, con más o menos estructura, en diferentes regiones,

dependiendo de la condición ambiental local en la que se encuentren (Dedmon, *et al.*, 2002), además de otros factores como son, por ejemplo, los cambios en pH y en la concentración de iones, las modificaciones post-traduccionales, etc. (Flaugh & Lumb, 2001; Qu & Bolen, 2002). Es por ello, que consideramos relevante contar con datos *in vitro* e *in vivo*, para tener información que nos permita obtener información complementaria y con ello plantear nuevas hipótesis y avanzar en el conocimiento de este fenómeno particular. Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, contamos con datos de experimentos realizados *in vitro*, utilizando entrecruzamiento inducido por luz, en los que se detectó la formación de homooligómeros para las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 (Romero-Pérez *et al.*, en preparación); sin embargo, si la proteína estaba en solución acuosa, no fue posible detectar los oligómeros en ninguna condición, sugiriendo que la afinidad es muy baja entre estas moléculas, y/o que sólo muy pocas moléculas se encuentran en la conformación apropiada. De ahí que la aplicación de la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) resultó la estrategia a seguir, puesto que, además, es un método rápido, sencillo y que permite conocer las interacciones entre proteínas de interés *in vivo*. Los vectores que utilicé en este trabajo fusionan a la proteína de interés con una YFP que una vez que ocurre la interacción entre sus fragmentos complementantes, esta asociación es irreversible, de tal forma que si bien el sistema permite encontrar interacciones, no discrimina entre interacciones estables y transitorias. Se han desarrollado nuevos vectores para mejorar las interpretaciones que se lleguen a obtener con este sistema (Grefen, *et al.*, 2012), sin embargo, eso quedará como perspectiva de otro proyecto.

Los resultados obtenidos en esta tesis utilizando el sistema BiFC-YFP, demostraron que las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 son capaces de formar homooligómeros, o de interactuar homotípicamente. En ambos casos se detectó una alta señal de fluorescencia, sin que se pueda afirmar con rigurosidad si la interacción es diferente entre ellas. Aun cuando el control negativo que se usó para estos experimentos fue los vectores vacíos, que podrían presentar el inconveniente de generar falsos positivos ocasionados por el autoensamble de las dos mitades de YFP, los datos

que obtuve muestran que, si acaso se presenta este fenómeno, ocurre en una proporción realmente baja, pues la señal de fluorescencia en muchos casos es prácticamente indetectable. Durante los experimentos con los vectores PYFN y PYFC se registró una ligera señal de fondo en los controles negativos (Fig. 15, Fig. 16, Anexo 4.1), menor que la que se detectó en las muestras que expresaban las proteínas LEA. Por lo que respecta a los controles negativos de SPYNE/SPYCE, no se observó fluorescencia en ninguna muestra, posiblemente debido a que en estos vectores la expresión es más baja ya que depende de un solo promotor 35S, y no de dos, como en el caso anterior (Walter, *et al.*, 2004; Kudla & Bock, 2016).

Cabe mencionar que se han generado mutaciones puntuales en algunas proteínas fluorescentes para reducir el autoensamblaje dentro del sistema BiFC; pero estas sólo se han utilizado en células de animales y no han sido implementadas ni optimizadas en modelos vegetales (Horstman, *et al.*, 2014; Kudla & Bock, 2016). También se ha recomendado utilizar como controles negativos proteínas no interactoras previamente corroboradas evitando el auto-ensamblaje o mutantes de las proteínas de interés que hubiesen perdido tal propiedad para demostrar la confiabilidad del sistema (Kudla & Bock, 2016); sin embargo, dado los resultados obtenidos en este proyecto, se consideró que esto no era necesario utilizar alguna de las opciones mencionadas anteriormente. Aunque, queda como perspectiva el uso de mutantes de proteínas LEA con el fin de determinar zonas implicadas en su auto-asociación, y, así encontrar un mejor control negativo para el sistema.

Desventajas inherentes al sistema BiFC son la interacción entre diferentes proteínas o entre variantes de alguna de ellas. Entre estas, está el hecho de que la transformación transitoria genera la expresión de las proteínas a partir de células transformadas con variabilidad en el número de vectores ingresados, generando expresión diferencial en cada célula; también se desconoce si las proteínas en todos los casos poseen la misma estabilidad, por lo que sería necesario corroborar los niveles de las proteínas de fusión correspondientes y, en cada región seleccionada habrá diferente número de células transformadas. Todo ello, denota la necesidad

de contar con un sistema que permita una cuantificación confiable. Esta meta se persiguió con el diseño de vectores que consideran el uso de un segundo fluoróforo que indique la eficiencia de transformación para hacer, al menos, esta normalización (Grefen & Blatt, 2012; Kodama & Hu, 2013; Boevink, *et al.*, 2014).

