



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Modificación de un biosensor FRET basado en una proteína intrínsecamente desordenada para monitorear los efectos del estrés osmótico en plantas**

### **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**QFB. Guadalupe Itzel Meneses Reyes**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. César Luis Cuevas Velázquez**  
**Facultad de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Adriana Garay Arroyo**  
**Instituto de Ecología, UNAM**

**Dra. Marina Gavilanes Ruiz**  
**Facultad de Química, UNAM**

**Ciudad de México, Agosto 2023**



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.

## **Agradecimientos institucionales**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el donativo de Ciencia de Frontera CONACYT con la clave CF-2019/252952 al Dr. César L. Cuevas Velázquez.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Clave IA203422.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química con la clave 5000-9182 al Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional para estudios de posgrado (CVU 1099999) que me fue otorgada durante el desarrollo de mi maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir a congresos.

## **Agradecimientos**

Dedico este trabajo a mi familia (Alex, Zazhil, Ricardo, Tía Yola y mi abuelita Raquel) quiénes siempre me han brindado su apoyo incondicional. Especialmente a mi mamá M. Guadalupe Reyes Ramírez y mi papá S. Ricardo Meneses González que sin su cariño y esfuerzo no sería la persona que soy. Son mi inspiración ¡gracias!

Agradezco al Dr. César Cuevas, quien con su dedicación me ha guiado y enseñado todo lo que sé. Gracias por la confianza que ha puesto en mí. Lo admiro y aprecio mucho.

Agradezco a mi pareja y mejor amigo, Raymundo Delgado Alcaraz por ser parte de este proceso y siempre motivarme para seguir adelante en momentos difíciles ¡Te quiero mucho Ray!

A mis amigas, Daniela Navarrete y Constanza Enríquez, que desde el inicio de este proceso estuvieron junto a mí, apoyándome académica y personalmente. Las quiero.

A mis compañeros del laboratorio 103 del Conjunto E de la Facultad de Química, por su tiempo para escuchar mis presentaciones, ideas, pláticas, etc.

A mi comité tutorial por aceptar ser parte de este proceso y escuchar mi proyecto.

A los integrantes del consorcio Covarrubias-Reyes del Instituto de Biotecnología por recibirme en su laboratorio, apoyarme, escucharme y guiarme en este proceso. Los quiero a todos.

Al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología, especialmente al Dr. Adán Guerrero, al Dr. Arturo Pimentel y a la Dra. Vero Rojas.

A la UNAM, por darme todos los recursos académicos como también las mejores experiencias.

# Índice

Resumen .....	1
.....	3
Abstract .....	4
1. Introducción .....	7
1.1 El déficit hídrico en las plantas .....	7
1.2 Las respuestas de las plantas al déficit hídrico.....	9
1.3 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía.....	12
1.4 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía del grupo 4.....	14
1.5 Proteínas intrínsecamente desordenadas .....	15
1.6 Modificaciones postraduccionales en las proteínas intrínsecamente desordenadas .....	17
1.6.1 Fosforilaciones en las proteínas intrínsecamente desordenadas.....	19
1.7 Biosensores fluorescentes basados en la transferencia de energía por resonancia Förster .....	21
1.7.1 Características estructurales y propiedades de las proteínas fluorescentes .....	24
1.7.2 mTurquoise2 y mNeonGreen como par FRET en células de plantas .....	26
2. Antecedentes .....	29
3. Hipótesis .....	32
4. Objetivo general.....	32
5. Objetivos específicos.....	32
6. Materiales y métodos.....	34
7. Resultados.....	45
7.1 Análisis in silico de una versión de SED1 incapaz de ser fosforilada .....	45
7.2 Obtención de una versión de SED1 incapaz de ser fosforilada.....	47
7.3 Caracterización de la respuesta del biosensor incapaz de ser fosforilado en células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y células de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	50
.....	52
7.4 Obtención de una versión de SED1 con un nuevo par FRET en células de levadura y células de plantas.....	53
7.5 Caracterización de la respuesta del biosensor con un nuevo par FRET en células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y células de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	56

7.6 Generación de líneas transgénicas T1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan el biosensor SED1-mTq2-mNG .....	62
8. Discusión .....	65
9. Conclusiones .....	70
10. Perspectivas .....	71
11. Bibliografía.....	72
12. Anexos.....	80

## Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico ( <i>Abscisic acid</i> ).
apFRET	Fotoblanqueo del aceptor FRET ( <i>Acceptor Photobleaching FRET</i> ).
BiFC	Complementación biomolecular de fluorescencia ( <i>Bimolecular fluorescence complementation</i> ).
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas ( <i>Crassulacean Acid Metabolism</i> ).
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> ).
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> ).
FLIM-FRET	Microscopía de tiempo de vida de fluorescencia por FRET ( <i>Fluorescence lifetime microscopy - FRET</i> ).
FP	Proteínas fluorescentes ( <i>Fluorescent proteins</i> ).
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia Förster ( <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> ).
IDP	Proteínas intrínsecamente desordenadas ( <i>Intrinsically Disordered Proteins</i> ).
LEA	Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía ( <i>Late Embryogenesis Abundant proteins</i> ).
NRD	Dominio de regulación negativo ( <i>Negative Regulatory Domain</i> )
PTMs	Modificaciones postraduccionales ( <i>Posttranslational Modifications</i> )
RWC	Contenido relativo de agua ( <i>Relative Water Content</i> )
SED1	Biosensor que expresa una proteína desordenada 1 ( <i>Sensor Expressing Disordered protein</i> )

## Resumen





## Resumen

Las plantas son organismos que responden a diferentes estímulos ambientales, como lo es el déficit hídrico. El déficit hídrico es una condición de estrés que se presenta bajo condiciones de sequía, congelamiento y altas concentraciones de sales en los suelos. Una de las respuestas al estrés por déficit hídrico es la acumulación de un grupo de proteínas que también se acumulan en la última etapa del desarrollo de las semillas ortodoxas, conocidas como proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*). La mayoría de las proteínas LEA están enriquecidas en aminoácidos hidrofílicos, pequeños y cargados, y deficientes en triptófanos y cisteínas. Estas características las comparten con las proteínas conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*), las cuales carecen parcial o totalmente de una estructura tridimensional estable (Dyson y Wright, 2005).

Los biosensores fluorescentes codificados genéticamente son herramientas que permiten el monitoreo de diferentes procesos celulares en tiempo real en células vivas (Ibraheem y Campbell, 2010). La variedad de biosensores fluorescentes se ha explorado principalmente en sistemas de mamíferos (Liu *et al.*, 2022), lo cual podría indicar que el uso de estas herramientas en células vegetales no es trivial. Sin embargo, se han utilizado biosensores fluorescentes en plantas, lo que ha permitido explicar el papel del calcio citosólico en diferentes vías y canales osmosensores en respuesta al estrés por déficit hídrico (Swanson y Gilroy, 2013).

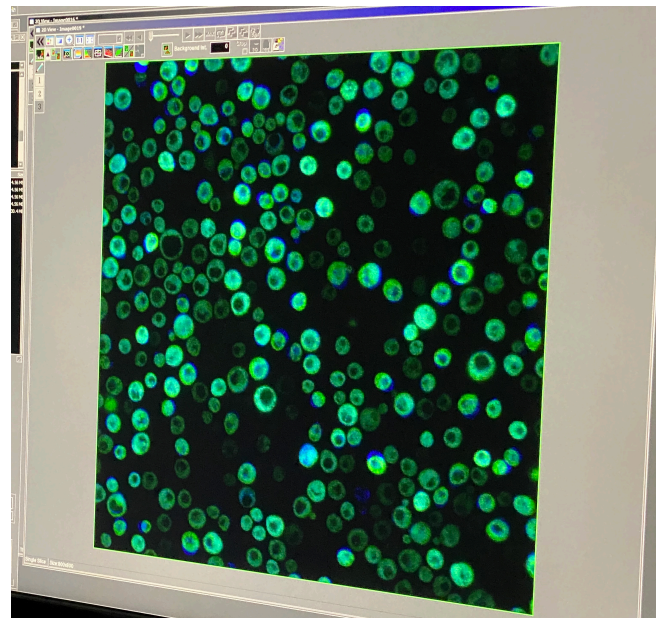
Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la proteína AtLEA4-5 (LEA del grupo 4) de *Arabidopsis thaliana* es una proteína que se puede utilizar como herramienta molecular para desarrollar biosensores fluorescentes tipo FRET (Förster Resonance Energy Transfer) capaces de reportar los efectos del estrés osmótico (Cuevas-Velazquez *et al.*, 2021). El primer biosensor generado con la proteína AtLEA4-5 fue llamado SED1 (Sensor Expressing Disordered protein 1). Este biosensor se evaluó en diferentes organismos, como células de levadura, bacterias, células humanas y en la planta *Nicotiana benthamiana*, mostrando su capacidad de reportar los cambios osmóticos celulares, a través de generar señales de FRET debido a los cambios conformacionales que esta proteína experimenta bajo estas

condiciones. Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas en estos estudios no se logró detectar la actividad biosensora de SED1 en *A. thaliana*.

La falta de respuesta de SED1 en esta especie vegetal se podría atribuir a que la proteína AtLEA4-5 contenida en SED1 proviene de *A. thaliana*, en donde existe información que indica que es blanco de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, particularmente, en residuos de serina, treonina y/o tirosina (Mergner et al., 2020). Por otro lado, también existe información que muestra que la proteína mCerulean3, que actúa como proteína fluorescente donadora en SED1, presenta una maduración lenta y experimenta un rápido fotoblanqueo en células vegetales (Denay et al., 2019). Por tal motivo, el objetivo de esta tesis fue mejorar la actividad biosensora de SED1 con la idea de obtener una versión funcional para *A. thaliana*. Para ello, se diseñaron y generaron dos nuevas versiones de SED1; una versión que no podría ser fosforilada, tras reemplazar todos los residuos de serina, treonina y tirosina por residuos de alanina, a la que se llamó SED1-fosfo-nula. En la otra versión de este biosensor se sustituyó el par FRET (originalmente mCerulean3 y Citrina) por las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen, y a este se le llamo SED1-mTurquoise2-mNeonGreen.

Los resultados indicaron que la versión de SED1 que no se fosforila (SED1-fosfo-nula) no es un biosensor apto para monitorear los efectos del estrés osmótico en células de levadura debido a que experimenta un menor cambio en los niveles de FRET que el biosensor SED1 original. Además, no logramos expresar SED1-fosfo-nula en células de plantas, posiblemente debido a un efecto tóxico de esta proteína (el cual se observó en células de levadura). Por otra parte, la versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen mostró ser un mejor biosensor que SED1, ya que se observó un incremento en la respuesta de FRET al probarlo en células de levadura sometidas a choque hiperosmótico/iónico con cloruro de sodio. Además, se logró detectar la expresión transitoria del biosensor SED1-mTurquoise2-mNeonGreen en células de *N. benthamiana*, en donde mostró una respuesta de FRET positiva ante el choque hiperosmótico/iónico inducido con cloruro de sodio, aunque no por un choque hiposmótico inducido con agua. Este comportamiento indica que este nuevo biosensor tiene potencial para mostrar mejores propiedades que su predecesor SED1, lo que abre la posibilidad de que podría ser un biosensor funcional en *A. thaliana*.

# Abstract



## Abstract

Plants are organisms that respond to different environmental stimuli, such as water deficit. Water deficit is a stress condition that occurs under conditions of drought, freezing and high salt concentrations in soils. One of the responses to water deficit stress is the accumulation of a group of proteins that also accumulate in the late stage of orthodox seed development, known as Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. Most LEA proteins are enriched in hydrophilic, small, charged amino acids and deficient in tryptophans and cysteines. These characteristics are shared with proteins known as Intrinsically Disordered Proteins (IDPs), which partially or completely lack a stable three-dimensional structure (Dyson and Wright, 2005).

Genetically encoded fluorescent biosensors are tools that enable real-time monitoring of different cellular processes in living cells (Ibraheem and Campbell, 2010). The variety of fluorescent biosensors has been explored mainly in mammalian systems (Liu et al., 2022), which might indicate that the use of these tools in plant cells is not trivial. However, fluorescent biosensors have been used in plants, which has allowed us to explain the role of cytosolic calcium in different osmosensory pathways and channels in response to water deficit stress (Swanson and Gilroy, 2013).

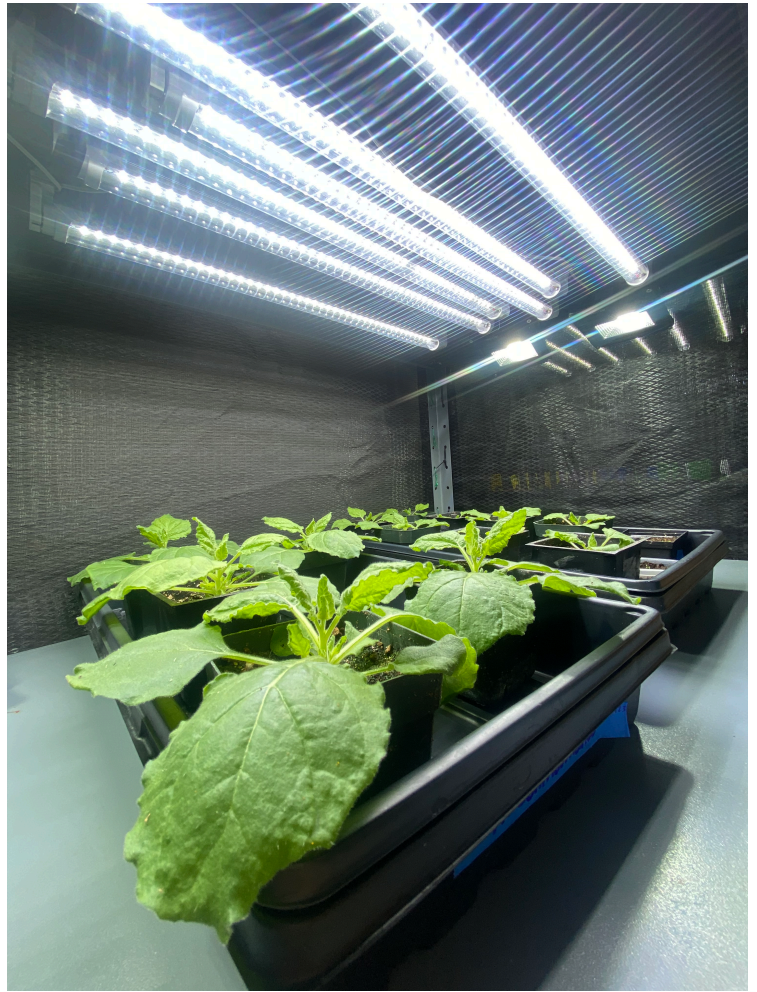
Previous studies in our laboratory demonstrated that the AtLEA4-5 (group 4 LEA) protein from *Arabidopsis thaliana* is a protein that can be used as a molecular tool to develop FRET (Förster Resonance Energy Transfer) type fluorescent biosensors capable of reporting the effects of osmotic stress (Cuevas-Velazquez et al., 2021). The first biosensor generated with the AtLEA4-5 protein was named SED1 (Sensor Expressing Disordered protein 1). This biosensor was evaluated in different organisms, such as yeast cells, bacteria, human cells and in the plant *Nicotiana benthamiana*, showing its ability to report cellular osmotic changes, through generating FRET signals due to the conformational changes that this protein undergoes under these conditions. However, under the conditions used in these studies, it was not possible to detect the biosensing activity of SED1 in *A. thaliana*.

The lack of response of SED1 in this plant species could be attributed to the fact that the protein contained in SED1 comes from *A. thaliana*, where there is information indicating that it is a target of post-translational modifications, such as phosphorylation, particularly in serine, threonine and/or tyrosine residues (Mergner et al., 2020). On the other hand, there is also information showing that the mCerulean3

protein, which acts as a fluorescent donor protein in SED1, shows slow maturation and undergoes rapid photobleaching in plant cells (Denay et al., 2019). For such reason, the aim of this thesis was to improve the biosensor activity of SED1 with the idea of obtaining a functional version for *A. thaliana*. For this purpose, two new versions of SED1 were designed and generated; one version that could not be phosphorylated, after replacing all serine, threonine, and tyrosine residues by alanine residues, which was named SED1-phospho-null. In the other version of this biosensor, the FRET pair (originally mCerulean3 and Citrine) was replaced by the fluorescent proteins mTurquoise2 and mNeonGreen, and this was named SED1-mTurquoise2-mNeonGreen.

The results indicated that the version of SED1 that is not phosphorylated (SED1-phospho-null) is not a suitable biosensor for monitoring the effects of osmotic stress in yeast cells because it undergoes less change in FRET levels than the original SED1 biosensor. In addition, we failed to express SED1-phospho-null in plant cells, possibly due to a toxic effect of this protein (which was observed in yeast cells). On the other hand, the SED1-mTurquoise2-mNeonGreen version was shown to be a better biosensor than SED1, since an increased FRET response was observed when tested in yeast cells subjected to hyperosmotic/ionic shock with sodium chloride. In addition, transient expression of the SED1-mTurquoise2-mNeonGreen biosensor was detected in *N. benthamiana* cells, where it showed a positive FRET response to sodium chloride-induced hyperosmotic/ionic shock, but not to water-induced hypoosmotic shock. This behavior indicates that this new biosensor has the potential to show better properties than its predecessor SED1, opening the possibility that it could be a functional biosensor in *A. thaliana*.

## Introducción



# 1. Introducción

## 1.1 El déficit hídrico en las plantas

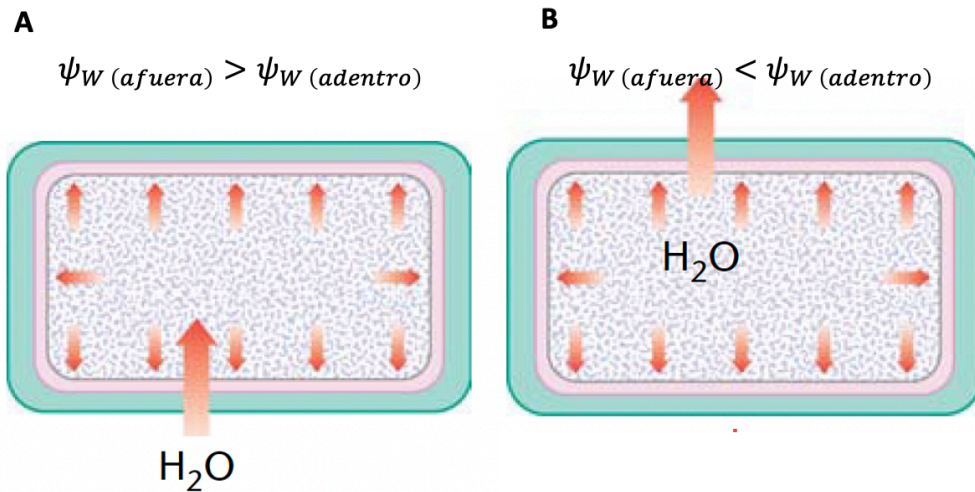
La poca disponibilidad de agua en el suelo puede ocasionar que la transpiración exceda el agua absorbida por las raíces en plantas, situación que se conoce como déficit hídrico (Munns y Tester, 2008). El déficit hídrico no solo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por temperaturas congelantes y por una elevada salinidad en el suelo (Augé, 2001). Las plantas pueden experimentar niveles de deshidratación críticos lo cual conlleva eventualmente a una condición conocida como desecación.

El déficit hídrico se puede determinar en función de la cantidad de agua contenida dentro de las plantas conocido como el potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) (Figura 1). Parámetro que mide el grado de hidratación de una célula, órgano o planta entera. El potencial hídrico se expresa en unidades de presión, comúnmente mega-pascales (MPa), aunque se puede expresar en otras unidades (atmósferas, psi y bares).

El potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) de las plantas es la suma de tres componentes: el potencial de solutos, el potencial de presión y el potencial gravitacional (Ecuación 1) (Buchanan *et al.*, 2015). El potencial de solutos ( $\Psi_s$ ), o también conocido como potencial osmótico, cuantifica la concentración de solutos disueltos en el agua. El potencial de presión ( $\Psi_p$ ) también conocido presión de turgencia, refleja la fuerza física ejercida sobre el agua por su entorno. El potencial gravitacional ( $\Psi_g$ ) depende de la altura, la densidad del agua y la gravedad. Tiene un efecto cuando el agua se transporta sobre distancias verticales mayores a 5-10 metros, este término se puede omitir cuando el transporte del agua es entre células de las plantas y plantas pequeñas.

*Ecuación 1. Potencial hídrico*

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$



**Figura 1.** Alteración en el potencial hídrico resulta en: **A.** Entrada de agua debido a un alto potencial hídrico afuera de la célula. **B.** Salida de agua debido a un bajo potencial hídrico afuera de la célula (Tomado y modificado de Bray., 2007).

Por otro lado, la membrana plasmática es semipermeable, permitiendo la entrada y salida del agua de una célula. Fenómeno conocido como ósmosis. El agua se mueve espontáneamente de regiones con alto potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) hacia regiones con valores menores. Cuando la toma de agua hacia el interior de una célula causa que la membrana plasmática se presione hacia la pared celular rígida se genera una presión de turgencia ( $\Psi_p$ ) (Buchanan *et al.*, 2015). Cuando la  $\Psi_p$  celular es mayor a cero las células están en un estado turgente, con valores comúnmente alrededor entre (0.4 – 0.6 MPa). Si la célula pierde demasiada agua, el  $\Psi_p$  será menor a cero y la célula se plasmoliza (Jones, 2013)

Una segunda forma de evaluar el estatus hídrico es el contenido relativo de agua (RWC, *Relative Water Content*) (Buchanan *et al.*, 2015). El RWC (Ecuación 2), se cuantifica restando el peso fresco menos el peso seco dividido con el peso fresco de un tejido turgente, es decir, que haya alcanzado la saturación, menos el peso seco.

*Ecuación 2. Contenido relativo de agua*

$$RWC = [(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / (\text{peso turgente} - (\text{peso seco}))] \times 100$$

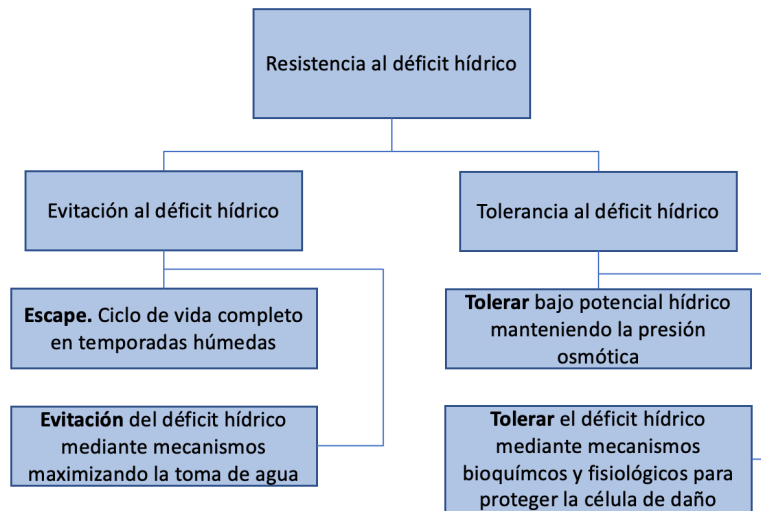
Cuando la absorción de agua por las raíces coincide con la pérdida típica de agua a través de las hojas, el RWC oscila entre 85 - 95%. Si el RWC cae por debajo de un valor crítico (<50%) (-5 a -10 MPa) el tejido muere en plantas que no son tolerantes a la desecación (Buchanan *et al.*, 2015).



## **1.2 Las respuestas de las plantas al déficit hídrico**

Las plantas están confinadas al lugar donde germinan, por lo tanto, constantemente están sometidas a cambios ambientales que en algunos casos llegan a ser desfavorables, como lo es la limitación de agua. Las plantas a lo largo de la evolución han desarrollado complejos mecanismos de respuestas fisiológicas, celulares, bioquímicas y moleculares. La respuesta al déficit hídrico puede ocurrir en pocos segundos (cambios en el estado fosforilado de una proteína) o en minutos e incluso horas (expresión de genes) (Bray, 1997). En general, las respuestas celulares al déficit hídrico incluyen el aumento en la concentración de solutos, cambio en el volumen celular, cambio en la forma en la integridad de la membrana, pérdida de turgencia, alteración en la integridad de la membrana, entre otras (Bray, 1997).

La resistencia al déficit hídrico puede ocurrir a través de estrategias de evitación y tolerancia (Bray, 1997) (Figura 2). Algunas especies de plantas son capaces de escapar del déficit hídrico completando su ciclo de vida cuando la disponibilidad de agua es plena. Otras especies (plantas suculentas), utilizan mecanismos para eficientizar el uso del agua, como el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*) en el que los estomas tienden a cerrarse durante el día, reduciendo considerablemente la transpiración del agua. Por otro lado, especies que se seleccionan o se aclimatan para sobrevivir al déficit hídrico presentan mecanismos de tolerancia a esta condición estresante. Tal es el caso de diferentes especies y/o variedades dentro de la misma especie. En algunas especies se han seleccionado mecanismos que les permiten tolerar a condiciones extremas de deshidratación, como la desecación. Tal es el caso de las plantas llamadas de resurrección cuyos tejidos vegetativos pueden tolerar grado de deshidratación extrema, manteniendo 'latentes' algunas células de estos tejidos, las cuales 'resucitan' al presentarse condiciones de humedad favorables.



**Figura 2.** La resistencia al déficit hídrico puede surgir por mecanismos de evitación y tolerancia (Modificado de Bray., 2007).

Las respuestas al déficit hídrico dependen de la duración y severidad del estrés, así como de la especie, tejido, etapa de desarrollo y genotipo de la planta. A nivel fisiológico, el cierre de los estomas es una de las respuestas más rápidas y evidentes cuando la planta se enfrenta a una limitación de agua evitando con ello la pérdida de agua de las hojas por transpiración.

En relación con la respuesta a nivel celular, las plantas realizan un ajuste osmótico acumulando iones y compuestos orgánicos que evitan la pérdida de turgencia de la célula, disminuyendo el potencial osmótico. Estos compuestos son conocidos como osmoprotectores los cuales se acumulan principalmente en el citosol y el cloroplasto. Se acumulan en respuesta al estrés y se degradan después del alivio del estrés (Zivcak *et al.*, 2016). Los osmoprotectores eliminan los efectos del estrés hídrico de dos formas diferentes: mejorando el sistema antioxidante y manteniendo la homeostasis iónica. Para minimizar los efectos del estrés oxidativo promovido por el estrés hídrico, los osmoprotectores contribuyen a la estabilización de enzimas y proteínas antioxidantes, disminuyendo el riesgo de daños por especies reactivas de oxígeno y además protegen la integridad de la membrana. Como ejemplos de osmoprotectores encontramos a las poliaminas, la glicina-betaína y la prolina. Por otro lado, la homeostasis iónica está fomentada por el potencial de transporte de las proteínas de la membrana, por ejemplo, para la apertura de los estomas es necesario la acumulación del ión  $K^+$  en la vacuola en contra de un gradiente electroquímico para inducir suficiente turgencia (Zhu, 2001).

En el caso de la respuesta a nivel transcripcional, las plantas producen una serie de fitohormonas (Waadt *et al.*, 2022). El ácido abscísico (ABA, *Abscisic acid*) juega un papel importante en la respuesta, tolerancia y adaptación de las plantas al déficit hídrico ya que es una molécula que se acumula ante la percepción del déficit hídrico lo que desencadena una compleja vía de señalización que termina en la inducción de genes de respuesta que ayudan a la planta a tolerar y ajustarse a la condición de estrés (Yoshida *et al.*, 2014). Ante el déficit hídrico, se desencadenan diferentes vías de señalización, de las cuales algunas están mediadas por el ABA en tanto que otras son independientes de esta fitohormona. En estas últimas vías participan otras fitohormonas como mediadores, o bien se desconocen las moléculas mensajeras que intervienen. Algunas de estas vías de transducción se comunican entre sí generando vías complejas que, a su vez, pueden comunicarse con otras vías involucradas en el desarrollo de un órgano determinado (Yao *et al.*, 2021; Waadt *et al.*, 2022).

La respuesta a nivel molecular involucra el encendido o estimulación de la expresión de ciertos genes, pero también la represión o apagado de otros (Yoshida *et al.*, 2014). Los genes cuya expresión se activa o induce codifican para una amplia gama de proteínas que se pueden clasificar en dos grupos. El primer grupo está compuesto por proteínas de reguladoras, entre las que se encuentran factores de transcripción, fosfatasa, cinasas, enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, etc. El segundo grupo incluye proteínas que funcionan en la protección de macromoléculas y/o estructuras celulares o en el ajuste metabólico, tales como la osmotina, enzimas desintoxicantes, enzimas del metabolismo primario, transportadores de azúcares, chaperonas y proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late embryogenesis abundant proteins*), etc (Yoshida *et al.*, 2014).

### **1.3 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía**

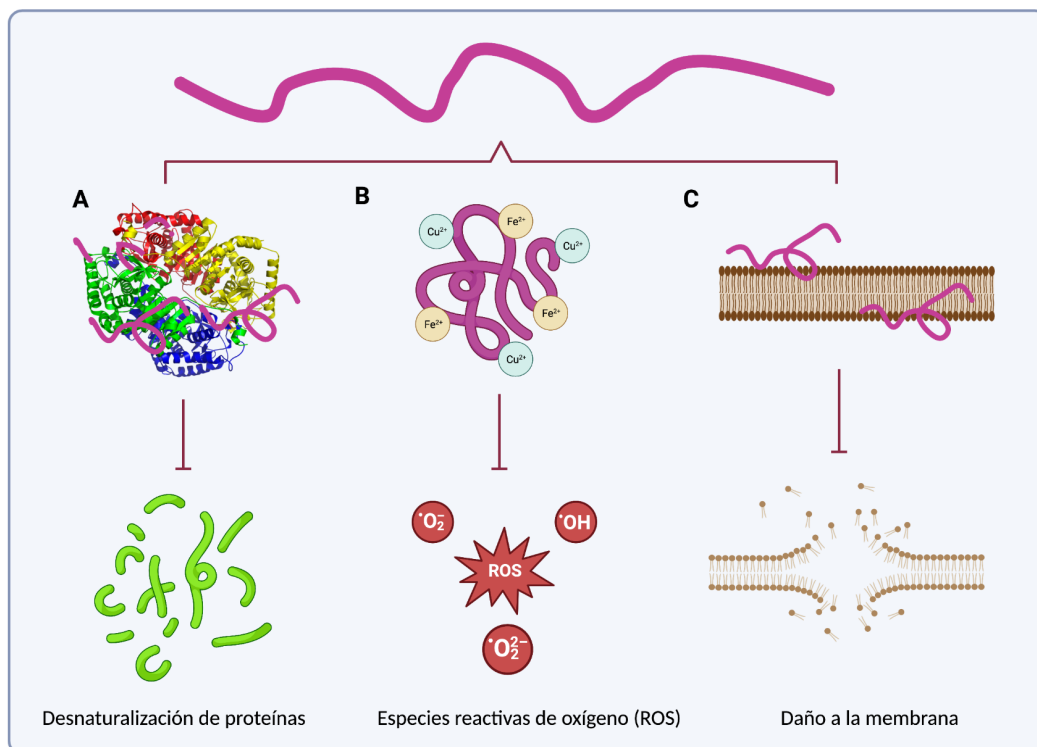
Las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*) fueron inicialmente nombradas de acuerdo con su descubrimiento en la fase tardía de la embriogénesis, durante el desarrollo de las semillas de algodón (Dure y Chlan, 1981). Actualmente, las proteínas LEA se han encontrado en especies de los diferentes taxa del reino vegetal, en plantas no vasculares (briofitas) y en plantas vasculares (gimnospermas y angiospermas) (Battaglia et al., 2008b). También, proteínas similares a las proteínas LEA se han encontrado en bacterias, cianobacterias, tardígrados, etc (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022). Se ha descrito la acumulación de proteínas LEA en tejidos de raíz, tallo, hojas, flores y frutos antes condiciones de deficiencia de agua; así como en diversos compartimentos celulares y en diferentes etapas de desarrollo. Algunas proteínas LEA también se presentan en algunos tejidos vegetativos de la planta durante ciertas etapas del desarrollo (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Hernández-Sánchez *et al.*, 2022).

Las proteínas LEA se han clasificado de acuerdo con la presencia de motivos conservados distintivos (Dure *et al.*, 1989; Bray, 1993; Battaglia *et al.*, 2008; Hundertmark y Hinch, 2008). En esta tesis se siguió la clasificación de Battaglia y colaboradores, en donde estas proteínas se organizan en siete grupos, acorde con la similitud entre su secuencia de aminoácidos y la identificación de motivos conservados (Dure *et al.*, 1989; Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas LEA se caracterizan por tener una alta hidrofiliidad, alto contenido de aminoácidos pequeños (principalmente glicinas y alaninas) y carecen de aminoácidos hidrofóbicos como lo son el triptófano, la fenilalanina y aminoácidos promotores de estructura terciaria como la cisteína (Battaglia *et al.*, 2008). Además, estas proteínas se consideran parte de un nuevo conjunto de proteínas conocidas como hidrofilinas, las cuales se caracterizan por tener una composición de glicinas mayor al 6% y un índice de hidrofiliidad mayor a 1 (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Las proteínas LEA son proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, *Intrinsically Disordered proteins*) ya que carecen total o parcialmente de una estructura tridimensional estable (Battaglia *et al.*, 2008; Hundertmark y Hinch, 2008).

Las funciones de las proteínas LEA se han caracterizado mediante diferentes ensayos *in vitro* (Figura 3), los cuales a falta de ensayos *in vivo*, son hasta ahora la

mejor opción para evaluar su función protectora de biomoléculas y los mecanismos de acción asociados a ellas (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022). Entre las funciones propuestas destacan la función tipo chaperona previniendo la agregación y guiando el plegamiento de proteínas blanco (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022; Goyal *et al.*, 2005), unión a metales pesados evitando la producción de especies reactivas de oxígeno, reemplazando moléculas de agua que solvatan a las estructuras de las moléculas blanco (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022; Graether y Boddington, 2014) y estabilización de azúcares que representan estructuras tipo matriz durante el déficit hídrico en muchos tejidos de organismos anhidrobióticos (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022; Hinchá *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Funciones propuestas de las proteínas LEA *in vitro*. **A.** La presencia de la proteína LEA previene la desnaturalización de enzimas como la lactato deshidrogenasa. **B.** Las proteínas LEA unen metales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , evitando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). **C.** Las proteínas LEA previenen el daño de membranas durante condiciones de estrés (Modificado de Hernández-Sánchez *et al.*, 2022).

En plantas, las proteínas LEA de diferentes grupos se han sobreexpresado en diversas especies incluyendo *A. thaliana* y *N. benthamiana*. Reportes diversos en donde se sobre-expresan diferentes proteínas LEA en diferentes especies vegetales se han mostrado que pueden generar una mayor tolerancia al déficit hídrico, temperaturas extremas, estrés oxidativo y estrés por metales pesados que las líneas silvestres. Sin embargo, no en todos los casos se ha visto un mejoramiento de la respuesta (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022). También, se han caracterizado mutantes de las proteínas LEA en *Physcomitrella patens*, bajo condiciones de estrés osmótico en donde los resultados muestran que dos proteínas LEA del grupo 2 (dehidrinas) juegan un papel importante en la protección celular (Ruibal *et al.*, 2012).

Los distintos grupos de proteínas LEA experimentan transiciones estructurales que van de un estado desordenado a uno ordenado, con capacidad de formar estructuras alfa-hélices (LEA grupo 2, 3 y 4) (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010; Cuevas-Velázquez *et al.*, 2017). Sin embargo, el estudio estructural alfa-hélice se ha estudiado ampliamente en las proteínas LEA del grupo 4 (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2017).

#### **1.4 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía del grupo 4**

De acuerdo con la clasificación de Dure y Battaglia, las proteínas LEA de esta familia presentan una región N-terminal conservada, aproximadamente de 70-80 residuos de largo que se predice que forman estructuras hélice-alfa. Mientras que la región C-terminal es variable en secuencia y tamaño (Dure *et al.*, 1989; Battaglia *et al.*, 2008).

El motivo 1 (AQEKAEKMTA[R/H]DPXKEMAHK[E/K][A/E][K/R]) es la principal secuencia consenso ubicada en la región N-terminal, que caracteriza a este grupo. Existen otros motivos conservados que se localizan a lo largo de la proteína (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). El análisis filogenético de 74 proteínas LEA 4 de angiospermas, gimnospermas y briofitas permitió dividir a esta familia en dos subgrupos: el 4A (80–124 aminoácidos) que consisten en una región N-terminal conservada y un C-terminal variable y corto, y el 4B (108 – 180 aminoácidos) con una región C-terminal variable de aproximadamente de la misma longitud que su región N-terminal conservada (Battaglia *et al.*, 2008).

En tejidos de *A. thaliana*, los transcritos del grupo 4 se acumulan en respuesta al déficit hídrico. De acuerdo con su localización cromosomal las proteínas se nombraron AtLEA4-1 (At1g32560), AtLEA4-2 (At2g35300) y AtLEA4-5 (At5g06760) (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). En condiciones normales la proteína AtLEA4-1, se acumula abundantemente en flores y silicuas inmaduras. Las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5, se acumulan abundantemente en la embriogénesis tardía y en semillas secas. En condiciones de déficit hídrico con PEG y NaCl (100, 150 y 200 mM), la proteína AtLEA4-5 mostró mayor inducción en comparación con la alcanzada por las proteínas de AtLEA4-1 y AtLEA4-2 (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

### **1.5 Proteínas intrínsecamente desordenadas**

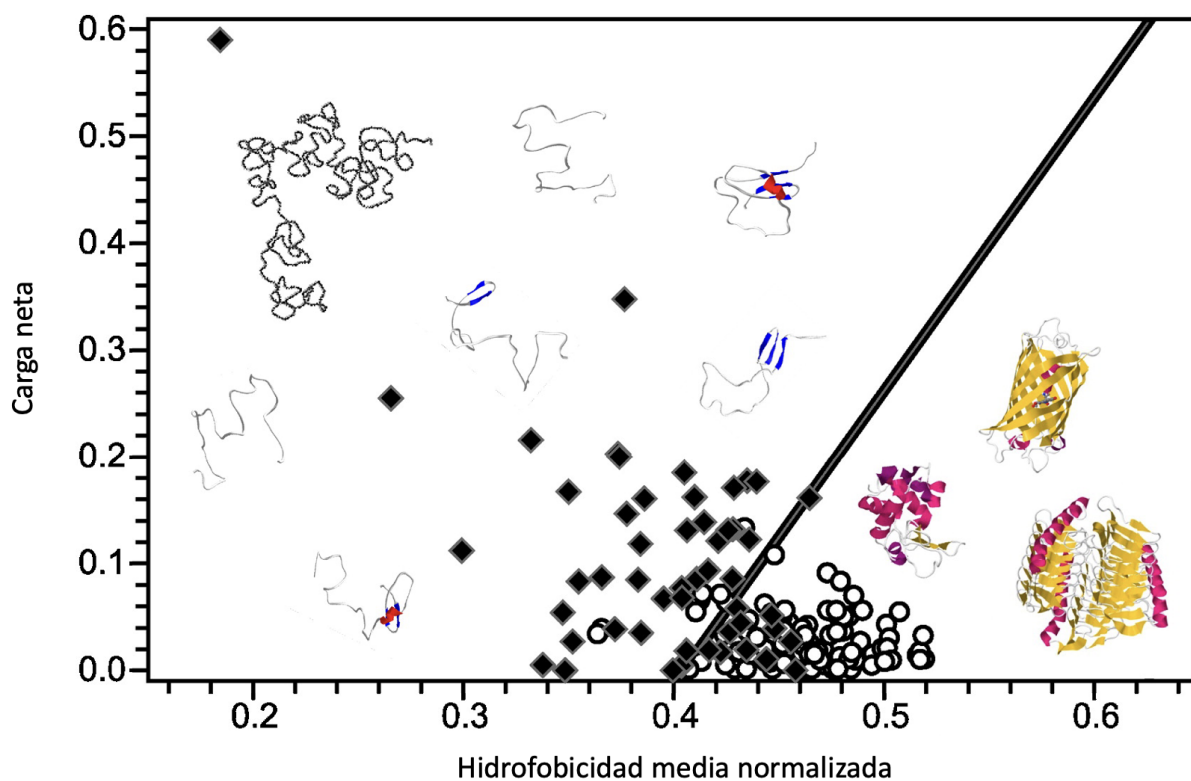
Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, *Intrinsically Disordered proteins*) son proteínas que carecen de estructura secundaria y/o terciaria estable. Las IDPs son abundantes en varios proteomas, lo que indica la funcionalidad de este tipo de proteínas está dada por el desorden intrínseco (Darling y Uversky, 2018).