En cuanto a las combinaciones ensayadas en este trabajo, cabe remarcar el uso de un vector con la YFP en la posición N-terminal y otro con la YFP en el C-terminal con el fin de evitar un posible impedimento estérico de la YFP entre los monómeros de las proteínas AtLEA y/o una inhibición en la reconstitución de la YFP (Brachardori, *et al.*, 2004). Entre estas combinaciones, solamente se observó una diferencia notable entre las construcciones pYFN-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈/ pYFC-AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ y SPYNE- AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈/SPYCE- AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈, en donde esta última mostró muy baja fluorescencia. Esto se podría explicar por un efecto estérico que la posición de la YFP en las proteínas de fusión pudiera tener sobre la interacción de las proteínas. Por otro lado, también debe considerarse que los vectores SPYNE/SPYCE cuentan con un promotor 35S menos en comparación con los vectores PYFN/PYFC, lo cual puede afectar significativamente los niveles de expresión de las proteínas reflejándose en los niveles de interacción detectados

Como se expuso antes, se consideró explorar la capacidad de auto-asociación de las regiones amino (AtLEA4-5₁₋₇₇) y carboxilo (AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈) de la AtLEA4-5, de manera independiente, para tener una idea de si la interacción entre los monómeros de esta proteína ocurre por asociación entre las dos regiones. Puesto que la fluorescencia es significativamente mayor en todas las muestras que se analizaron para este caso, al compararlas con las que incluían a la región carboxilo, se deduce que *in vivo* la región amino es más afín entre sí o que este polipéptido es más estable que el polipéptido correspondiente a la región carboxilo. Estos resultados también sugieren y apoyan la idea de que la conformación que la proteína pudiera adoptar en la célula, en donde hay mayor amontonamiento macromolecular, favorece la auto-asociación de la región amino, para la que se demostró anteriormente que existe una ganancia gradual de conformación tipo alfa-hélices

tras un incremento en esta condición ambiental (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2016). Efecto que no ocurre para la región carboxilo, la cual se mantiene desordenada. Esta observación es consistente con la formación de contactos poco estables entre esta región, como se ha reportado para otras regiones y proteínas desordenadas (Dunker, *et al.*, 2005; Singh, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2008). Incluso cuando la asociación entre las mitades de la YFP no es reversible, la intensidad de la fluorescencia puede reflejar la afinidad entre las regiones de las proteínas en estudio, entre más afines y/o estables sean las interacciones más favorecerán la cercanía y la asociación de las mitades de la YFP y la posterior recuperación de su capacidad para emitir fluorescencia (Hu, *et al.*, 2002; Morell, *et al.*, 2007; Shyu & Hu, 2008).

Por otro lado, a pesar de que las condiciones en las que se expresaron estas proteínas no fueron de déficit hídrico, las condiciones normales de disponibilidad de agua y amontonamiento molecular en la célula son, sin duda, mayores que las condiciones de una solución acuosa y, por tanto, pudieron ser suficientes para favorecer la interacción homotípica de las proteínas LEA del grupo 4. También habría que considerar que las proteínas están en niveles altos debido a su sobreexpresión a partir del promotor 35S. Al ser el déficit hídrico un factor importante en la acumulación y actividad de las proteínas LEA4, habrá que tomar en cuenta que bajo limitación de agua estas dos condiciones ambientales están más exacerbadas, por lo que podrían favorecer aún más su interacción.

Hay por lo menos tres maneras distintas, no excluyentes, que podrían ajustarse a este modelo. Una de ellas involucraría el contacto directo entre la región capaz de estructurarse del oligómero y el blanco; la segunda opción implicaría la interacción entre solamente las regiones desordenadas y el blanco, y la tercera opción involucraría el contacto directo de la proteína completa con el blanco. Todas estas opciones cabrían si la proteína LEA formara dímeros. La posibilidad de que la protección de una proteína cliente ocurra por el mecanismo conocido como 'escudo

molecular, implica que no existiría una interacción directa proteína-proteína, pero podría ocurrir bajo condiciones en las que la deshidratación fuera muy severa, en donde las proteínas blanco podrían sufrir mayores cambios conformacionales provocados por el estrés impuesto, lo que requeriría un mayor número de moléculas protectoras por proteína funcional para evitar la desnaturalización y consecuente pérdida de actividad de la proteína cliente. También es importante considerar que la oligomerización de las proteínas LEA podría estar relacionada con otras funciones o propiedades de estas proteínas, como su estabilidad en la célula, evitando su degradación.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de protección *in vitro* indican que la protección de la enzima LDH por proteínas LEA, incluyendo las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2, ocurre en relaciones molares bajas LEA:LDH; es decir, pocas moléculas de proteínas LEA por molécula funcional de LDH (tetramero) (Cuevas-Velázquez, *et al.*, 2016). Esto sugiere que las proteínas AtLEA4 podrían ejercer protección sobre su blanco interaccionando con éste, similar al mecanismo de protección para las chaperonas moleculares. Acorde con ello, este mecanismo da cabida a que las proteínas LEA4 protejan en forma oligomérica.

Otros casos de proteínas LEA en los que se ha detectado la formación de oligómeros, *in vitro* e *in vivo*, involucran a la proteína Cor15am, la cual presenta actividad crioprotectora y es capaz de formar homo-oligómeros durante el proceso de aclimatación al frío en plantas (Nakayama *et al.*, 2007); a la proteína PvLEA6 de *Phaseolus vulgaris*, la cual se acumula abundantemente en respuesta a condiciones de déficit hídrico (Rivera-Nájera, *et al.*, 2008); la proteína PM1 de soya, cuya formación de oligómeros se promueve por altas concentraciones de Cu^{2+} (Liu *et al.*, 2017); se han detectado homo- y hetero-oligómeros en algunas dehidrinas como COR85 de espinaca (Kazuoka & Ueda, 1994), AtCOR47, AtERD10 y AtRAB18, y entre ellas (Hernández-Sánchez *et al.*, 2017); las proteínas ASR (ABA Stress Ripening), proteínas LEA del grupo 7, adquieren estructura y forman homo-dímeros tras unirse a iones Zn^{2+} (Goldgur, *et al.*, 2007).

A pesar de que se ha descrito la formación de oligómeros para algunas familias de proteínas LEA, su función aún se desconoce. Para las proteínas LEA del grupo 4 se podrían proponer algunos escenarios para el posible mecanismo de acción de estas proteínas en el que se consideren estos ensamblajes estructurales. Uno de ellos sería que este ensamblaje ocurre bajo condiciones ambientales determinadas, por ejemplo, el dímero se forma cuando la deficiencia de agua rebasa cierto umbral que favorece cambios conformacionales en la proteína que, a su vez, promueven su auto asociación; otra posibilidad es que ambas formas sean funcionales, y que en cada caso el mecanismo de acción sea diferente; otro escenario posible es que esta proteína se asocie en dímeros solo para evitar su degradación, y que la forma monomérica sea la activa; también sería posible que el dímero sea una forma intermedia de asociación que podría promover la formación de coacervados bajo ciertas condiciones de estrés.

Desafortunadamente, por ahora no contamos con la información necesaria para asignar una función particular para las estructuras cuaternarias de las proteínas LEA4. Estas alternativas ponen en evidencia la relevancia de los datos obtenidos en este trabajo, pues se demostró que las proteínas LEA4 de *A. thaliana* forman dímeros *in vivo*, lo cual complementa los datos obtenidos de los entrecruzamientos *in vitro* por Romero-Pérez en su tesis doctoral, donde existe formación de oligómeros en las proteínas AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5^{1.77} y AtLEA4-5⁷⁸⁻¹⁵⁸ (Fig. 7), lo que permite plantear que estas proteínas se encuentran en su conformación más flexible y como monómeros cuando están en solución acuosa; en tanto que, cuando aumenta el amontonamiento macromolecular y/o disminuye la disponibilidad de agua, las proteínas LEA4 adquieren estructura, mayoritariamente tipo alfa-hélice, lo que favorece la formación de dímeros.

Los datos de este trabajo indican que estas condiciones se llegan a presentar en las células aún sin que se sometan a un estrés. También se obtuvo información que sugiere fuertemente que la región amino de la proteína AtLEA4-5 es la que genera asociaciones más estables y/o afines, pero que la región carboxilo también participa

en este ensamble. Recordando que la región amino es la región más conservada en esta familia de proteínas, y la que muestra una mayor propensión a conformarse en alfa-hélice bajo ciertas condiciones ambientales. En conjunto, el trabajo en esta tesis contribuye a un mayor y mejor conocimiento de las características estructurales de las proteínas en esta familia, que se consideran como un buen modelo para el estudio de proteínas intrínsecamente desordenadas en plantas, particularmente de aquellas que participan en la respuesta de estos organismos a condiciones ambientales adversas.

CONCLUSIONES

- Las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* son capaces de interactuar homotípicamente *in vivo* en condiciones estándar.
- La región capaz de estructurarse (AtLEA4-5₁₋₇₇) y la región desordenada (AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈) de la AtLEA4-5 son capaces de interactuar homotípicamente *in vivo*, concordando con lo reportado *in vitro*.
- Se observó una diferencia en la intensidad de fluorescencia de la interacción homotípica de AtLEA4-5₁₋₇₇ y la de AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈, sugiriendo una mayor predisposición o afinidad de interacción en la región amino, capaz de estructurarse, en comparación con la región carboxilo que tiende a mantenerse en desorden.

La técnica BiFC es suficiente para un primer acercamiento de las interacciones de proteínas en un sistema *in vivo*, ya que brinda información tanto de posibles interactores como de localización subcelular. Finalmente, la posición de la proteína fluorescente en las fusiones tradicionales no mostró tener un gran efecto en las interacciones de las proteínas LEA del grupo 4 utilizadas, exceptuando la proteína AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈ para la cual se sugiere realizar otros experimentos para corroborar su aparente interacción homotípica débil.

PERSPECTIVAS

Al requerirse una técnica complementaria para cuantificar la variación de interacción de las regiones mencionadas y con el fin de discernir entre regiones más pequeñas involucradas en la interacción proteína-proteína de la LEA4-5 que las trabajadas en este proyecto, se propone utilizar la técnica de rBiFC *in vivo*, en la cual solo se requiere un vector donde se insertan los 2 genes de proteínas de interés junto con las fracciones de la YFP (para complementarse) y la RFP a fin de normalizar la señal de fluorescencia observada, para cuantificar el grado de interacción de proteínas mutantes de LEA4-5, así como su estabilidad; también se sugiere el utilizar proteínas LEA de otras familias que se coexpresan bajo las mismas condiciones que la familia 4 con el objetivo de conocer interacciones heterotípicas intermoleculares. Y, a mediano plazo, probar las construcciones anteriores de rBiFC en un sistema capaz de ser sometido a estrés hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

- Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C., & Thomashow, M. F. (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(23), 13404-13409
- 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.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., ... Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, *7*(10).
- Belott, C., Janis, B., & Menze, M. A. (2020). Liquid-liquid phase separation promotes animal desiccation tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(44), 27676-27684.
- Boevink P., McLellan H., Bukharova T., Engelhardt S., Birch P. (2014) In Vivo Protein–Protein Interaction Studies with BiFC: Conditions, Cautions, and Caveats. In: Birch P., Jones J., Bos J. (eds) Plant-Pathogen Interactions. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1127. Humana Press, Totowa, NJ
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., & Ohad, N. (2004). Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*, *40*(3), 419-427
- Brasileiro, A. C. M., & Carneiro, V. D. C. (1998). Manual de transformação genética de plantas. *Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen*
- Cuevas-Velazquez, C. L., Rendón-Luna, D. F., & Covarrubias, A. A. (2014). Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins. *Frontiers in plant science*, *5*, 583.
- Cuevas-Velazquez, L., Saab, G.-R., Reyes, L., & Covarrubias, A. (2016). The unstructured N-terminal region of *Arabidopsis* group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA) is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(20), 0.
- Cuevas-Velazquez, C. L., & Dinneny, J. R. (2018). Organization out of disorder: liquid–liquid phase separation in plants. *Current opinion in plant biology*, *45*, 68-74.
- Chakrabortee, S., Tripathi, R., Watson, M., Kaminski Schierle, G. S., Kurniawan, D. P., Kaminski, C. F., ... Tunnacliffe, A. (2012). Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular BioSystems*, *8*(1), 210–219.
- Chou, K. C., & Shen, H. B. (2010). Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS one*, *5*(6)
- 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 stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiology*, *120*(1), 93-104.
- de Luna-Valdez, L. A., Villasenor-Salmeron, C. I., Cordoba, E., Vera-Estrella, R., Leon-Mejia, P., &

- Guevara-Garcia, A. A. (2019). Functional analysis of the Chloroplast GrpE (CGE) proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 293-306.
- Dedmon, M. M., Patel, C. N., Young, G. B., & Pielak, G. J. (2002). FlgM gains structure in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12681-12684
- Dignon, G. L., Zheng, W., & Mittal, J. (2019). Simulation methods for liquid-liquid phase separation of disordered proteins. *Current opinion in chemical engineering*, 23, 92-98.
- Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M., & Uversky, V. N. (2005). Flexible nets: the roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *The FEBS journal*, 272(20), 5129-5148
- Dure, L., & Galau, G. A. (1981). Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins. *Plant physiology*, 68(1), 187-194.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H. D., 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), 475-486.
- Fancy, D. A., Denison, C., Kim, K., Xie, Y., Holdeman, T., Amini, F., & Kodadek, T. (2000). Scope, limitations and mechanistic aspects of the photo-induced cross-linking of proteins by water-soluble metal complexes. *Chemistry & biology*, 7(9), 697-708.
- Flaugh, S. L., & Lumb, K. J. (2001). Effects of macromolecular crowding on the intrinsically disordered proteins c-Fos and p27Kip1. *Biomacromolecules*, 2(2), 538-540
- French-Pacheco, L., Cuevas-Velazquez, C. L., Rivillas-Acevedo, L., Covarrubias, A. A., & Amero, C. (2018). Metal-binding polymorphism in late embryogenesis abundant protein AtLEA4-5, an intrinsically disordered protein. *PeerJ*, 6, e4930.
- Fields, S., & Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*, 10(8), 286-292.
- Galau, G. A., Hughes, D. W., & Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 7(3), 155-170.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5668-5674.
- Grefen, C., & Blatt, M. R. (2012). A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *Biotechniques*, 53(5), 311-314
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Graether, S. P., & Jiménez-Bremont, J. F. (2017). In vivo evidence for homo- and heterodimeric interactions of *Arabidopsis thaliana* dehydrins AtCOR47, AtERD10, and AtRAB18. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Molphe-Balch, E. P., Becerra-Flora, A., Jaimes-Miranda, F., & Jiménez-Bremont, J. F. (2019). Evidence for in vivo interactions between dehydrins and the aquaporin AtPIP2B. *Biochemical and biophysical research communications*, 510(4), 545-550
- Horstman, A., Tonaco, I. A. N., Boutilier, K., & Immink, R. G. (2014). A cautionary note on the use of split-YFP/BiFC in plant protein-protein interaction studies. *International journal of molecular*

sciences, 15(6), 9628-9643

- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587
- Hu, C. D., Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9(4), 789–798.
- Hughes, S., & Graether, S. P. (2011). Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein Science*, 20(1), 42–50.
- Hughes, S. L., Scharf, V., Malcolmson, J., Hogarth, K. A., Martynowicz, D. M., Tralman-Baker, E., ... Graether, S. P. (2013). The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins. *Plant Physiology*, 163(3), 1376–1386.
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 377–403.
- Kaundal, R., Saini, R., & Zhao, P. X. (2010). Combining machine learning and homology-based approaches to accurately predict subcellular localization in Arabidopsis. *Plant physiology*, 154(1), 36-54.
- Kim, P. M., Sboner, A., Xia, Y., & Gerstein, M. (2008). The role of disorder in interaction networks: a structural analysis. *Molecular systems biology*, 4(1)
- Kodama, Y., & Hu, C. D. (2013). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein–protein interaction: How to calculate signal-to-noise ratio. In *Methods in cell biology* (Vol. 113, pp. 107-121). Academic Press
- Kogan, F., & Guo, W. (2016). Early twenty-first-century droughts during the warmest climate. *Geomatics, Natural Hazards and Risk*, 7(1), 127-137
- Kudla, J., & Bock, R. (2016). Lighting the way to protein-protein interactions: recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. *The Plant Cell*, 28(5), 1002-1008
- Na, J. H., Lee, W. K., & Yu, Y. (2018). How do we study the dynamic structure of unstructured proteins: a case study on nopp140 as an example of a large, intrinsically disordered protein. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 381.
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. (2013). Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (77), e50521.
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology*, 148(1–2), 4–14.
- Morell, M., Espargaró, A., Avilés, F. X., & Ventura, S. (2007). Detection of transient protein–protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: The Abl-SH3 case. *Proteomics*, 7(7), 1023-1036
- Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2014). Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 553–584.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-164947>

- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., Fariselli, P., & Casadio, R. (2006). BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22(14), e408-e416
- Qu, Y., & Bolen, D. W. (2002). Efficacy of macromolecular crowding in forcing proteins to fold. *Biophysical chemistry*, 101, 155-165
- Reyes, J. L., RODRIGO, M. J., COLMENERO-FLORES, J. M., GIL, J. V., GARAY-ARROYO, A. D. R. I. A. N. A., Campos, F., ... & Covarrubias, A. A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment*, 28(6), 709-718
- Rivera-Najera, L. Y., Saab-Rincón, G., Battaglia, M., Amero, C., Pulido, N. O., García-Hernández, E., ... Covarrubias, A. A. (2014). A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 31995–32009.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(3), 215–225.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Shyu, Y. J., & Hu, C. D. (2008). Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research. *Trends in biotechnology*, 26(11), 622-630
- Singh, G. P., Ganapathi, M., & Dash, D. (2007). Role of intrinsic disorder in transient interactions of hub proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 66(4), 761-765
- Tapley, T. L., Körner, J. L., Barge, M. T., Hupfeld, J., Schauerte, J. A., Gafni, A., ... Bardwell, J. C. A. (2009). Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5557–5562.
- Tompa, P., & Kovacs, D. (2010). Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(2), 167–174.
- Truong, K., & Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current opinion in structural biology*, 11(5), 573-578.
- Van Der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., ... Babu, M. M. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chemical Reviews*, 114(13), 6589–6631.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33(5), 949-956.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., ... Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, 40(3), 428–438.

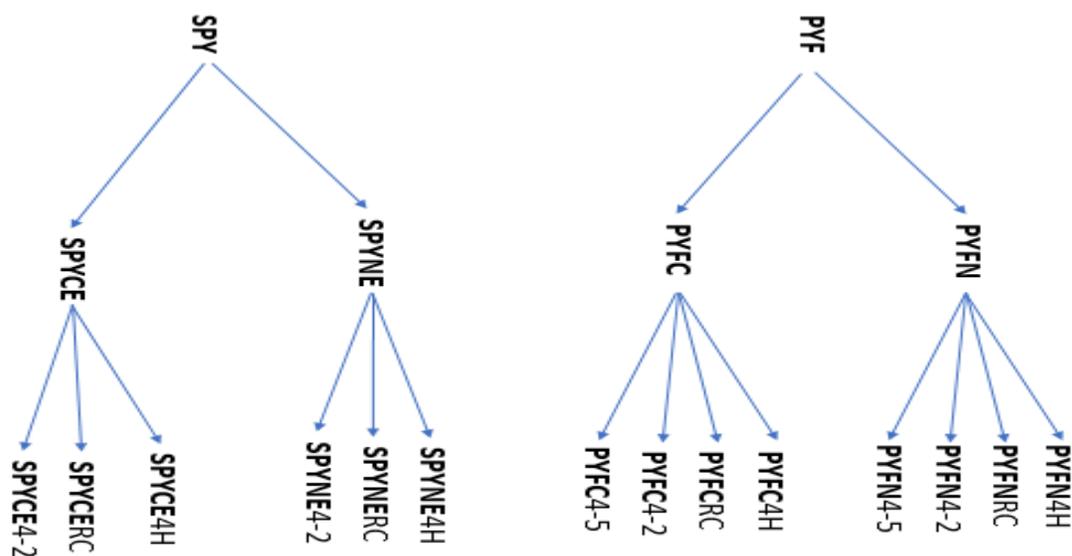
- Yuan, J. M., Chyan, C. L., Zhou, H. X., Chung, T. Y., Peng, H., Ping, G., & Yang, G. (2008). The effects of macromolecular crowding on the mechanical stability of protein molecules. *Protein Science*, 17(12), 2156-2166
- Zhang, X., Lu, S., Jiang, C., Wang, Y., Lv, B., Shen, J., & Ming, F. (2014). RcLEA, a late embryogenesis abundant protein gene isolated from *Rosa chinensis*, confers tolerance to *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and stabilizes enzyme activity under diverse stresses. *Plant molecular biology*, 85(4-5), 333-347
- Zhou, H. X., Rivas, G., & Minton, A. P. (2008). Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 375-397

APÉNDICE

Apéndice 1. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Tamaño
TRC4-2 Fw	AAA CCA TGG AGT CGG CGA AGG	21
TRC4-2 Rv	GGT CGA CCT TAG ATC TGT CCC G	22
TRC4-5 Fw	AAA CCA TGG AGT CGA TGA AAG AAA C	25
TRC4H Rv	CGC GTC GAC TCA GGT TCC GGC TCC AGC CGC	30
TRCRC Fw	AAA CCA TGG CCG GTT TAG GTT TGG GGA	27
TRC4-5 Rv	GCG GTC GAC CCG TTT ATC CAG TAT ATC C	28
35-S Fw	CCG GAA ACC TCC TCG GAT TCC	21
R-Nos Rv	TGA TAA TCA TCG CAA GAC CG	20
M13 Fw	GTA AAA CGA CGG CCA G	16
M13 Rv	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17
N-YFP Rv	CAC AAA GCT GGA GTA CAA CTA CA	23
C-YFP Rv	CAC TCT CGG CAT GGA CGA GCT G	22

Apéndice 2. Construcciones obtenidas



Apéndice 3.1 Condiciones de observación de las construcciones dentro de los vectores PYFN43 y PYFC43.