Debido a su naturaleza flexible, las IDPs presentan modos de acción diferentes. Entre sus funciones podemos encontrar cadenas entrópicas, ensambladores, chaperonas y unión a diversos blancos. De hecho, las IDPs tienen la capacidad de plegarse parcialmente o someterse a transiciones de desorden-orden tras la interacción con blancos o en respuesta a cambios en el medio en el que se encuentran (Darling y Uversky, 2018).

Por otro lado, resultados diversos indican que la capacidad de una proteína para plegarse (o no plegarse) en condiciones fisiológicas depende de su secuencia de aminoácidos. Se ha observado que la combinación de hidrofobicidad baja (que conduce a una fuerza motriz baja para la compactación de proteínas) y una carga neta alta (que conduce a una fuerte repulsión electrostática) representa un determinante importante para la ausencia de una estructura compacta (Figura 4). Asimismo, en comparación con las proteínas ordenadas, las IDPs presentan bajas proporciones de “aminoácidos promotores de orden” o aminoácidos hidrófobos voluminosos (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Cys, Asn) y están sustancialmente enriquecidos en aminoácidos cargados, pequeños y polares que promueven el desorden (Ala, Arg, Gly, Ser, Gln, Glu, Lys y Pro) (Uversky, 2014).

Las IDPs se caracterizan por tener estructuras dinámicas y heterogéneas que son altamente sensibles a cambios en el ambiente. Las IDPs usualmente experimentan modificaciones postraduccionales (PTMs, *Posttranslational Modifications*) que alteran las propiedades fisicoquímicas de las proteínas tales como carga y flexibilidad. Las PTMs juegan un papel crucial en la función de las IDPs, ya que estas modificaciones participan como reguladores de la composición del ensamble conformacional (Uversky, 2002).

A continuación, en la siguiente sección de estas tesis se describe el papel de las PTMs (especialmente fosforilaciones) en la regulación de las IDPs.



**Figura 4.** Comparación de 275 proteínas ordenadas (círculos) y 91 proteínas desordenadas (rombos). La línea negra representa el límite entre proteínas desordenadas y ordenadas. En la sección de las proteínas desordenadas se encuentran imágenes representativas de proteínas desordenadas tipo “native coils” y “pre-molten globes”. En la sección de proteínas globulares se encuentran imágenes representativas de estas (Tomado y modificado de Uversky., 2011).



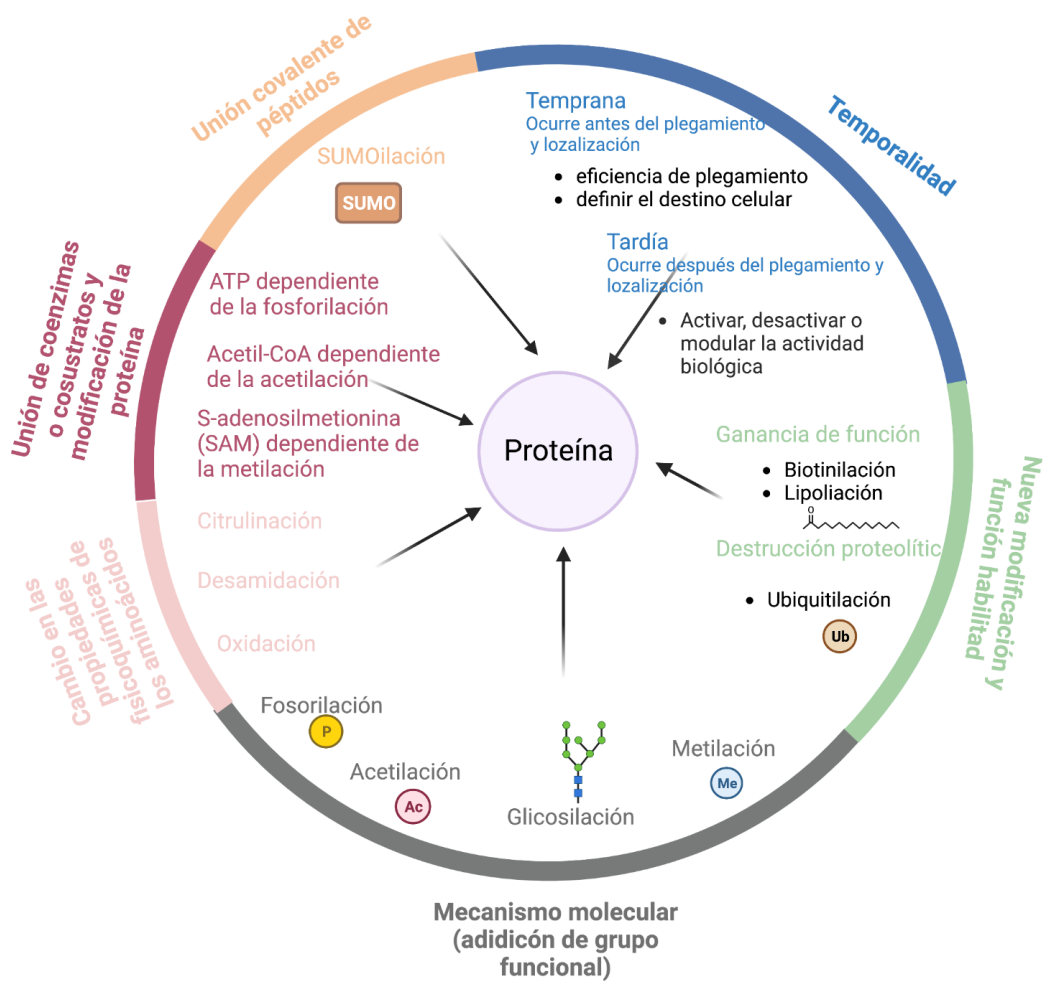
## **1.6 Modificaciones postraduccionales en las proteínas intrínsecamente desordenadas**

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) son cambios químicos comunes que ocurren una vez sintetizada la proteína y que afectan la estructura y función de las mismas (Darling y Uversky, 2018). Varios grupos químicos orgánicos e inorgánicos se pueden agregar covalentemente a la cadena lateral de los aminoácidos, como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Incluso las proteínas pueden sufrir una escisión enzimática de enlaces peptídicos o la remoción de varios grupos químicos (Darling y Uversky., 2018).

Las PTMs resultan de diferentes actividades enzimáticas a través de reconocimiento de motivos particulares en la secuencia de proteínas por enzimas específicas. Algunas PTMs (fosforilación, acetilación, glicosilación, lipidación, metilación y nitración) son reversibles debido a la acción de las enzimas modificadoras o demodificadoras (Darling y Uversky., 2018).

Las PTMs tienen implicaciones importantes para la variabilidad y diversidad de la estructura y función de las proteínas. Pueden modular el plegamiento de las proteínas, su localización subcelular en compartimentos, su interacción con moléculas blanco, su actividad catalítica y, consecuentemente afectar sus funciones (Deribe *et al.*, 2010).

La diversidad de las PTMs han llevado a clasificarlas en diferentes grupos (Figura 5) (Darling y Uversky, 2018).



**Figura 5.** Clasificación de las modificaciones post-traduccionales. Los diferentes colores señalan los diferentes tipos de PTMs que pueden ocurrir en una proteína (círculo morado).

Estudios recientes señalan que las IDPs están altamente expuestas a PTMs como las fosforilaciones, acetilaciones y metilaciones (Darling y Uversky., 2018). El modelo clásico de llave-cerradura de las PTMs no se sigue en las IDPS. De hecho, las proteínas desordenadas siguen el modelo “one-lock-many-key”, ya que estas presentan varios sitios con potencial para ser modificados por una sola enzima (Darling y Uversky., 2018).

Los cambios estructurales inducidos por las PTMs pueden ser muy diversos, causando la transición de desorden a orden, generando cambios locales y globales, que conducen tanto a la asociación como a la disociación de complejos proteicos. Ejemplo de ello son las fosforilaciones y acetilaciones que tienen un efecto estructural en el dominio desordenado NRD (*Negative Regulatory Domain*) de la proteína

supresora de tumores p53. También existen casos en los que la estructura no se afecta, pero sí la función de la proteína. Por ejemplo, mediante dicroísmo circular (DC) la fosforilación de una proteína LEA del grupo 3 de soya (PM18) no presenta cambios en su estructura desordenada, pero tiene un efecto en la tolerancia a la sal en células de levadura (Darling y Uversky., 2018; Liu *et al.*, 2017).

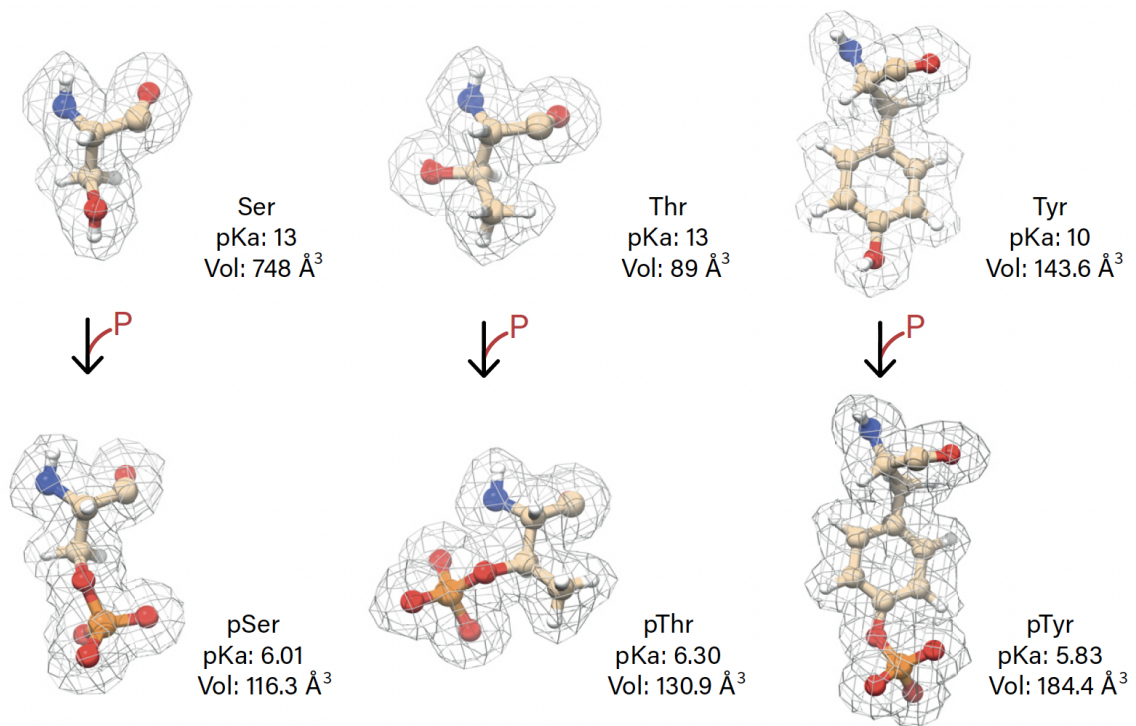
### **1.6.1 Fosforilaciones en las proteínas intrínsecamente desordenadas**

Como ya se mencionó, las fosforilaciones son PTMs reversibles que resultan en la adición de un grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) a la cadena lateral de aminoácidos. Este proceso lo realiza una cinasa, mientras que el proceso contrario lo lleva a cabo una fosfatasa. En las células eucariontes, las fosforilaciones ocurren en el citoplasma y en el núcleo, lo cual tiene concordancia con la localización de estas enzimas (Newcombe *et al.*, 2022). Los aminoácidos que comúnmente sufren fosforilaciones son la serina, treonina y tirosina, siendo la serina el más común con un 75% (Newcombe *et al.*, 2022). No obstante, existen otros aminoácidos que se pueden fosforilar con menor frecuencia tales como, la histidina, arginina, lisina, aspartato, glutamato y cisteína.

Estudios bioinformáticos ha demostrado que las fosforilaciones en las IDPs ocurren con mayor frecuencia que en una proteína globular (Newcombe *et al.*, 2022). Esto puede deberse a la flexibilidad de las IDPs, de tal modo que las cinasas podrían tener un mayor acceso.

Las fosforilaciones se describieron inicialmente como simples interruptores de encendido/apagado que actuaban en diferentes vías de señalización. Sin embargo, con el descubrimiento de las IDPs, las fosforilaciones tomaron un papel importante ya que han mostrado su efecto, cooperativo o jerárquico, sobre diversos mecanismos regulatorios complejos generando diferentes respuestas.

El cambio estructural evidente de las IDPs causado por las fosforilaciones es la adición de dos cargas negativas y un aumento en el volumen (el grupo fosforilo tiene un volumen de  $43\text{\AA}$ ) o en la nube electrónica (Figura 6) (Newcombe *et al.*, 2022). Asimismo, el reemplazo del grupo alcohol por un grupo fosforilo impacta drásticamente el pKa de la cadena lateral.



**Figura 6.** Estructura química, volumen y pKa de los aminoácidos serina, treonina y tirosina (panel superior). También pSerina (pSer), pTreonina (pThr) y pTirosina (pTyr) (panel inferior). La malla gris representa la densidad electrónica (Tomado de Newcombe *et al.*, 2022).

Por otro lado, la adición de cargas negativas puede introducir interacciones adicionales con cargas positivas de las cadenas laterales de aminoácidos vecinos de la misma proteínas, tales como las que presentan la lisina y arginina, modificando así la estructura de las IDPs. Este tipo de interacciones impactan el grado de compactación (radio de giro ( $R_g$ )) que una IDP puede llegar a adquirir bajo una condición determinada (Newcombe *et al.*, 2022), afectando con ello su organización (ej. oligomerización, formación de complejos, formación de biocondensados, etc.).

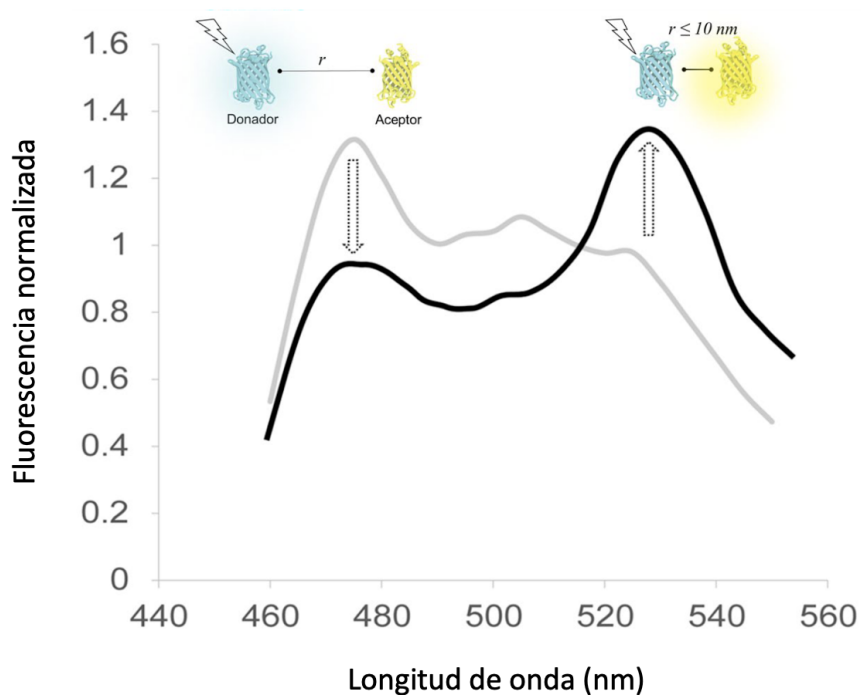
## **1.7 Biosensores fluorescentes basados en la transferencia de energía por resonancia Förster**

Los biosensores fluorescentes son herramientas moleculares que permiten el monitoreo de la dinámica molecular de las macromoléculas en las células en tiempo real, lo que permite evaluar algunos procesos bioquímicos complejos a través de cambios en la fluorescencia. Los biosensores fluorescentes contienen un elemento de reconocimiento que se une a un analito de interés y reporteros fluorescente que convierte la interacción en una señal detectable, por ejemplo, el biosensor FRET Yellow cameleon (YC3.6) que tiene a dos proteínas fluorescentes (CFP-YFP) fusionadas en los extremos de un dominio de detección de calcio, calmodulina y M13 el dominio de unión a calmodulina (Wang *et al.*, 2023; Ovechkina *et al.*, 2021; Swanson y Gilroy, 2013).

Los biosensores fluorescentes se pueden clasificar en al menos cinco grupos dependiendo de su estructura (Ibraheem & Campbell, 2010). *Grupo I*: biosensores intramoleculares basados en FRET, *Grupo II*: biosensores intermoleculares basados en FRET, *Grupo III*: biosensores basados en complementación de fluorescencia biomolecular (BiFC, *Biomolecular fluorescence complementation*), *Grupo IV* y *Grupo V*: Biosensores con solo una proteína fluorescente, es decir, consiste en una sola cadena polipeptídica con un elemento de reconocimiento exógeno para el grupo IV o endógeno para el grupo V. En esta tesis, nos enfocaremos únicamente en los biosensores fluorescentes del Grupo I porque el biosensor desarrollado en este trabajo tiene esta estructura.

Los biosensores intramoleculares basados en FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) tienen todos sus componentes en una sola cadena polipeptídica, y el analito provoca un cambio en la estructura o conformación del elemento de reconocimiento. Este cambio es detectado mediante la determinación de la transferencia de energía que ocurre solo cuando las dos proteínas fluorescentes se acercan lo suficiente para que esta transferencia se efectúe. La evaluación de este proceso conocido como FRET se mide a través del cociente de la intensidad de fluorescencia de emisión de cada una de las proteínas fluorescentes involucradas. FRET se refiere a la transferencia de energía por resonancia de Förster (o también llamado por resonancia de fluorescencia), fenómeno físico en el que la energía del estado excitado de una proteína fluorescente donadora de mayor energía se

transfiere a una proteína fluorescente aceptora de menor energía a través de un acoplamiento dipolo-dipolo, dentro de una distancia de 1-10 nm (VanEngelenburg y Palmer, 2008). Un cambio de FRET resulta en la disminución de la intensidad del espectro de emisión de fluorescencia del donador tras su excitación (DxDm, *Donor excitation, Donor emission*) al mismo tiempo que la intensidad del espectro de fluorescencia del aceptor aumenta (DxA<sub>m</sub>, *Donor excitation, Acceptor emission*) como resultado del acercamiento entre ambas proteínas fluorescentes (Figura 7).



**Figura 7.** Ejemplo de un cambio en la eficiencia FRET en condición control (línea gris) y condición de estrés hiperosmótico/iónico (línea negra) (Tomado de Enriquez-Toledo., 2022, Tesis de Maestría).

La transferencia de energía entre la proteína donadora y aceptora se cuantifica mediante la eficiencia FRET ( $E$ ). Este parámetro se refiere al porcentaje de energía transferida del donador al aceptor y se describe cuantitativamente con las siguientes ecuaciones (Bajar *et al.*, 2016)

*Ecuación 3. Eficiencia FRET*

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6}$$

*Ecuación 4. Distancia de Förster*

$$r_0 = 0.02108(\kappa^2 \phi_D n^{-4} (\int_0^\infty f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda))^{1/6} \text{ en (nm)}$$

La eficiencia FRET (E) es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre dos fluoróforos y funciona solo en una distancia <10 nm. En la ecuación,  $r$  es la distancia dipolo-dipolo entre el donador y el aceptor,  $r_0$  es la distancia en la cual ocurre el 50% de eficiencia FRET. La ecuación 4 define  $r_0$  en donde,  $\kappa^2$ , es el factor de orientación interdipolo (asumiendo que es  $2/3$ , que es el valor promedio de todas las orientaciones posibles de un dipolo antes de la transferencia de energía) y no aplica para las proteínas autofluorescentes debido a que no experimentan mucha difusión rotacional durante el breve tiempo de vida del estado excitado.  $n$  es el índice de refracción del medio circundante del fluoróforo,  $\phi_D$ , es el rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor.  $f_D(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia corregida del donador en la longitud de onda ( $\lambda$ ).  $\epsilon_A$  es el coeficiente de extinción molar del aceptor ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) en la longitud de onda. La integral ( $\int$ ) representa la superposición espectral entre la emisión del donante y la excitación del aceptor.

Por otro lado, para la detección de eventos celulares con alta sensibilidad se utiliza el rango dinámico de FRET (Ecuación 5), que se refiere al rango de la eficiencia de FRET (E) en el que opera un reportero dado (Bajar *et al.*, 2016).

*Ecuación 5. Rango dinámico de FRET*

$$\frac{(E_{max} - E_{min})}{E_{min}}$$

Donde  $E_{min}$  y  $E_{max}$  son el mínimo y máximo de E de un biosensor FRET, respectivamente. La eficiencia FRET y el rango dinámico están relacionados por una curva sigmoide con la pendiente mayor en su punto medio ( $E=0.5$  y  $r = r_0$ ). De tal forma, se debe usar un par FRET con un  $r_0$  que se aproxime al  $r$  en el que opera un

biosensor FRET determinado, con el fin de maximizar el rango dinámico FRET (Bajar *et al.*, 2016).

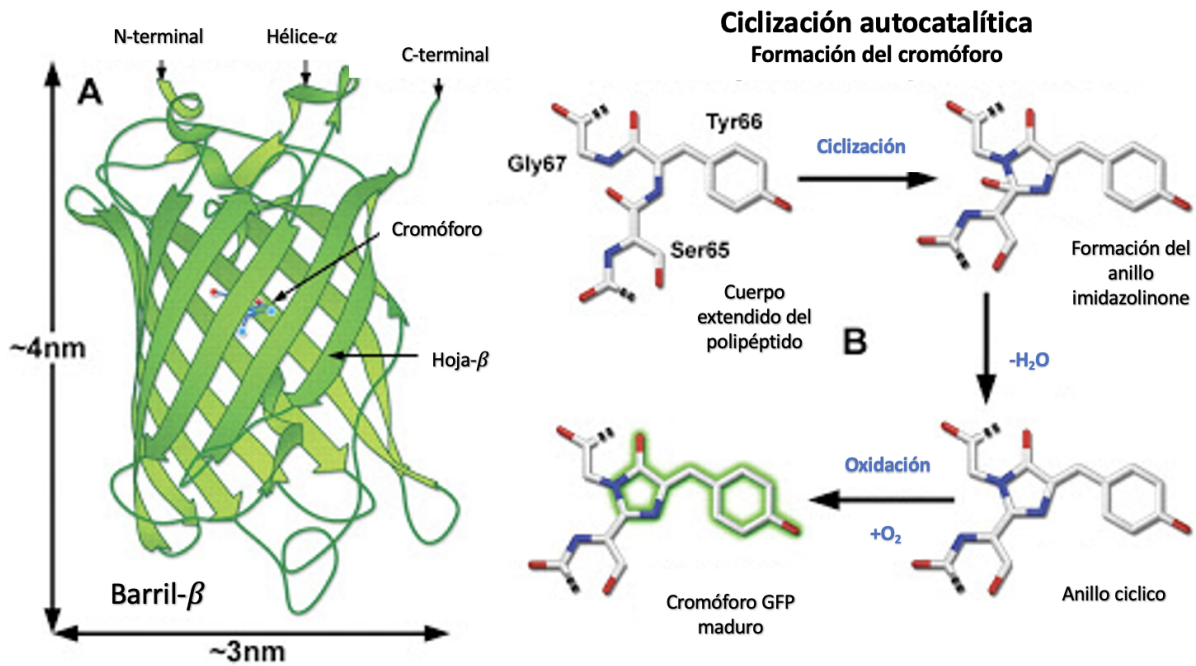
Por otro lado, también se han reportado otras formas de evaluar FRET, por ejemplo, mediciones de la eficiencia de FRET (E) en diferentes estados a través de imágenes espectrales (siFRET, por sus siglas en inglés), fotoblanqueo del aceptor (apFRET, por sus siglas en inglés) y el tiempo de vida de fluorescencia (FLIM-FRET).

Los biosensores fluorescentes basados en FRET presentan ventajas ya que pueden incorporarse fácilmente a células, tejidos o incluso a organismos completos. Una vez dentro, los biosensores permiten obtener imágenes en tiempo real y de forma no destructiva, pueden diseñarse biosensores que se dirijan a sitios específicos en la célula ya sea con una señal de localización o bien fusionando el biosensor a una proteína que se localiza en un dominio específico. Durante la construcción de un biosensor FRET la selección del par es importante considerar las características de las proteínas fluorescentes, las cuales que deben seguir los parámetros para obtener una eficiencia FRET adecuada, como se describe en la siguiente sección.

### **1.7.1 Características estructurales y propiedades de las proteínas fluorescentes**

La primera proteína fluorescente (FP, *Fluorescent proteins*) se purificó en 1968 por Osamu Shimomura en *Aequorea victoria*. Se descubrió que esta proteína, llamada *Aequorea green*, era una proteína capaz de absorber luz azul y emitir fotones de luz verde, así que finalmente se le denominó proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*). La proteína GFP contiene 238 aminoácidos con un arreglo tridimensional de cuatro hélices-alfa, once cadenas beta antiparalelas y varias hebras que son articuladas por bucles, formando un barril en forma de cilindro (Wang *et al.*, 2023). El tripéptido SYG (residuos 65-67) ubicado en el centro del barril sufre una ciclación autocatalítica, seguido de la oxidación del enlace C $\alpha$ -C $\beta$  de Y66 para obtener la forma final del fluoróforo (*p-hidroxibencildeno-imidazolinona*) de la proteína correctamente plegada (Figura 8) (Wang *et al.*, 2023).





**Figura 8.** **A.** Estructura tridimensional de la proteína verde fluorescente (PDB:1EMG). **B.** Ciclización de la proteína verde fluorescente (GFP) para la formación del fluoróforo (Modificado de Zeiss-Campus).

Diferentes estudios han demostrado que algunas mutaciones en la proteína GFP mejoran la eficiencia de emisión de fluorescencia (Wang *et al.*, 2023). Por ejemplo, mutaciones en los sitios S65T y F64L aceleran el plegamiento de la proteína, fenómeno conocido como maduración, generando así la proteína conocida como proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Asimismo, nueve mutaciones S30R, Y39N, F99S, N105T, Y145F, M153T, V163A, I171V y A260V mostraron resistencia de la GFP a pH ácidos, un mayor brillo y una rápida maduración (Wang *et al.*, 2023). También, a través de mutaciones en el sitio tripéptido del fluoróforo de GFP (SYG) se han obtenido diferentes proteínas fluorescentes (Wang *et al.*, 2023) que muestran variedad de colores. Precisamente debido a estas mutaciones, las proteínas fluorescentes presentan diferentes propiedades ópticas que deben ser consideradas para el diseño y construcción de un biosensor fluorescente. A continuación, se presentan algunas de las propiedades más relevantes a sopesar.

*Brillo.* El brillo es el número promedio de fotones por segundo emitidos por las proteínas fluorescente y está determinado por la velocidad de maduración, el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) (mide la capacidad de una proteína fluorescente para absorber luz en una longitud de onda), el rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) (eficiencia de la luz absorbida convertida en luz emitida) y los niveles de expresión.

*Fotoestabilidad.* La fotoestabilidad es la capacidad del cromóforo de mantener la emisión repetida de fotones bajo la luz de excitación (Mamontova *et al.*, 2017). La fotoestabilidad se puede afectar tras una excitación prolongada. Este proceso fotoquímico, conocido como fotoblanqueo, conduce a una destrucción irreversible de la conjugación electrónica del enlace pi ( $\pi$ ) del cromóforo (Mamontova *et al.*, 2017). Por lo tanto, la fotoestabilidad depende de la potencia de iluminación del equipo, y se debe ser considerado para la selección de proteínas fluorescentes. El mecanismo molecular por el que ocurre el del fotoblanqueo es poco claro. Sin embargo, se ha reportado que la reacción del cromóforo con oxígeno molecular favorece el fotoblanqueo del cromóforo, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), generan toxicidad en la célula.

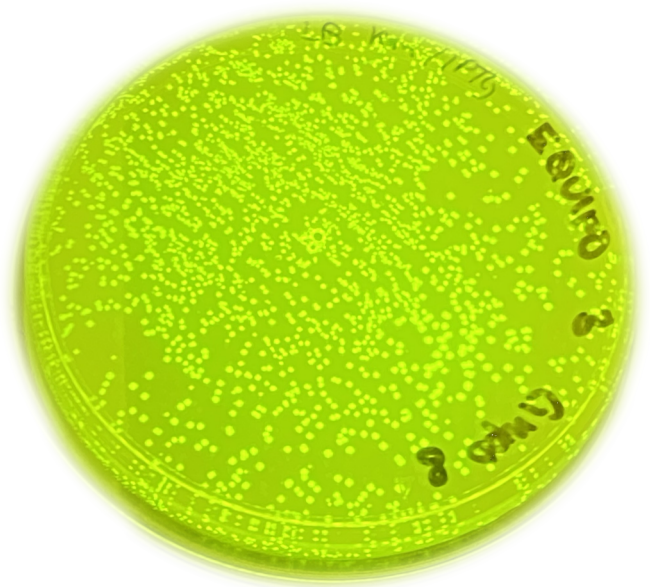
*Oligomerización.* La mayoría de las proteínas fluorescentes son diméricas o tetraméricas. La oligomerización es una propiedad que se debe de considerar cuando se fusiona una proteína huésped que se dirige a una ubicación subcelular específica, ya que la oligomerización de la proteína fluorescente y la proteína huésped pueden producir una localización atípica, interrumpir la función normal o restringir la agregación del producto de fusión dentro de un organelo (Zeiss web page). Sin embargo, las proteínas fluorescentes se pueden diseñar en monómeros (Shaner *et al.*, 2005).

### **1.7.2 *mTurquoise2* y *mNeonGreen* como par FRET en células de plantas**

El uso de proteínas fluorescentes mejoradas permite la obtención de imágenes en diferentes organismos lo que facilita el seguimiento y la identificación de estructuras específicas. Sin embargo, la obtención de imágenes en tejido vegetal es un desafío debido a compuestos que generan autofluorescencia, por ejemplo, la clorofila. También, ciertos compartimentos en la célula vegetal como la vacuola

exhiben pH ácidos lo cual limita la funcionalidad de las proteínas fluorescentes debido a que condiciones ácidas reducen la fluorescencia de las proteínas fluorescentes (Stoddard y Rolland, 2019). En el trabajo de Stoddard y Rolland demuestran que en apoplasto de hojas de *N. benthamiana* las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen son pH estables (pH~4) y no forman oligómeros, contrario a la proteína fluorescente citrina (Stoddard y Rolland, 2019). Asimismo, las proteínas mTurquoise2 y mNeonGreen son proteínas que presentan mayor brillo que mCerulean3 y Citrina, propiedad que permite disminuir la relación señal-ruido. Finalmente, Denay y colaboradores (2019) mostraron que el par FRET mTurquoise2-mNeonGreen exhibe mayor eficiencia FRET que otros pares FRET en células epidérmicas de hojas de *N. benthamiana*.

## Antecedentes



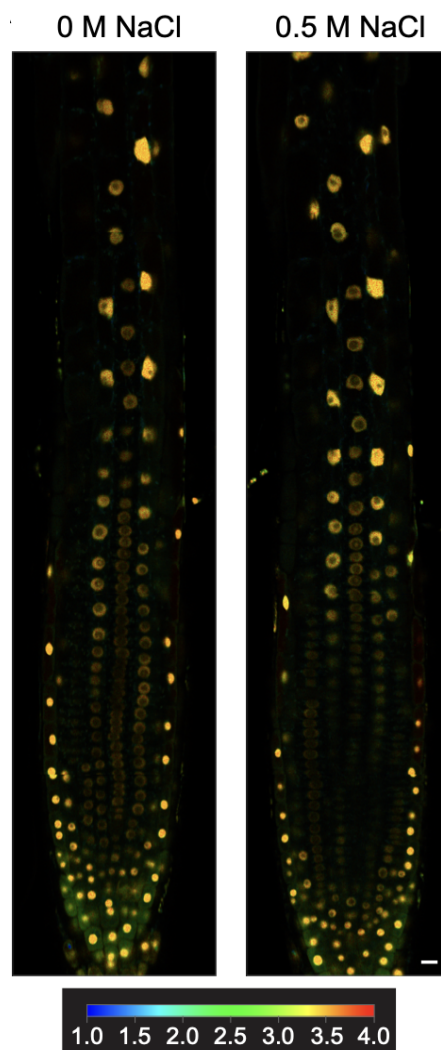
## 2. Antecedentes

A la fecha, los mecanismos de percepción del déficit hídrico en las plantas son poco claros debido a su complejidad y a la ausencia de herramientas y metodologías confiables para monitorear los efectos del estrés osmótico en tiempo real y de manera no destructiva (Haswell & Verslues, 2015).

Los biosensores fluorescentes codificados genéticamente han demostrado ser buenas herramientas para monitorear y cuantificar diversos procesos biológicos *in vivo* (Greenwald *et al.*, 2018). Además, permiten estudios en tiempo real de algunos procesos del metabolismo celular con una alta resolución espacial y temporal (Ovechkina *et al.*, 2021). Por tal motivo, los biosensores se presentan como excelentes candidatos para monitorear dinámicamente la pérdida y entrada de agua que conlleva un amontonamiento macromolecular y/o estrés osmótico en células vivas. Sin embargo, las aplicaciones de biosensores en plantas han sido comparativamente pocas en comparación con los sistemas de mamíferos. Recientemente, nuestro laboratorio desarrolló un biosensor fluorescente tipo FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*) que es capaz de reportar los efectos del estrés osmótico en diferentes organismos incluyendo levaduras, bacterias, plantas y células humanas (Cuevas-Velazquez *et al.*, 2021). Este biosensor, conocido como SED1 (*Sensor Expressing Disordered protein 1*), utiliza una proteína intrínsecamente desordenada de plantas que cambia de estructura dependiendo de la osmolaridad y el amontonamiento macromolecular del ambiente. Específicamente, el dominio sensor está constituido por la proteína AtLEA4-5, perteneciente al grupo 4 de las proteínas LEA de la planta modelo *A. thaliana*.

Si bien SED1 es una herramienta muy poderosa para estudiar la disponibilidad de agua en múltiples organismos, presenta algunas limitaciones que se revelaron al expresarlo en *A. thaliana*, en donde no responde a los choques osmóticos (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021) (Figura 9). Puesto que la AtLEA4-5 que conforma a SED1 funciona naturalmente en *A. thaliana*, la falta de respuesta podría ser el resultado de características asociadas a su función en esta especie. Por ejemplo, la localización subcelular de SED1 y/o modificaciones post-traduccionales de AtLEA4-5 y/o interacciones con blancos naturales, etc. Debido a que las proteínas LEA en su mayoría se localizan en el núcleo y citoplasma, compartimentos en donde podría interaccionar con dianas endógenas, o en donde se podrían llevar a cabo PTMs,

ambas situaciones podrían prevenir la compactación inducida por estrés hiperosmótico/iónico de la región en SED1 (Mergner *et al*, 2020). Otra posibilidad para la falta de respuesta en *A. thaliana*, es el par FRET utilizado en SED1 (mCerulean3 y Citrina). En particular, podría existir una limitación para la molécula donadora mCerulean3, debido a que se ha demostrado que es una proteína de maduración lenta (Denay *et al.*, 2019). Asimismo, mCerulean3 muestra un fotoblanqueo rápido en células vegetales, lo cual afecta directamente la estimación del cociente de FRET (Denay *et al*, 2019). Debido a las limitaciones descritas anteriormente, en este proyecto proponemos modificar diferentes características de SED1 con la idea de generar versiones mejoradas que permitan cuantificar los cambios en osmolaridad y amontonamiento macromolecular en plantas y poder seleccionar un candidato que funcione en *A. thaliana*.



**Figura 9.** Respuesta de SED1 en raíces de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones estándar (0 M NaCl) y condiciones de estrés osmótico (0.5 M NaCl). La señal se encuentra localizada en el núcleo debido a una señal de localización nuclear. Escala=  $10\mu m$ . La escala de calibración representa el tiempo de vida de la fluorescencia del donador en nanosegundos (ns). (Tomado de Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021).

## Hipótesis y objetivos



### **3. Hipótesis**

La modificación de aminoácidos potencialmente fosforilables y/o el cambio del par FRET de SED1 resultará en un biosensor capaz de expresarse y responder a choques hiperosmóticos/iónicos en células vegetales.

### **4. Objetivo general**

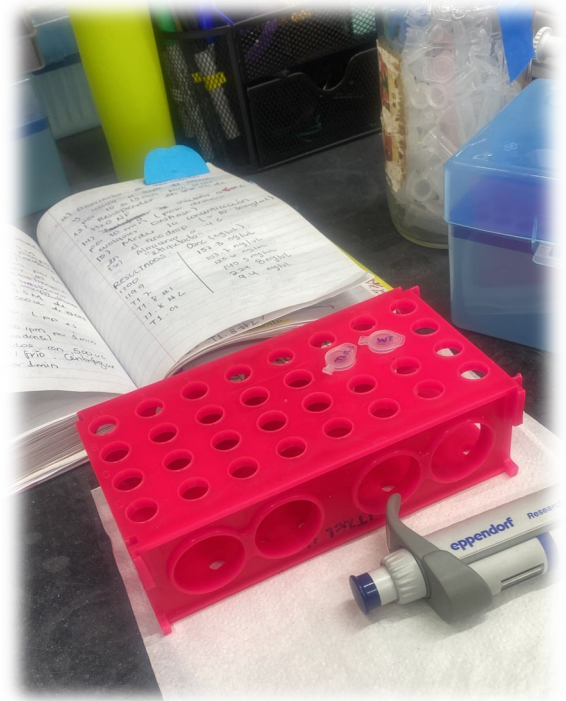
Generar un biosensor de estrés osmótico para plantas con mejores características reporteras que el biosensor SED1 a partir de la modificación de diversos componentes de SED1.