EVENTO	CONSTRUCCIONES OBSERVADAS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	INTENSIFICACIÓN
PRIMERO Y SEGUNDO	PYFN4H / PYFC4H PYFNRC / PYFCRC PYFN4-2 / PYFC4-2 PYFN4-5 / PYFC4-5 PYFN43 / PYFC43	500 MS	250
TERCERO	PYFN4H / PYFC4H PYFNRC / PYFCRC PYFN4-5 / PYFC4-5 PYFN43 / PYFC43	400 MS	200
CUARTO	PYFN4H / PYFC4H PYFNRC / PYFCRC PYFN4-5 / PYFC4-5 PYFN43 / PYFC43	200 MS	150

Apéndice 3.2 Condiciones de observación de las construcciones dentro de los vectores SPYNE y SPYCE.

EVENTO	CONSTRUCCIONES OBSERVADAS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	INTENSIFICACIÓN
PRIMERO Y SEGUNDO	SPYNE4H / SPYCE4H SPYNERC / SPYCERC SPYNE4-2 / SPYCE4-2 SPYNE4-5 / SPYCE4-5 SPYNE / SPYCE	800 MS	200
TERCERO	SPYNE4H / SPYCE4H SPYNERC / SPYCERC SPYNE4-2 / SPYCE4-2 SPYNE4-5 / SPYCE4-5 SPYNE / SPYCE	800 MS	250

Anexo 1. Fragmentos de AtLEA en PENTR

Electroforesis en gel de agarosa del 2% con los productos de PCR de colonia de células DH5α transformadas con las secuencias AtLEA4H, AtLEARC y AtLEA42 contenidas en el vector PENTR.

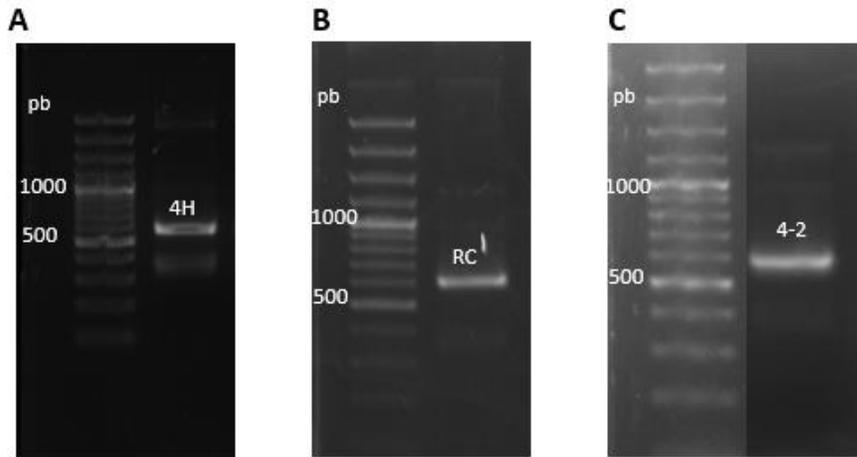
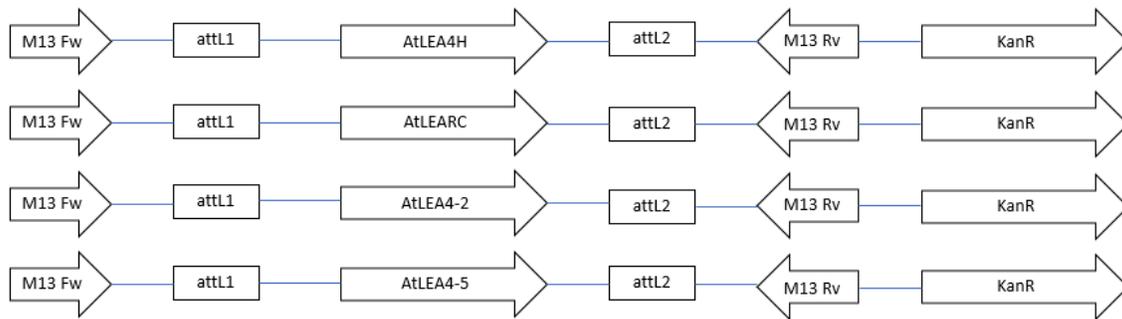


Fig. 2 Con el juego de oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rv. A) Fragmento correspondiente a la secuencia AtLEA4H. B) Fragmento correspondiente a la secuencia AtLEARC. C) Fragmento esperado de la secuencia AtLEA4-2.