### **5. Objetivos específicos**

1. Generar una versión de SED1 incapaz de ser fosforilada.
2. Caracterizar la respuesta de la versión del biosensor incapaz de ser fosforilada en respuesta a estrés osmótico/iónico en células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* y células de plantas de *Nicotiana benthamiana*.
3. Generar una versión de SED1 que utiliza mTurquoise2 y mNeonGreen como par FRET.
4. Caracterizar la respuesta de la versión del biosensor que expresan la variante de SED1 que utiliza mTurquoise2 y mNeonGreen a estrés osmótico/iónico en células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* y células de plantas de *Nicotiana benthamiana*.
5. Obtener líneas transgénicas heterocigotas (T1) de *Arabidopsis thaliana* que expresan el nuevo biosensor.



## Materiales y métodos



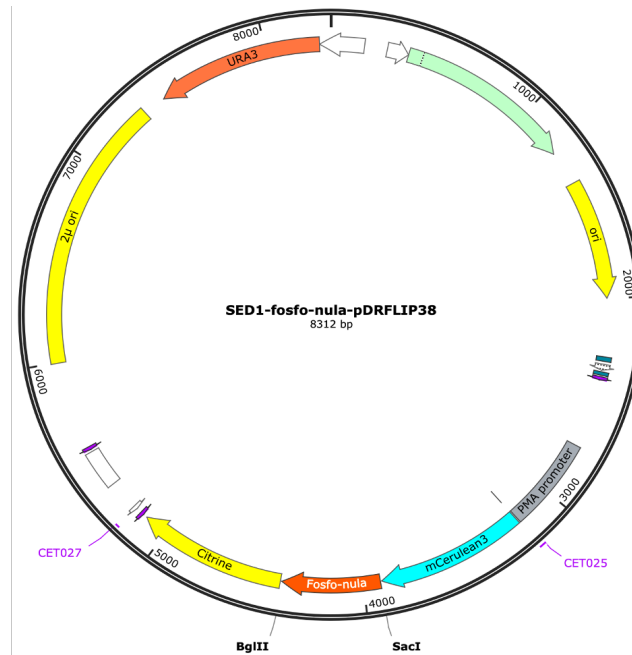
## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Construcción de los diferentes plásmidos de las distintas versiones de SED1

En esta tesis se diseñaron y construyeron dos versiones de SED1 para su expresión en células de levadura y células de plantas.

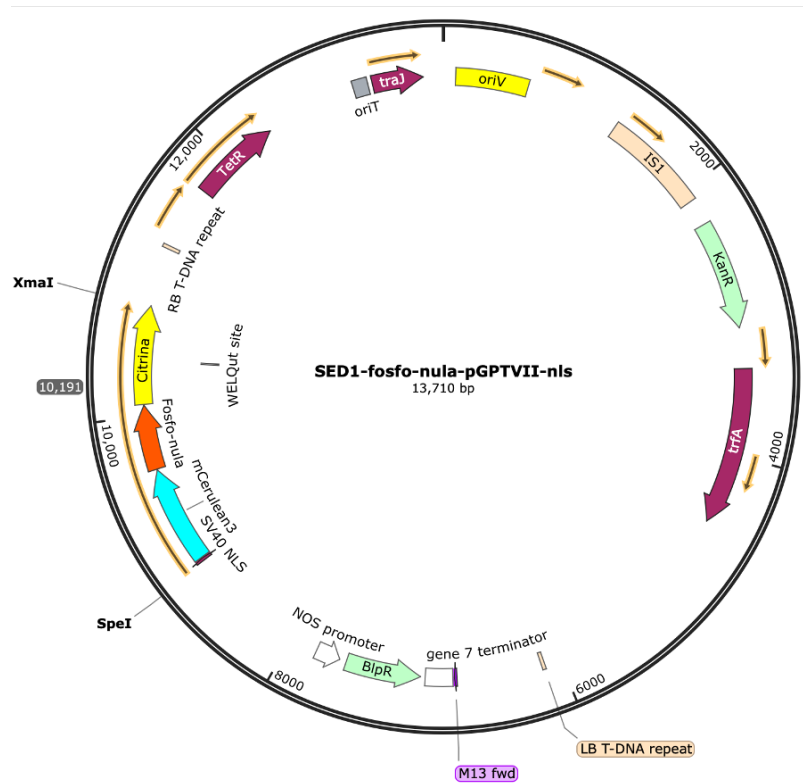
#### **SED1-fosfo-nula (SED1-FN)**

La versión SED1-fosfo-nula se diseñó y obtuvo previamente al trabajo de tesis por Cuevas-Velázquez *et al.* (2021), la cual se introdujo en un vector para expresión en levadura. Brevemente, utilizando como templado el plásmido pDRFLIP38-AtLEA4-5 de SED1, que contiene a el promotor constitutivo pPMA1 (región promotora de la H<sup>+</sup> ATPasa de tipo 2 de la membrana plasmática) y el marco abierto de lectura (ORFs, *Open Reading Frame*) de mCerulean3-AtLEA4-5-Citrina. El vector pDRFLIP38-AtLEA4-5 se digirió con *SacI* y *BglII* para eliminar el ORF de AtLEA4-5. La secuencia codificante de AtLEA4-5(fosfo-nula) se obtuvo a partir de la síntesis *de novo* de la región codificante para AtLEA4-5 modificada, reemplazando todos los codones que codifican para residuos de serina, treonina y tirosina (residuos potencialmente fosforilables) por codones que codifican para alaninas (GenScript). Esta secuencia se introdujo entre las secuencias correspondientes a los ORFS para las proteínas fluorescentes (mCerulean3 y Citrina) mediante Gibson Assembly (Figura 10). La clonación por Gibson Assembly es un método para el fácil ensamblaje de múltiples fragmentos lineales de DNA. Independientemente de la longitud del fragmento, se pueden unir múltiples fragmentos de DNA superpuestos en una única reacción isotérmica (Gibson *et al.*, 2009). A esta nueva proteína quimérica se le llamó SED1-fosfo-nula (SED1-FN).



**Figura 10.** Plásmido pDRFLIP38-AtLEA4-5(FN) de expresión en levadura. Contiene mCerulean3-AtLEA4-5 (fosfo-nula)-Citrina. Obtenido del trabajo de Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021.

Por otro lado, para la expresión de SED1-fosfo-nula en plantas se utilizó como templado el plásmido pGPTVII-nlsSED1 reportado por Cuevas-Velázquez *et al* (2021) que contiene un promotor constitutivo pUBQ10, una señal de localización en núcleo en el extremo 5' y el marco abierto de lectura para la proteína mCerulean3-AtLEA4-5-Citrina. El vector (pGPTVII-nlsSED1) fue digerido con *SpeI* y *XmaI* para remover el marco abierto de lectura de SED1. Se realizó la purificación de la banda del vector abierto con el paquete para recuperación de gel Zymo Research. Por otro lado, la secuencia codificante de SED1-fosfo-nula (mCerulean3-AtLEA4-5-fosfo-nula-Citrina), proveniente del vector de levadura pDRFLIP38-AtLEA4-5(FN), se amplificó mediante PCR usando una *Taq* polimerasa de alta fidelidad (*Taq Platinum*) y usando oligonucleótidos específicos que contenían en sus extremos los sitios de restricción *SpeI* y *XmaI* (ver Anexos Tabla 1). Posteriormente, se clonaron mediante Gibson Assembly (ver Anexos 12.2). La construcción final cuenta con el marco abierto de AtLEA4-5(fosfo-nula) posicionado entre los ORFs para las proteínas fluorescentes mCerulean3 y Citrina (Figura 11).



**Figura 11.** Plásmido pGPTVII-nlsSED1(FN) de expresión en plantas con señal de localización en núcleo. Contiene mCerulean3-AtLEA4-5 (fosfo-nula)-Citrina.

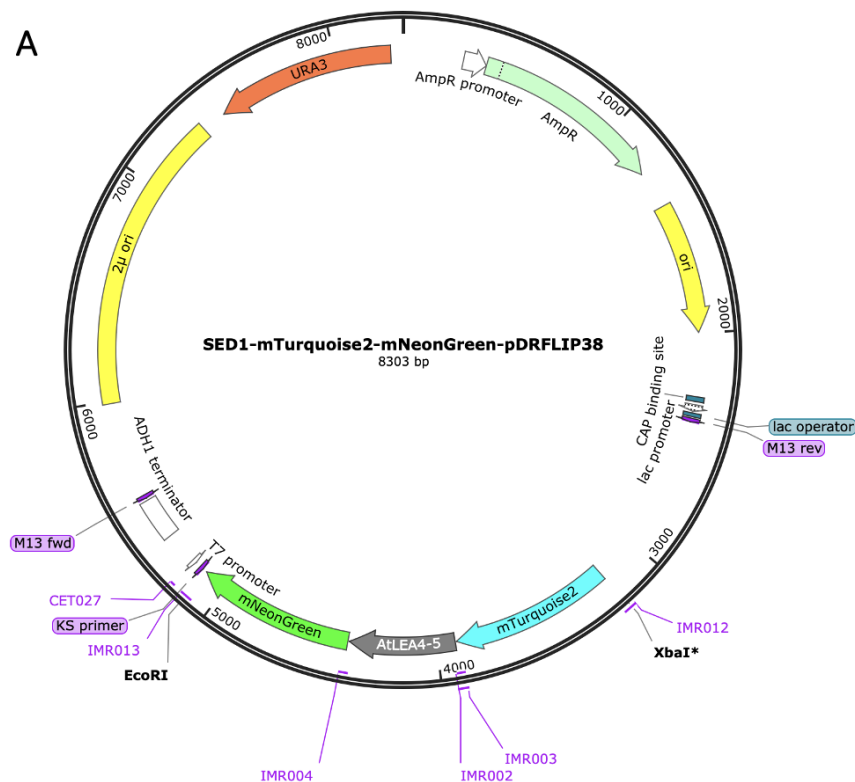
### ***SED1-mTurquoise2-mNeonGreen (SED1-mTq2-mNG)***

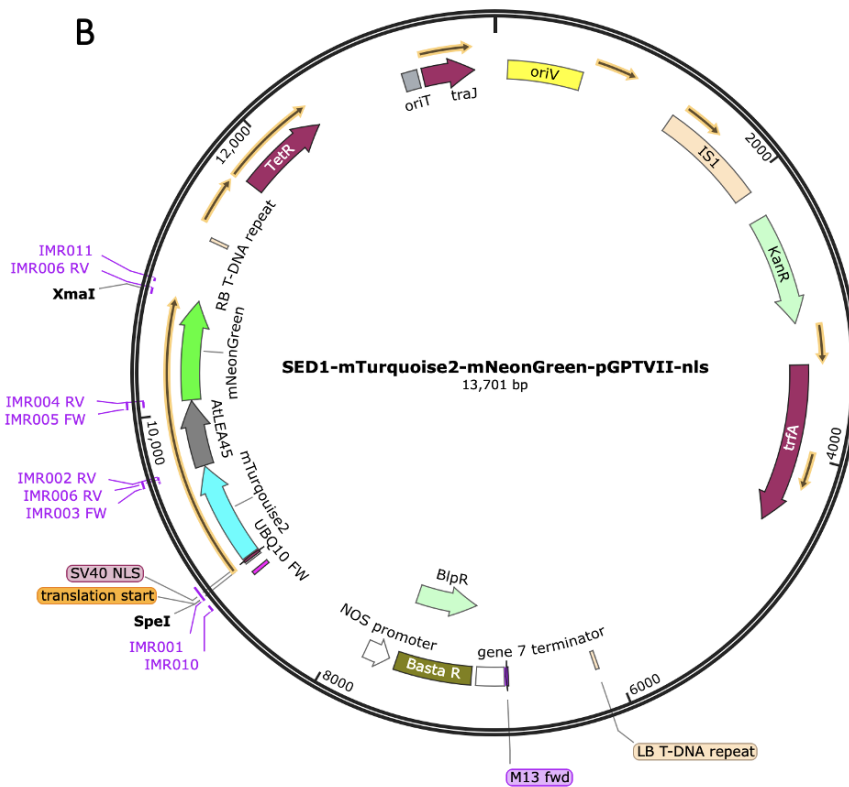
El biosensor SED1-mTurquoise2-mNeonGreen se obtuvo a partir del vector pDRFLIP38-AtLEA4-5 de pSED1. Para ello, se transformó la cepa GM2163 de *Escherichia coli* (*dam-/dcm-*) con pSED1. El vector se digirió con XbaI y EcoRI, para remover el ORF de SED1 (mCer3-AtLEA4-5-Cit). Se realizó la purificación de la banda del vector abierto con el paquete para recuperación de gel Zymo Research. Posteriormente, se realizó la clonación mediante Gibson Assembly de la secuencia completa purificada de mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen, obtenida mediante una PCR sobrepuesta (ver Anexo 12.1) usando oligonucleótidos específicos (ver Anexo Tabla 1) que contenían en sus extremos los sitios de restricción para XbaI y EcoRI.

Para la obtención de la versión de SED1-mTurquoise2-mNeonGreen para su expresión en plantas se utilizó como templado el plásmido pGPTVII-nlsSED1. Se realizó la digestión del vector con SpeI y XmaI y se purificó la banda con el tamaño esperado. Las secuencias codificantes para mTurquoise2, AtLEA4-5 y mNeonGreen se aislaron individualmente por PCR usando oligonucleótidos específicos (ver Anexo

Tabla 1). Posteriormente mediante una PCR sobrepuesta (ver Anexo 12.1), usando oligonucleótidos específicos, se realizó el ensamblaje de las tres secuencias codificantes para obtener el fragmento completo correspondiente mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen. Se realizó la purificación de la banda del fragmento completo con el paquete de recuperación de gel de Zymo Research y se clonó mediante Gibson Assembly.

La estructura de SED1-mTurquoise2-mNeonGreen cuentan con el marco abierto de lectura de la proteína AtLEA4-5 posicionada entre los ORFs para las proteínas fluorescentes (mTurquoise2 y mNeonGreen) en el vector de expresión en levadura (pDRFLIP38-AtLEA4-5) como en el de plantas (pGPTVII-nlsSED1) (Figura 12).





**Figura 12. A.** Plásmido pDRFLIP38-AtLEA4-5 de expresión en levadura que contiene mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen. **B.** Plásmido pGPTVII-nlsSED1 de expresión en plantas con señal de localización en núcleo (NLS, por sus siglas en inglés) que contiene mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen.

## 6.2 Expresión de las nuevas versiones de SED1 en células de levadura y de planta.

### Células de bacteria

Todos las construcciones fueron expresados en *Escherichia coli* (One Shot Mach 1) mediante el método de transformación por choque térmico (ver Anexo 12.3). Las colonias transformadas con cada construcción se seleccionaron con el antibiótico correspondiente y se corroboraron por PCR de colonia usando oligonucleótidos específicos y condiciones de amplificación adecuadas para cada construcción. Asimismo, se verificaron por secuenciación en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente, para cada construcción se extrajo DNA plasmídico con el paquete Zymo Research miniprep.

### Células de levadura

Los plásmidos que derivaron del vector pDRFLIP38-AtLEA4-5 de SED1 se expresaron en la cepa BJ5464 de *S. cerevisiae* mediante el método de transformación por choque térmico (ver Anexo 12.3). Las colonias transformadas se seleccionaron por complementación de la auxotrofia de uracilo. La presencia del plásmido se verificó mediante la emisión de fluorescencia en placa incidiendo luz azul y por PCR de levadura.

### Células de plantas

Los plásmidos derivados del vector pGPTVII-nlsSED1 se introdujeron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de transformación por choque térmico (ver Anexo 12.3). Las colonias transformadas se seleccionaron rifampicina (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Las colonias se corroboraron por PCR de colonia y secuenciación.

## **6.3 Transformación de tejido vegetal de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*.**

### Ensayo de expresión transitoria en *N. benthamiana*

Se realizó un ensayo de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* (ver Anexo 12.4). Cinco días después de la infiltración las hojas que mostraban fluorescencia se observaron mediante un transiluminador de luz azul sin cortar la hoja.

### Transformación mediante inmersión del meristemo floral de *A. thaliana*

La transformación de *A. thaliana* se realizó mediante el método de inmersión del meristemo floral (ver Anexo 12.5). Tras la obtención de semillas T0, las semillas transformadas se seleccionaron en medio Murashige Skoog (MS) suplementado con glufosinato de amonio (BASTA) (30mM) y ampicilina (10 µg/mL). Las plántulas que desarrollaron el primer par de hojas verdaderas se crecieron en sustrato y se corroboró la inserción del fragmento de DNA de interés mediante PCR a partir de un extracto de tejido vegetal (ver Anexo 12.6).

#### **6.4 Análisis de fluorescencia en células de *Saccharomyces cerevisiae***

Las determinaciones de FRET a partir de las células que expresaban el biosensor a evaluar, se realizaron a partir de cultivos crecidos en 3mL de medio SD-ura a 30°C, 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 1-2 a una longitud de onda de 600 nm ( $OD_{600}$ ). Posteriormente, se centrifugaron los 3 mL a 12,000 rpm y las células de levadura se con 3 mL de medio MES 50 mM pH 6. Las células se transfirieron a un reservorio de plástico estéril de 25 mL. Posteriormente, se tomaron 50  $\mu$ L del cultivo y se colocaron en los pozos de una placa de 96 pozos con fondo transparente. Cada tres pozos contenían: 150  $\mu$ L MES (0M NaCl), 100  $\mu$ L MES + 50  $\mu$ L NaCl (0.5 M NaCl), 50  $\mu$ L MES + 100  $\mu$ L NaCl (1.0 M NaCl) y 150  $\mu$ L NaCl (2.0 M NaCl). Un minuto después de la aplicación del tratamiento con NaCl, se midió el espectro de emisión de fluorescencia usando el lector de placas Clario Star. La longitud de onda de excitación fue de 433 nm y la de emisión 460-550 nm. El ancho de banda utilizado en la excitación emisión fue de 10 nm. Como referencia en estos experimentos se utilizaron células de levadura con SED1 de acuerdo con el trabajo de Cuevas-Velázquez *et al* (2021). Se realizaron tres repeticiones independientes con tres réplicas biológicas de las mediciones por cada constructo.

#### **6.5 Análisis de fluorescencia de hojas de *Nicotiana benthamiana***

Para la medición de la fluorescencia en hojas de *N.benthamiana* se obtuvieron pequeños discos de las hojas transformadas transitoriamente de forma independiente con las construcciones de interés. Los discos se colocar en los pozos de una placa de 96 pozos con fondo transparente. De 12 pozos, 6 pozos contenían 50  $\mu$ L de agua y los otros 6 contenían 50  $\mu$ L de 0.5 M NaCl. Inmediatamente después de la adición de las soluciones, se midió la fluorescencia usando el lector de placas Clario Star (tiempo 0). La longitud de onda de excitación fue de 433 nm y la de emisión de 460-550 nm. El ancho de banda utilizado en la excitación de emisión fue de 10 nm. Las mediciones se realizaron cada 30 minutos por un periodo de 90 minutos.



## **6.6 Microscopía de fluorescencia de células de *Saccharomyces cerevisiae***

Se cultivaron 3 mL de cultivo de levaduras que expresan las dos versiones de SED1 individualmente a 30°C en medio YNB (6.8 g/L) suplementado con glucosa y 1.92 g/L de medio synthetic dropout sin uracilo hasta llegar a una OD<sub>600</sub> de ~1-2. Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con buffer 50 mM MES, pH 6 y se resuspendieron en 3 mL del mismo buffer. Un volumen de 100 µL de células se cargaron en una cámara de microscopía µ-Slide 8 well ibidi chamber y se mezclaron con 100 µL de la solución del tratamiento (NaCl 2.0 M). La observación en el microscopio se realizó inmediatamente después del tratamiento.

La toma de imágenes se realizó en un microscopio confocal Olympus FV1000 invertido (Equipo proporcionado por el LNMA), utilizando un objetivo UPLSAPO 60 X/1.30 NA oil. Tres secuencias de imágenes fueron adquiridas. Emisión del donador - excitación del donador (DxDm, canal del donador), emisión del aceptor - excitación del donador (DxA<sub>m</sub>, canal FRET) y emisión del aceptor - excitación del aceptor (AxAm, canal del aceptor). Para el canal DxDm, excitación = 405 nm; emisión = 461 nm. Para el canal DxA<sub>m</sub>, excitación = 405 nm; emisión = 520 nm. Para AxAm, excitación=488 nm; emisión=520 nm.

## **6.7 Microscopía de fluorescencia de hojas de *Nicotiana benthamiana***

Las hojas de *N. benthamiana* fueron transformadas mediante un ensayo de expresión transitoria. Cinco días después de su infiltración se realizaron pequeños cortes de la hoja y se colocaron en un portaobjetos de vidrio. A la hoja se le añadió una gota de agua y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio.

La toma de imágenes se realizó en un microscopio confocal Olympus FV1000 invertido (Equipo proporcionado por el USAII), utilizando un objetivo UPLFLN 40 X/1.30 NA oil. La imagen fue tomada con una excitación = 473 nm; emisión = 573 nm. Se adquirieron 5 imágenes de 5 diferentes campos de visión.

## **6.8 Análisis de imágenes de células de *Saccharomyces cerevisiae***

El análisis de imágenes se realizó con la paquetería FIJI de Image J (<https://fiji.sc/>). Brevemente, se aplicó una suma de proyecciones en Z de las imágenes y se eliminó el ruido de la imagen aplicando un filtro Gaussiano de 1 en todas las imágenes. Se dividieron las imágenes de los canales DxA<sub>m</sub>/ DxDm. La imagen DxDm se utilizó para crear una máscara. La imagen de relación DxA<sub>m</sub>/DxDm

se multiplicó por la máscara, se dividió 255 y se ajustó el rango de intensidad para todas las imágenes. Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia por célula se aplicó *Analyze Particles*. Posteriormente, se cuantificó el *mean gray value* el cual es proporcional a la intensidad de fluorescencia de las células de levadura. Los datos se seleccionaron con ROI manager y se graficaron.

### **6.9 Análisis de imágenes de hojas de *Nicotiana benthamiana***

El análisis de imágenes fue realizado con la paquetería FIJI de Image J (<https://fiji.sc/>). Brevemente, para observar los núcleos de la hoja de *N. benthamiana*. Se ajustó el brillo y contraste de la imagen, el color de la imagen seleccionando la opción *Look up tables >> Green*.

### **6.10 Selección de líneas transgénicas T1 de *Arabidopsis thaliana***

Las plantas transformadas con la construcción SED1-mTurquoise2-mNeonGreen fueron consideradas la generación T0; Estas se dejaron crecer hasta obtener semillas consideradas generación T1. Las semillas T1 se seleccionaron en medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con glufosinato de amonio (BASTA) (10 mg/L), inhibidor de la enzima glutamino sintetasa que cataliza la desintoxicación de amonio en las células.

A las plántulas T1 que sobrevivieron a BASTA, se les consideró líneas transgénicas independientes, es decir, que cada individuo representa un evento diferente de inserción del constructo en el genoma de la planta. De esta generación se seleccionaron al menos 5 plántulas resistentes de cada construcción para su posterior siembra en tierra y genotipificación.

### **6.11 Genotipificación de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

Brevemente, con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) se extrajo DNA de plántulas de 2-4 semanas (ver Anexo 12.6). El DNA purificado se verificó por PCR con los oligos IMR010 e IMR011. Las líneas transgénicas positivas se crecieron en un fotoperíodo corto (8h luz / 16h oscuridad) para obtener semillas T2.

### **6.12 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con ANOVA de una o dos vías para los experimentos con más de dos muestras o tratamientos con la prueba de Tukey. En los experimentos con dos muestras los datos se analizaron con la prueba t de student no pareada. Los símbolos \*, \*\* y \*\*\* indican los valores de  $p < 0.05$ ,  $0.01$  y  $0.001$ , respectivamente.

## Resultados



## 7. Resultados

### 7.1 Análisis *in silico* de una versión de SED1 incapaz de ser fosforilada

De acuerdo con Mergner *et al* (2020), las proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana* se encuentran fosforiladas en casi todos los residuos de serina, treonina y tirosina. En esta tesis hipotetizamos que las cargas negativas introducidas por las posibles fosforilaciones en células de *A. thaliana* interfieren en la compactación del ensamblaje de la proteína AtLEA4-5 en respuesta al choque osmótico. Por tal motivo, se utilizó una variante incapaz de ser fosforilada nombrada SED1-fosfo-nula (SED1-FN) que fue construida previamente en el trabajo de Cuevas-Velázquez *et al* (2021). SED1-FN es una versión a la cual se le reemplazaron todos los residuos de serina, treonina y tirosina por residuos de alanina (Figura 13). Mediante predicciones de desorden estructural con PONDR y estructura tridimensional con Alphafold2 observamos que la versión SED1-FN mantiene la estructura desordenada en la región N-terminal (Figura 14, superior) con propensión de formar estructuras alfa-hélice (Figura 14, inferior), estructura principal que forman las proteínas LEA 4 bajo condiciones limitantes de agua (Cuevas-Velázquez *et al.*,2017) Por lo tanto, especulamos que la transición estructural ocurriría como en las células de levadura que expresan SED1 (Figura 14).

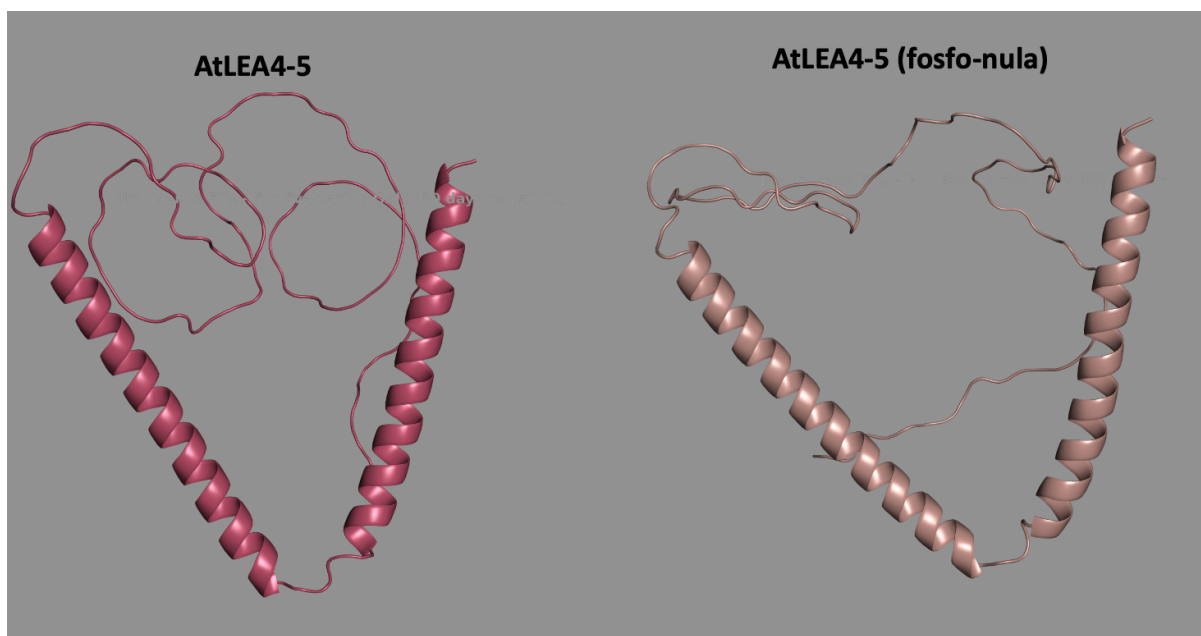
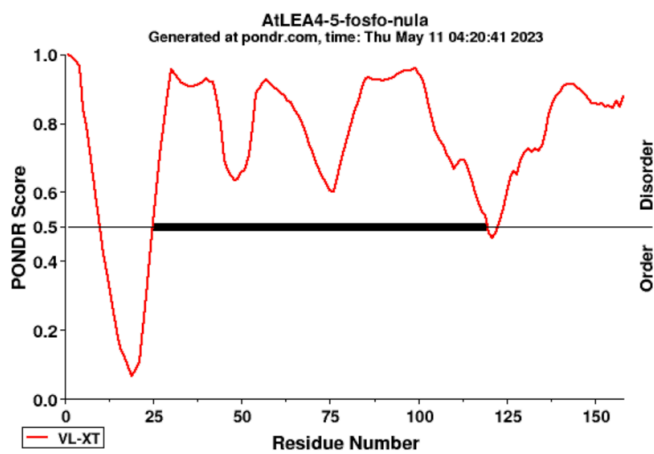
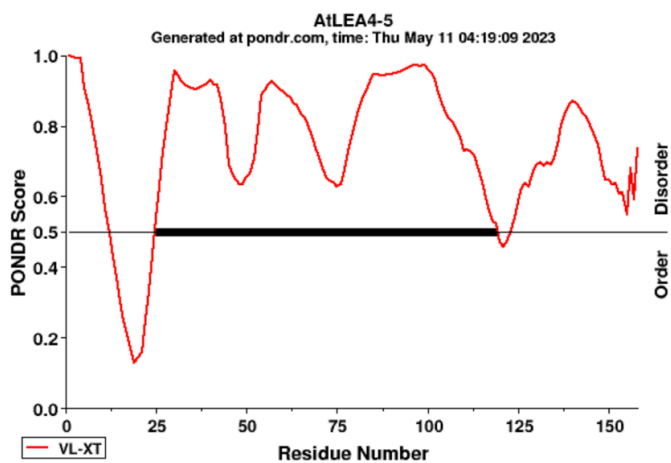
#### AtLEA4-5

MQSMKETASNIAASAKSGMDKTKATLEEKAEKMKTRDPVQKQMATQVKE  
DKINQAEMQKRETRQHNAAMKEAAGAGTGLGLGTATHSTTGQVGHGTGT  
HQMSPALPGHGTGQLTDRVVEGTAVTDPIGRNTGTGRRTAHNTHVGGGGA  
TGYGTGGGYTG

#### AtLEA4-5 (fosfo-nula)

MQAMKEAAANIAAAKAGMDKAKAALEEKAEKMKARDPVQKQMAAQV  
KEDKINQAEMQKREARQHNAAMKEAAGAGAGLGLGAAAHAAAGQVGH  
GAGAHQMAALPGHGAGQLADRVVEGA AVADPIGRNAGAGRAAAHNAH  
VGGGGAAGAGAGGGAAG

**Figura 13.** Secuencia de aminoácidos (158 aminoácidos) de la proteína AtLEA4-5 y AtLEA4-5 (fosfo-nula). AtLEA4-5 (SED1) y AtLEA4-5(fosfo-nula) se utilizaron en este estudio en el biosensor SED1 y SED1-fosfo-nula. Los residuos de aminoácidos marcados en AtLEA4-5: serina (rosa), treonina (rojo) y tirosina (azul) fueron los modificados por alanina (amarillo) para la proteína AtLEA4-5 (fosfo-nula).

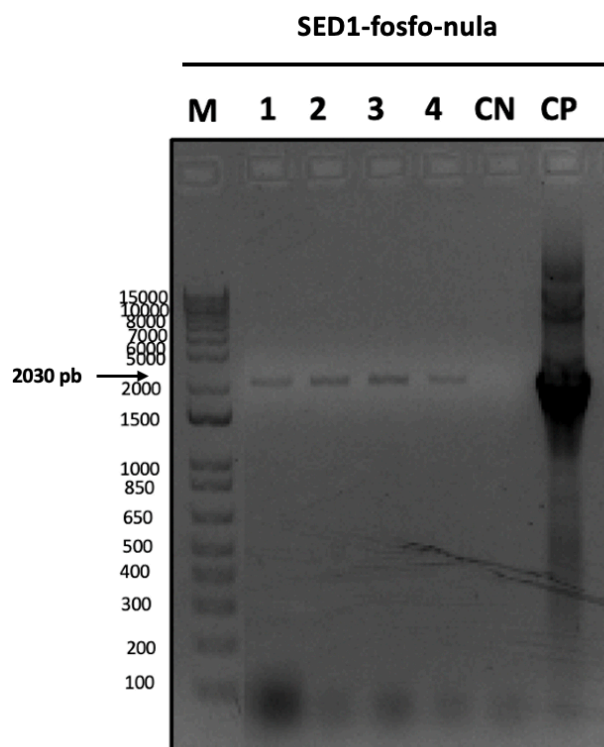


**Figura 14.** Predicción del desorden estructural con el software online (PONDNR) de las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-5 (fosfo-nula) (imagen superior). Predicción del modelo estructural con el software online (AlphaFold2) de las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-5 (fosfo-nula) (imagen inferior).

## 7.2 Obtención de una versión de SED1 incapaz de ser fosforilada

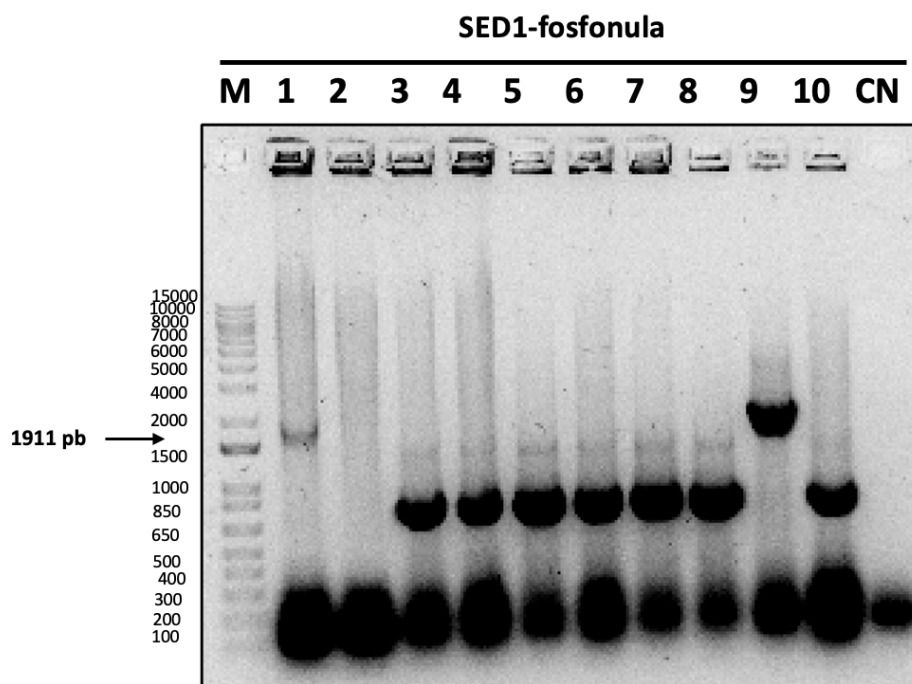
Para la caracterización de SED1-FN, el fragmento de DNA que contiene el ORF para mCerulean3-AtLEA4-5-Citrina se amplificó mediante PCR a partir del vector pDRFLIP38-AtLEA4-5(FN) (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021). Este amplicón se utilizó para transformar células de *S. cerevisiae* BJ5465 (ver Materiales y métodos). Sorpresivamente, las células de levadura que supuestamente expresaban al biosensor SED1-FN y, que se cultivaron bajo condiciones estándar, presentaron una tasa de crecimiento reducida (datos no mostrados). Este resultado muestra que la expresión de este biosensor, que ahora contiene a la proteína AtLEA4-5 no fosforilable, resulta desfavorable para la levadura.

Para determinar si las construcciones con SED1-FN introducidas en las células de levadura que mostraban un fenotipo alterado presentaban una respuesta FRET se seleccionaron cuatro colonias resultantes de la transformación y su DNA se analizó mediante PCR (Figura 15) y secuenciación de DNA. Seleccionamos una colonia para la caracterización en células de levadura bajo condiciones de estrés osmótico.



**Figura 15.** Genotipificación del vector pDRFLIP38-AtLEA4-5 (mTq2-mNG) en colonias de levadura mediante PCR. El fragmento mCerulean3-AtLEA4-5(fosfo-nula)-Citrina (2030 pb) amplificado con los oligonucleótidos CET025 y CET027. M: Marcador 1 kb; Pozos (1-4): Colonias de levadura que expresan SED1-FN; CP: control positivo fragmento de pDRFLIP38-AtLEA4-5 (FN) (Cuevas- Velázquez *et al.*,2021); CN: Control negativo.

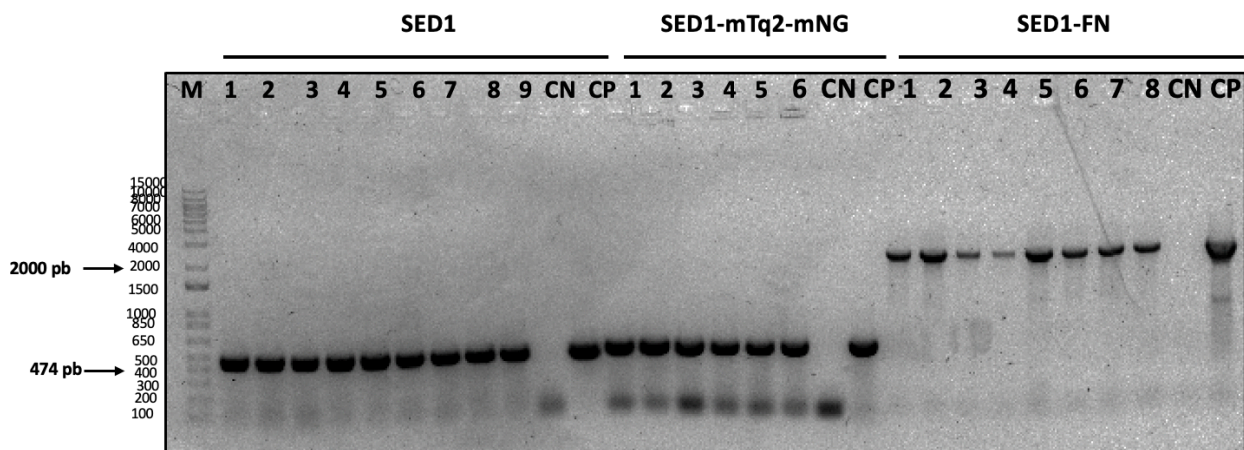
Por otro lado, la versión de SED1-fosfo-nula se insertó, usando Gibson Assembly en el vector de plantas pGPTVII-nlsSED1, el mismo que se utilizó para expresar a SED1 en plantas (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021) (ver Materiales y métodos). Para insertar el fragmento con el ORF de SED1-FN en este vector, el fragmento mCerulean3-AtLEA4-5(fosfonula)-Citrina se amplificó a partir del plásmidos PDRFLIP38-AtLEA4-5(FN), usando oligonucleótidos con homología al vector de plantas localizados en los extremos 5' y 3' y el mix de Gibson Assembly. Tras la transformación de células de *E. coli* (ver Materiales y métodos) se obtuvieron 17 colonias, de estas se evaluaron 10 por medio de PCR de colonia de las cuales dos colonias resultaron positivas (colonia 1 y 9) (Figura 16). La secuenciación del DNA plasmídico de estas dos colonias confirmó que el ensamblaje fue el correcto y demostró que no se generaron mutaciones.



**Figura 16.** Genotipificación de la versión SED1-fosfo-nula en el vector de plantas pGPTVII-nlsSED1(FN) de células de *E. coli* mediante PCR. La banda amplificada con los oligonucleótidos (ver Anexo tabla 1) es de 1911 pb. M: Marcador 1 kb; Pozos (1-10): Colonias de *E. coli*; CN: control negativo.



Una vez confirmadas las secuencias de los plásmidos de interés se realizó la transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* (ver Materiales y métodos). Para ello, se purificó el plásmidos pGPTVII-nls SED1(FN) de la colonia nueve el cual se usó para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (ver Materiales y métodos). Como resultado se obtuvieron ocho colonias, todas ellas, positivas por PCR (Figura 17). Para verificar la identidad e integridad de la secuencia correspondiente al ORF de SED1-FN que se introdujo en *A. tumefaciens*, se obtuvo la secuencia de DNA de la región de interés. A partir de este momento todos los experimentos para la caracterización de la versión SED1-FN se realizaron con las colonias positivas confirmadas por secuenciación.