Anexo 1.1 Mapa de las construcciones de las AtLEA en pENTR



Anexo 2. Vectores vacíos

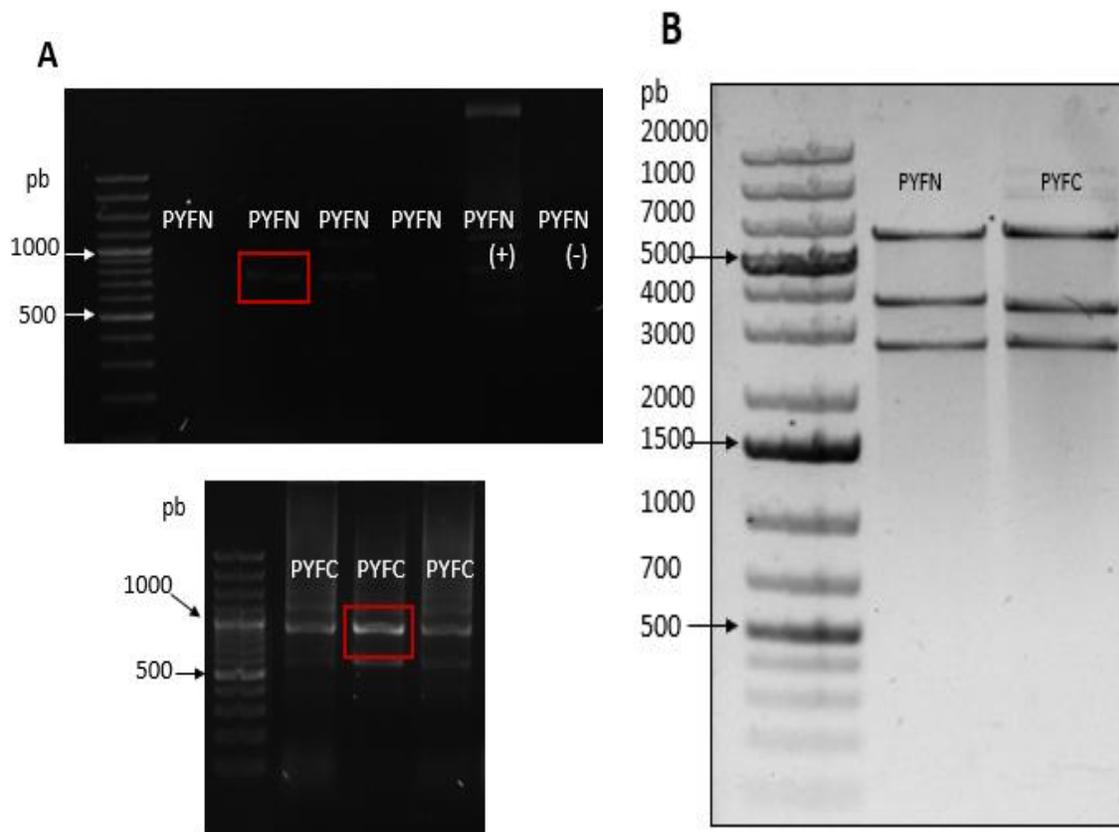
Anexo 2. 1 SPY

PCR de colonia de células DB3.1 transformadas con los vectores vacíos de SPYNE y SPYCE. Se utilizaron 3 colonias por construcción. Los recuadros rojos señalan las colonias seleccionadas para extraer más plásmido y mandar a secuenciar.



Anexo 2.2 PYF

PCR de colonia de células DB3.1 transformadas con los vectores vacíos de PYFN y PYFC; se utilizaron 4 y 3 colonias respectivamente (A). Los recuadros rojos señalan las colonias seleccionadas para extraer más plásmido, realizar la restricción con EcoRV (B) y mandar a secuenciar.



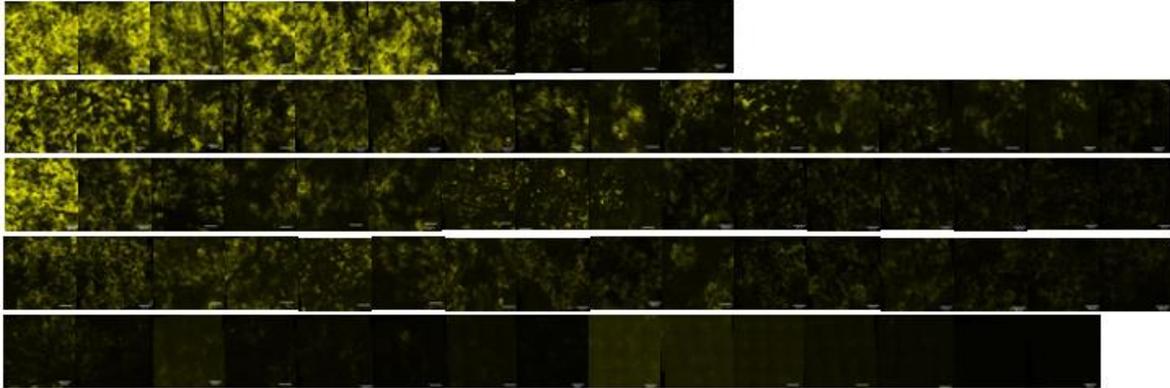
Anexo 3. Secuencias de las proteínas AtLEA dentro de pENTR, vectores vacíos y construcciones finales.