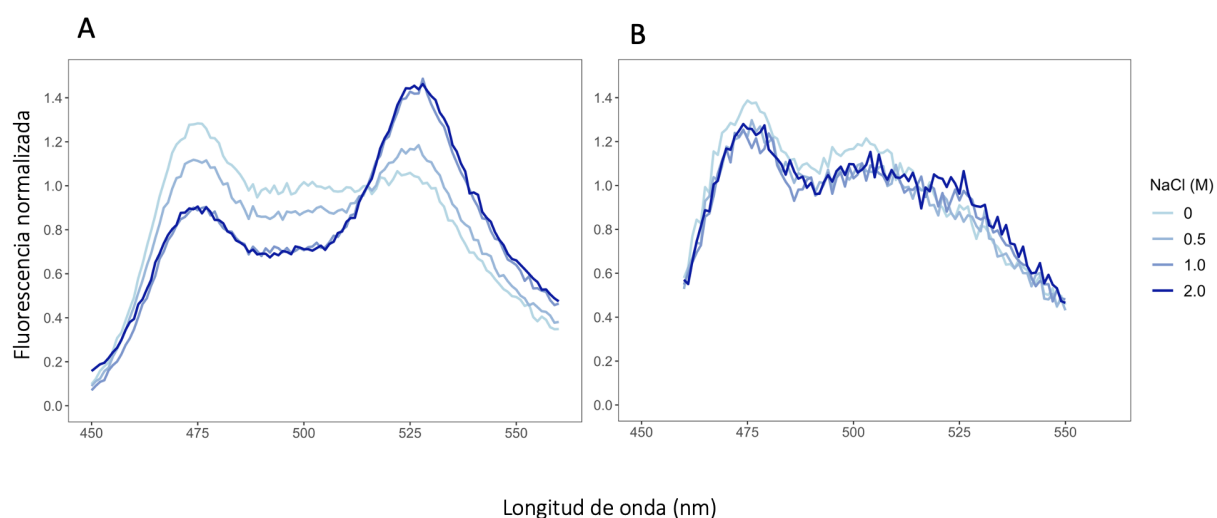
**Figura 17.** Genotipificación de las dos diferentes versiones de SED1 en vector pGPTVII-nlsSED1 expresados en células de *A. tumefaciens* mediante PCR de colonia: La banda amplificada con los oligonucleótidos IMR010 e IMR011 (ver Anexo tabla 1) es de 2000 pb para pGPTVII-nlsSED1(FN). M: Marcador 1 kb; Pozos (1-9): Colonias transformadas de *A. tumefaciens* con pGPTVII-nlsSED1; Pozos (1-6): Colonias transformadas de *A. tumefaciens* con pGPTVII-nlsSED1(mTq2-mNG); Pozos (1-8): Colonias transformadas de *A. tumefaciens* con pGPTVII-nlsSED1(FN); CP: control positivo de cada versión; CN: control negativo de cada versión.

### 7.3 Caracterización de la respuesta del biosensor incapaz de ser fosforilado en células de *Saccharomyces cerevisiae* y células de *Nicotiana benthamiana*

#### Células de *S. cerevisiae*

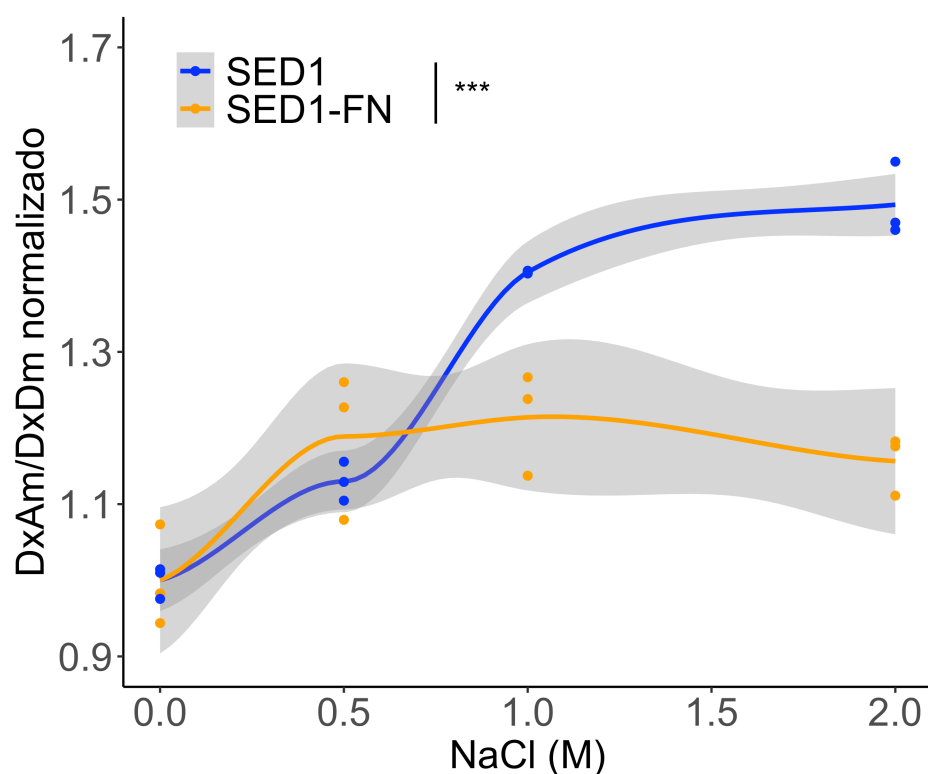
Con el fin de comparar los niveles de respuesta FRET entre el biosensor SED1 y la versión SED1-fosfo-nula (SED1-FN) en células de levadura bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de las células que expresaban SED1 (Figura 18A) o SED1-FN (Figura 18B), sometidas a tratamientos con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.5, 1.0 y 2.0 M). Las lecturas de fluorescencia se adquirieron utilizando un lector de placas (Clario Star), midiendo la emisión de fluorescencia en un rango de 450 nm a 565 nm, con una excitación de 420 nm.

La obtención del espectro de emisión de fluorescencia se realizó normalizando los valores de fluorescencia a 515 nm (punto isobéptico), valor previamente reportado en el trabajo de Cuevas-Velázquez *et al.*, (2021). En contraste con lo observado para SED1, la evaluación de SED1-FN mostró que la emisión de fluorescencia de la proteína fluorescente donadora (mCerulean3) no disminuye al incrementar las concentraciones de NaCl, indicando que la distancia entre la proteína donadora y la aceptora (Citrina) no disminuye lo suficiente para que ocurra FRET (Figura 18 B). Esto sugiere que la conformación de la proteína AtLEA4-5-FN no se compacta tanto como ocurre con la AtLEA4-5 silvestre.



**Figura 18.** Espectros de emisión de fluorescencia normalizada a 515 nm a diferentes concentraciones de NaCl (M) de células vivas de levadura que expresan **A.** SED1 y **B.** SED1-fosfo-nula (SED1-FN).

Al cuantificar el cociente FRET ( $DxAm / DxDm$ ), el cual se obtuvo dividiendo el valor máximo de emisión del aceptor (515 nm,  $DxAm$ ) entre el valor máximo de emisión del donador (475 nm,  $DxDm$ ), encontramos que la versión SED1-FN tiene una respuesta al choque hiperosmótico/iónico significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que SED1 (Figura 19). En conjunto, estos resultados demuestran que la versión SED1-FN presenta una respuesta baja a un aumento en la osmolaridad en células de levadura bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico, insuficiente para reportar los efectos de esta condición de estrés.

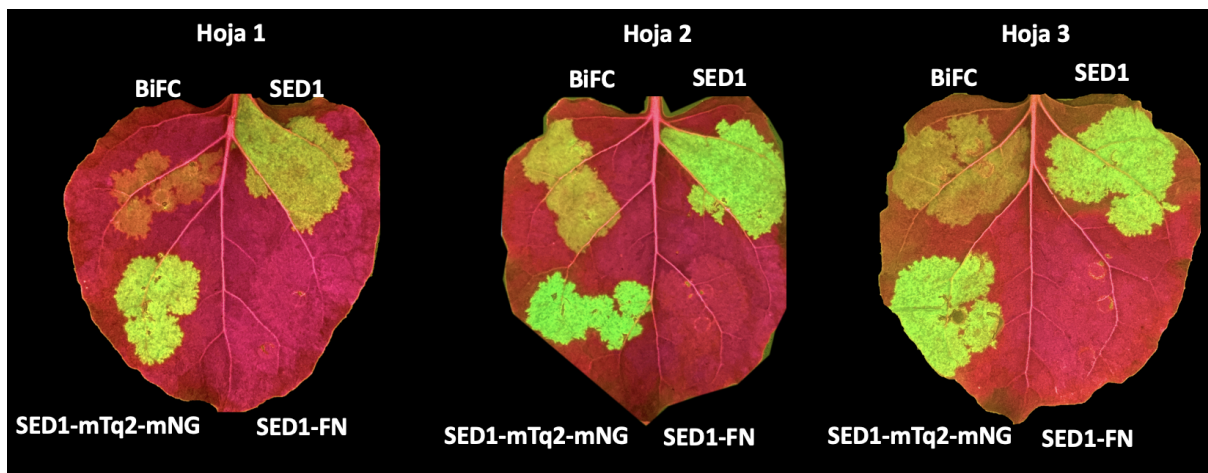


**Figura 19.** Cociente de FRET normalizado de células de levadura que expresan SED1 (línea azul) y SED1-fosfo-nula (línea naranja) bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico con NaCl. ANOVA de una vía \*\*\*  $p > 0.001$ . Las líneas de tendencia indican el promedio de los datos. La línea sombreada (gris) indica el 95% de intervalo de confianza.

## Células de *N. benthamiana*

La respuesta de SED1-FN se analizó en hojas de *N. benthamiana* mediante un ensayo de expresión transitoria la cual se utiliza ampliamente para evaluar parcialmente la expresión y función de genes sin tener que generar líneas transgénicas estables. El ensayo consiste en la infiltración de hojas de *N. benthamiana* con células de *A. tumefaciens* que contiene plásmidos con el gen de interés, lo que llevará a la introducción del plásmido a las células vegetales.

Para poner a punto el ensayo de expresión transitoria, se tomó como referencia un sistema de complementación biomolecular de la fluorescencia (BiFC, *Bimolecular fluorescence complementation*) ya introducido en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101. Una vez validada la expresión del sistema de referencia (Figura 20), se procedió a evaluar la expresión de SED1-FN. Como resultado de la infiltración, no se observó acumulación de SED1-FN tras cinco días posteriores a la infiltración (5 DPI) de hojas de *N. benthamiana* (Figura 19). La ausencia de la fluorescencia del biosensor SED1-FN es consistente con los datos de toxicidad de esta versión en células de levadura.



**Figura 20.** Ensayo transitorio por agroinfiltración en tres hojas diferentes de *N. benthamiana* (5 DPI). Por cada hoja: Superior izquierda expresión de *BiFC*, superior derecha expresión de *SED1*, inferior izquierda *SED1-mTq2-mNG* e inferior derecha *SED1-fosfo-nula* (*SED1-FN*). Se revelaron las hojas con luz azul mediante un transiluminador: La hoja (rojo) representa los cloroplastos excitados por la luz azul y (verde) fluorescencia de cada construcción.

En conjunto, los resultados en células de levadura y células de planta sugieren que la versión SED1-fosfo-nula (SED1-FN) no resultó ser un biosensor funcional para el monitoreo de los efectos del estrés hiperosmótico/iónico en células de levadura ni vegetales.

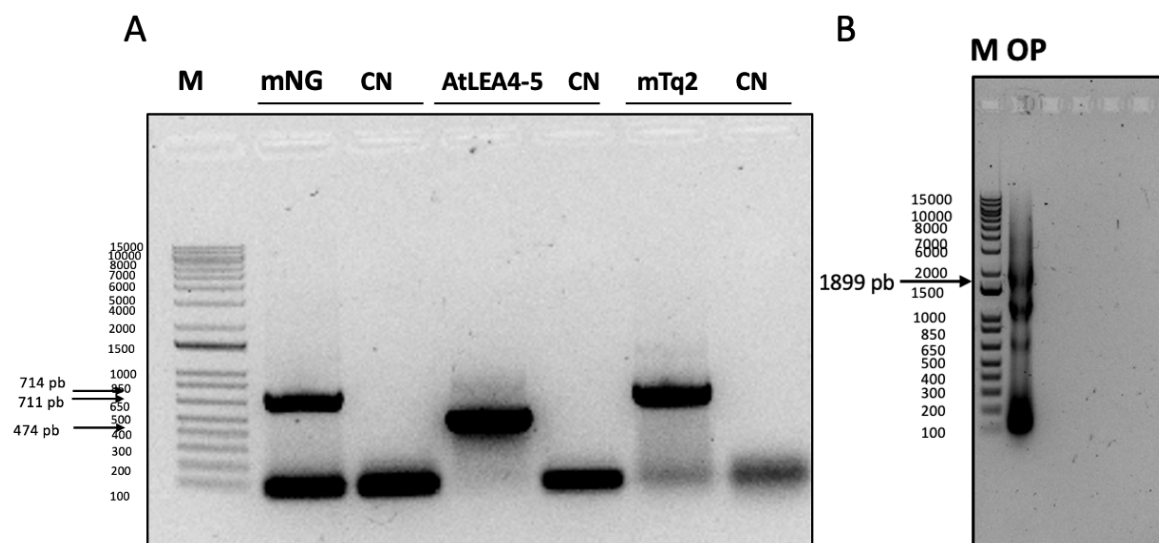
#### **7.4 Obtención de una versión de SED1 con un nuevo par FRET en células de levadura y células de plantas**

En estudios recientes, se ha sugerido que las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen son proteínas estables y no experimentan fotoblanqueo en células de plantas (Denay *et al.*, 2019; Hirano *et al.*, 2022 ; Mastop *et al.*, 2017). mTurquoise2 es una proteína fluorescente cian monomérica que presenta un valor máximo de excitación a 434 nm y un valor máximo de emisión de 475 nm. mNeonGreen es una proteína fluorescente verde monomérica que presenta un valor máximo de excitación de 506 y un valor máximo de emisión de 517nm. Se ha sugerido que el par mTurquoise2-mNeonGreen es una combinación adecuada como par FRET en células de plantas (Denay *et al.*, 2019). Debido a estas características, se generó una nueva versión de SED1, llamada SED1-mTurquoise2-mNeonGreen (SED1-mTq2-mNG), en la que se usó mTurquoise2 como proteína donadora y mNeonGreen como proteína aceptora, reemplazando el par FRET original (mCerulean3-Citrina). La nueva versión de SED1 mantuvo el dominio sensor original de SED1 (AtLEA4-5).

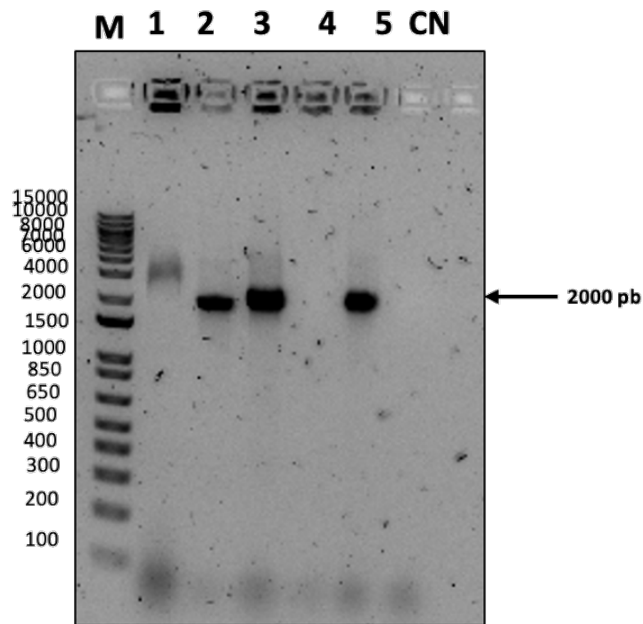
Para construir SED1-mTq2-mNG, se utilizó la técnica de PCR usando una *Taq* de alta fidelidad (ver Anexo 12.1) para amplificar los marcos de lectura de cada fragmento del constructo (mTurquoise2, AtLEA4-5 y mNeonGreen) usando oligonucleótidos con homología al vector de interés (Figura 21A). Los fragmentos obtenidos se fusionaron mediante la técnica PCR sobrepuesta (ver Anexo 12.1) (Figura 22 B) que consiste en realizar dos PCR consecutivas en un único tubo de reacción. La primera reacción se realiza sin oligonucleótidos y la segunda con los oligonucleótidos que tienen homología al vector. La fusión se verificó mediante secuenciación para confirmar la correcta clonación y descartar mutaciones. Después, se cortó la banda y se purificó para su posterior clonación mediante Gibson Assembly.

El vector de expresión en levadura pDRFLIP38-AtLEA4-5, fue el mismo que para SED1, se purificó de células de *E. coli* GM2163, que tiene mutados dos genes

que codifican para metilasas de DNA (*dam-/dcm-*). Esto se debe a que la enzima *XbaI* no es capaz de cortar en sitios de DNA que están metilados. Luego, el plásmido se digirió con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* para obtener el vector abierto. Mediante Gibson Assembly se insertó el fragmento completo amplificado por overlap PCR de mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen que tiene grado de homología con el vector en los extremos 5' y 3'. Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* con el producto obtenido, y se seleccionaron las colonias positivas mediante PCR y secuenciación. El resultado indicó que la colonia cinco fue la que presentó correctamente el nuevo plásmido. Se extrajo DNA de la colonia 5 y se usó para transformar a la cepa BJ5465 de *S. cerevisiae*. Como resultado de esta transformación se obtuvieron, varias colonias de las cuales cinco se evaluaron por PCR de colonia, resultando tres positivas. Solo la colonia cinco se utilizó para su posterior análisis (Figura 21).

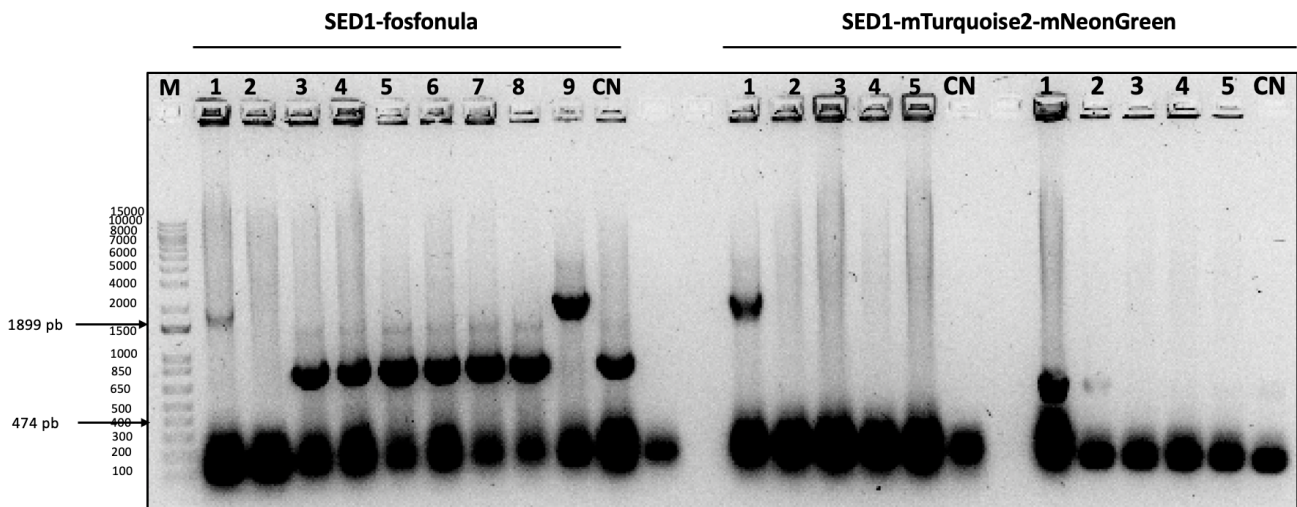


**Figura 21.** PCR para amplificar los fragmentos individuales para clonar la versión SED1-mTq2-mNG. **A.** DNA amplificado de los fragmentos de mNeonGreen (711 pb), AtLEA4-5 (474 pb) y mTurquoise2 (714 pb). **B.** Overlap PCR de la fusión de los tres fragmentos. Tamaño de los fragmentos fusionados 1899 pb. M: marcador de 1kb; CN: control negativo; OP: overlap PCR.