Todos los resultados de las muestras mandadas a secuenciar a lo largo de este trabajo se encuentran disponibles en la siguiente dirección:

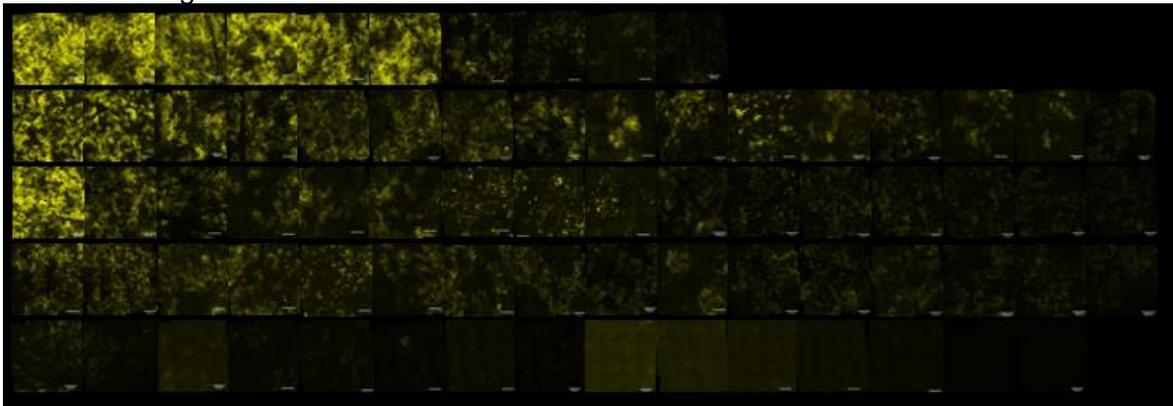
<https://drive.google.com/drive/folders/1bgspHPV5qXSW8CE4EcT1L5tzGPsumm6b>

Anexo 4.1.1 Fotografías de las construcciones en el vector PYF

Fotografías obtenidas del microscopio confocal Yokonawa de las construcciones realizadas en los vectores pYFN y pYFC sin manipulación de contraste. En el orden de fila AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4-5₁₋₇₇, AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈, Vector vacío. Se colocaron de mayor a menor intensidad de fluorescencia

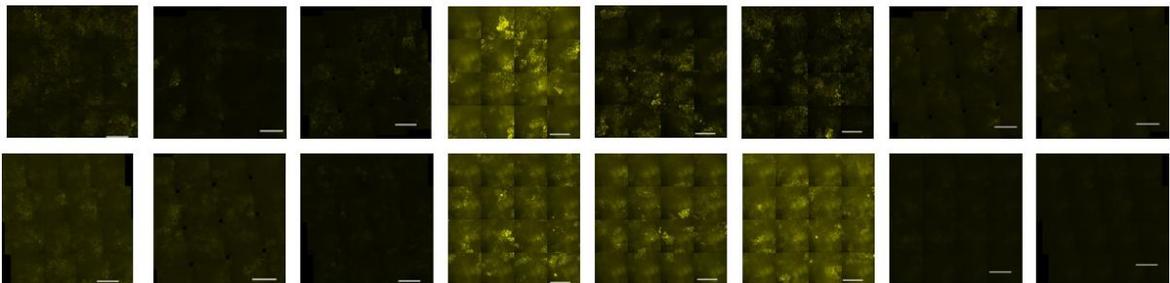


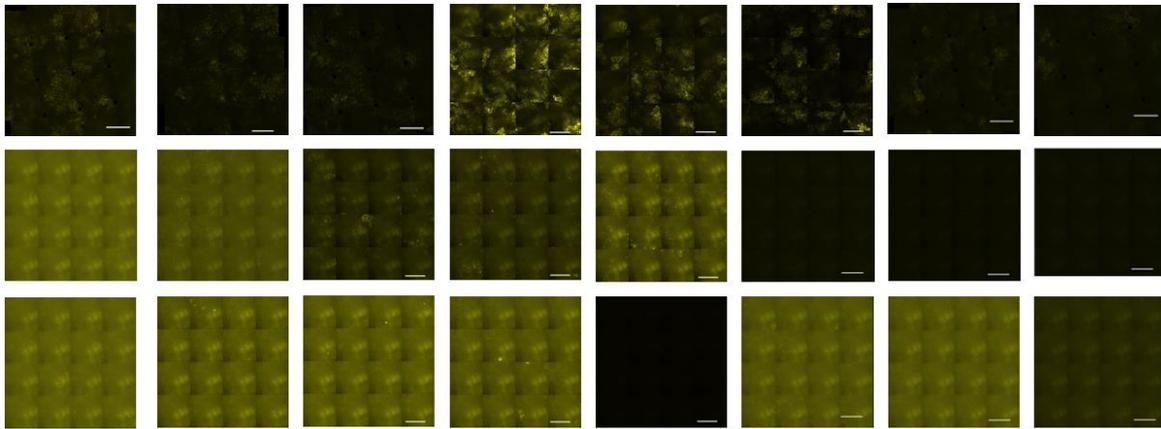
Con fondo negro



Anexo 4.2.1 Fotografías de las construcciones en el vector SPY

Fotografías obtenidas del microscopio confocal de las construcciones realizadas en los vectores SPYNE y SPYCE sin manipulación de contraste. En el orden AtLEA4-5, AtLEA4-2, AtLEA4-5₁₋₇₇, AtLEA4-5₇₈₋₁₅₈, Vector vacío.





Anexo 4.2.2 Fotografías de construcciones en el vector SPY con ajuste de componentes.

Se invirtieron los componentes de forma perceptiva de la imagen dando la imagen “negativa”. Esto se realizó solo para fines ilustrativos remarcando las células transformadas, no representan la intensidad de fluorescencia real. Las filas van en orden AtLEA4-2, AtLEA4-5, AtLEA4H, AtLEARC y control negativo