**Figura 22.** Genotipificación del vector pDRFLIP38-AtLEA4-5(mTq2-mNG) expresado en de levadura usando los oligonucleótidos IMR012 y CET027 (ver Anexo tabla 1). M: Marcador 1 kb; Pozos (1-5): Colonias transformadas de levadura; CN: control negativo.

Por otro lado, con el fin de obtener y expresar la versión SED1-mTq2-mNG en plantas, utilizamos el vector pGPTVII-nlsSED1 (Cuevas-Velazquez *et al.*, 2021) el vector pGPTVII-nlsSED1 se digirió con las enzimas *SpeI* y *XmaI* una vez abierto el vector y mediante clonación de Gibson Assembly se insertó el fragmento conteniendo SED1-mTq2-mNG, el cual se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pDRFLIP38-AtLEA4-5(mTq2-mNG), utilizando oligonucleótidos con homología al vector pGPTVII-nls mediante PCR. Se transformaron células de *E. coli* y se seleccionaron las resultaron positivas mediante PCR de colonia (Figura 23 panel derecho) y que se verificaron por secuenciación de DNA. La colonia 1 fue la única que presentó la versión correcta de SED1-mTq2-mNG. Células de *A. tumefaciens* se transformaron con el plásmido SED1-mTq2-mNG verificado y purificado de *E. coli* (Figura 17) para su uso posterior.



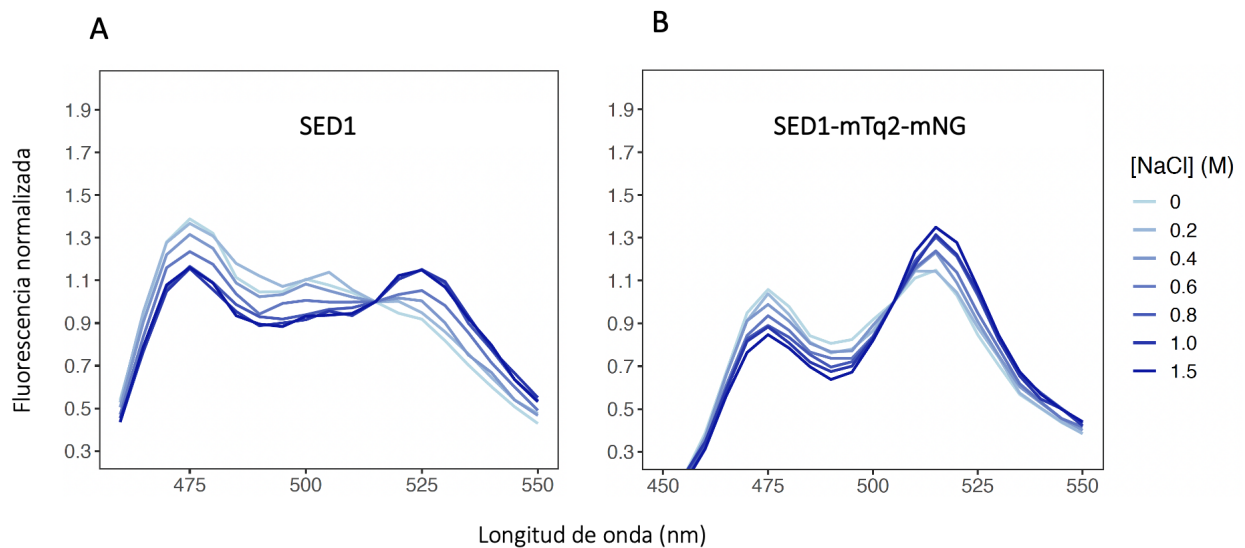
**Figura 23.** Genotipificación del vector pGPTVII-nlsSED1(mTq2-mNG) expresado en células de *E. coli*. Banda correspondiente a mTurquoise2-AtLEA4-5-mNeonGreen (1899 pb) y banda de AtLEA4-5 (474 pb). En esta imagen solo se muestra el resultado de la colonia 1 para SED1-mTq2-mNG. M: Marcador 1 kb; Pozos (1-5): Colonias transformadas de *E. coli*; CN: Control negativo.

### **7.5 Caracterización de la respuesta del biosensor con un nuevo par FRET en células de *Saccharomyces cerevisiae* y células de *Nicotiana benthamiana***

#### **Células de *S. cerevisiae***

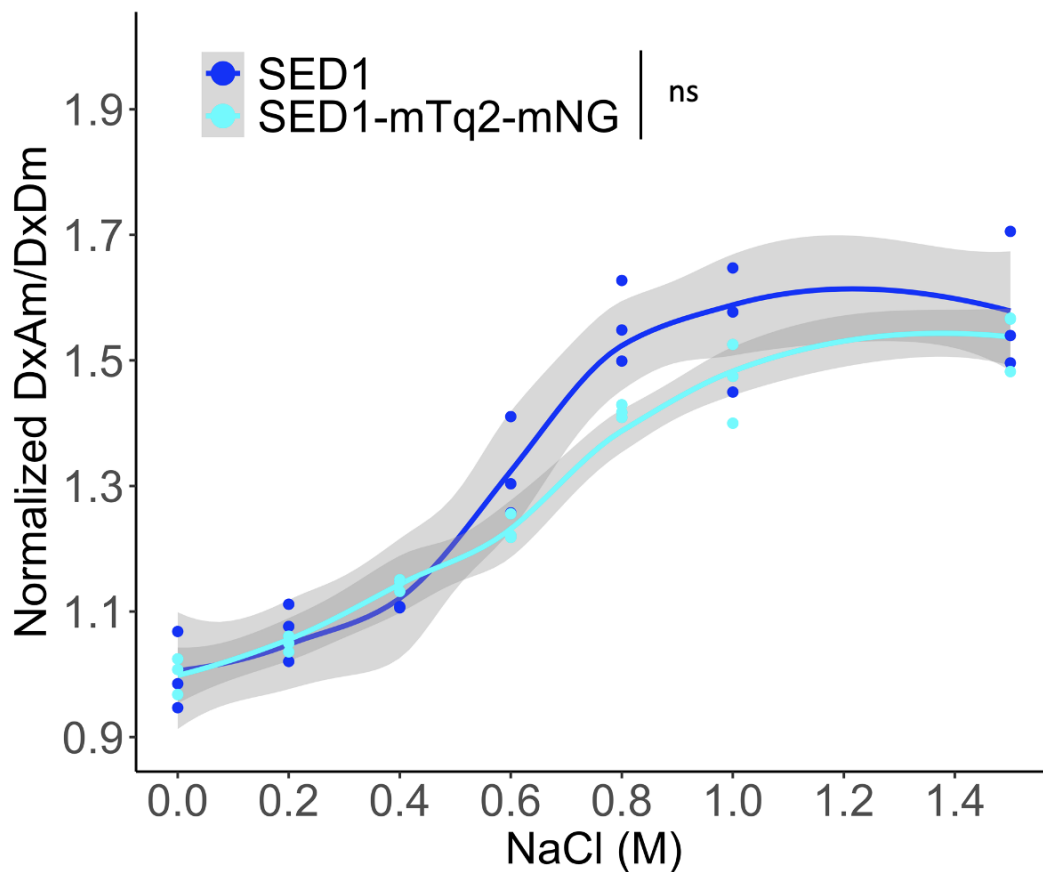
Para evaluar la respuesta de la versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen (SED1-mTq2-mNG) en células vivas de levadura en condiciones de estrés hiperosmótico/iónico, se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 M) usando como referencia al biosensor SED1 (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021). Como resultado se observó, una disminución en la emisión de fluorescencia del donador a 475 nm (mTurquoise2) acoplado a un incremento en la emisión de fluorescencia del aceptor 517 nm (mNeonGreen) al incrementar las concentraciones de NaCl (Figura 24), fenómeno esperado en un sistema tipo FRET.





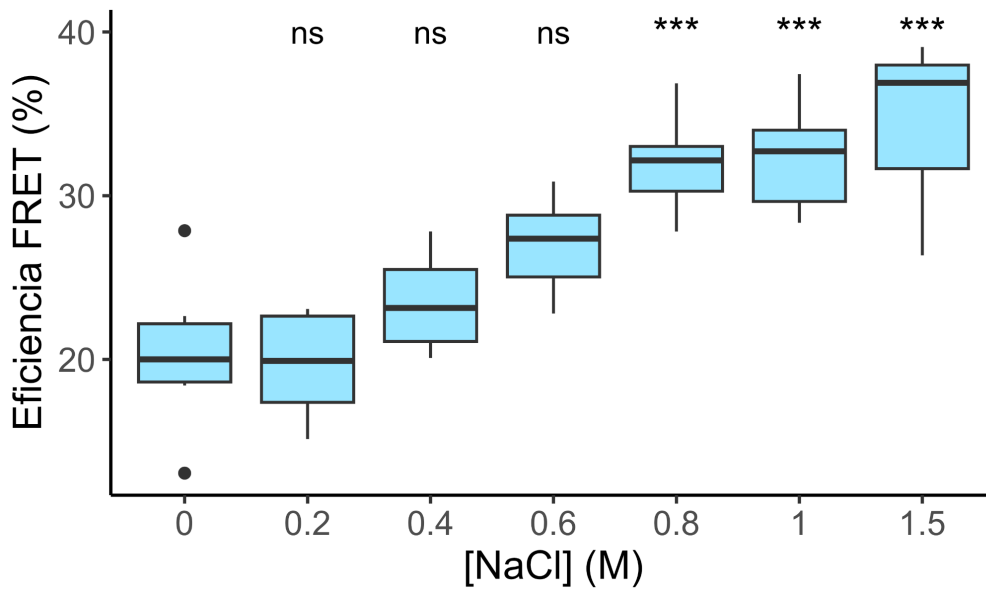
**Figura 24.** Espectros de emisión de fluorescencia normalizada a diferentes concentraciones de NaCl de células vivas de levadura que expresan **A.** SED1 y **B.** SED1-mTurquoise2-mNeonGreen.

Por otro lado, con la finalidad de comparar los niveles de respuesta FRET entre SED1 y SED1-mTq2-mNG, se cuantificó el cociente FRET, el cual se obtuvo dividiendo la emisión de fluorescencia del aceptor (DxAm) entre la emisión de fluorescencia del donador (DxDm). Los datos fueron normalizados a la condición de 0 M de NaCl. Los resultados mostraron que la versión SED1-mTq2-mNG exhibe un incremento en el cociente de FRET ( $DxDm/DxAm$ ) dependiente del choque hiperosmótico/iónico inducido con NaCl, y presenta un rango dinámico similar a SED1 (Figura 25). En conjunto, estos resultados muestran, que la versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen responde al incremento en la osmolaridad aplicada a células de levadura vivas, con niveles de respuesta FRET similares a SED1.



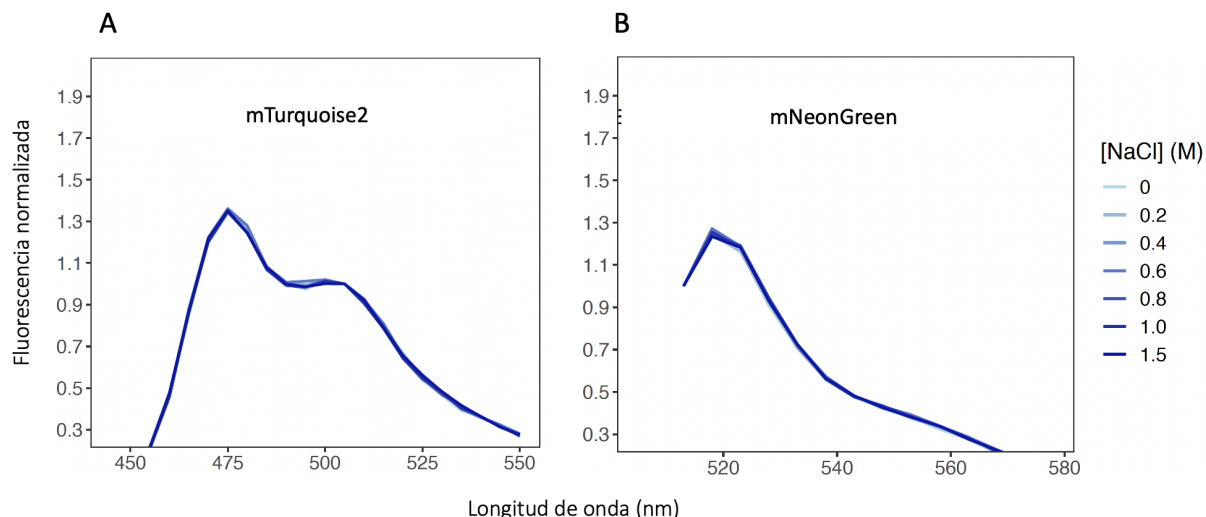
**Figura 25.** Coeficiente FRET normalizado (DxAm/DxDm) de células de levadura vivas que expresan las variantes de SED1 (azul) y SED1-mTq2-mNG (cian). Anova de una vía. ns: no significativo.  $p=0.3932$ . La línea de tendencia indica el promedio de los datos. La línea sombreada (gris) indica el 95% de intervalo de confianza.

Con el fin de cuantificar la cantidad de energía transferida entre las proteínas fluorescentes de la versión SED1-mTq2-mNG en las diferentes condiciones, se cuantificó la eficiencia FRET. Los resultados indican que SED1-mTq2-mNG presenta una eficiencia FRET basal promedio de 23.7% en condiciones estándar (0 M NaCl), mientras que aumenta a 37.9% en 1.5 M de NaCl (Figura 26).



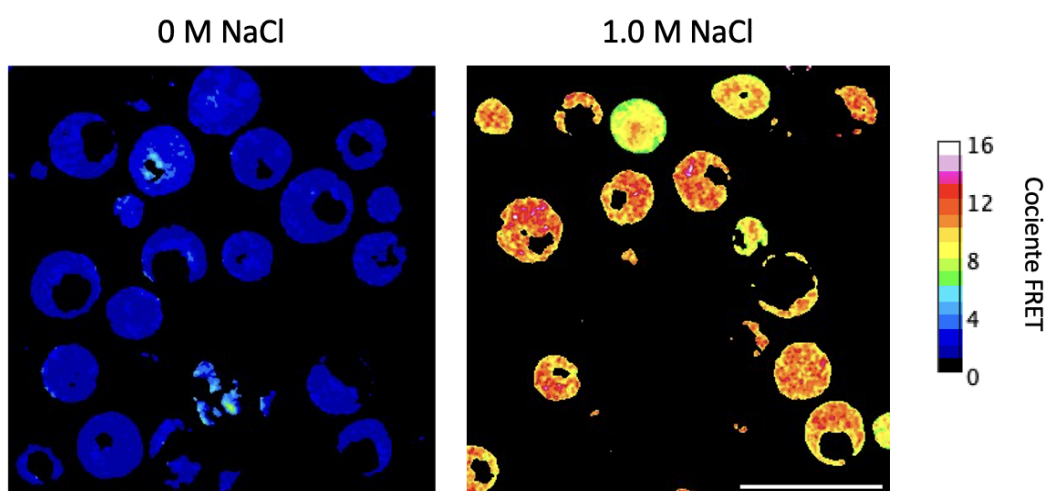
**Figura 26.** Eficiencia FRET de células de levadura que expresan SED1-mTq2-mNG. ANOVA de una vía. \*\*\*  $p < 1 \times 10^{-7}$

Para descartar que las proteínas fluorescentes del biosensor (mTurquoise2 y mNeonGreen) se afectan por el tratamiento de NaCl (lo cual afectaría las estimaciones FRET), se clonaron individualmente los marcos abiertos de lectura que codifican para cada proteína fluorescente en el vector pDRFLIP38 mediante Gibson Assembly y se confirmaron mediante secuenciación. Tras expresar en levaduras y someterlas a choques hiperosmóticos/iónico, encontramos que la señal de fluorescencia de las proteínas mTurquoise2 y mNeonGreen no se afectan por el tratamiento, demostrando que la emisión de fluorescencia de las proteínas es estable a diferentes concentraciones de NaCl (Figura 27).



**Figura 27.** Espectros de fluorescencia normalizado de las proteínas fluorescentes **A.** mTurquoise2 y **B.** mNeonGreen expresadas en células de levadura bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico.

Las mediciones en célula única permiten conocer la respuesta, en nuestro caso del biosensor SED1-mTq2-mNG de cada célula en una población. Por lo tanto, se cuantificó el cociente FRET en célula única de células de levadura mediante microscopía confocal. Se capturaron imágenes de células de levadura en condiciones estándar (0 M NaCl) y a choque hiperosmótico/iónico (1.0 M NaCl), condición en la que observamos mayor respuesta en el cociente FRET en las mediciones de la población de levaduras que expresan SED1-mTq2-mNG. Como resultado, se observó que el cociente FRET aumentó en 1.0 M NaCl (Figura 28). Lo cual, es consistente con lo que se obtuvo utilizando el cultivo de levadura.

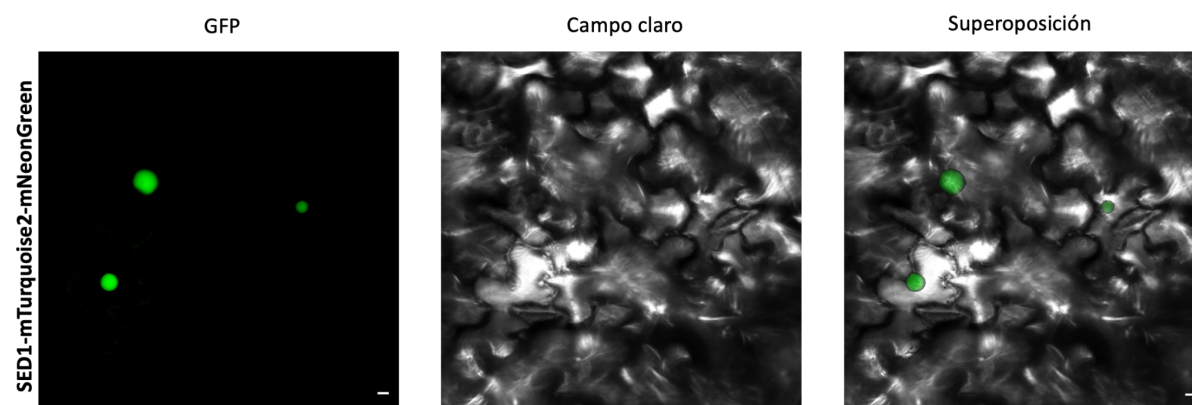


**Figura 28.** Células de *S. cerevisiae* que expresan SED1-mTq2-mNG bajo condiciones normales (0 M NaCl) y condiciones de estrés hiperosmótico/iónico (1.0 M NaCl). La barra de calibración representa el cociente de FRET “crudo” (DxAm / DxDm). Escala de 10 µm

En resumen, nuestros resultados demuestran que la versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen es un biosensor que responde a choque hiperosmótico/iónico en células de levadura, similar a lo reportado para el biosensor original SED1.

#### Células de *N. benthamiana*

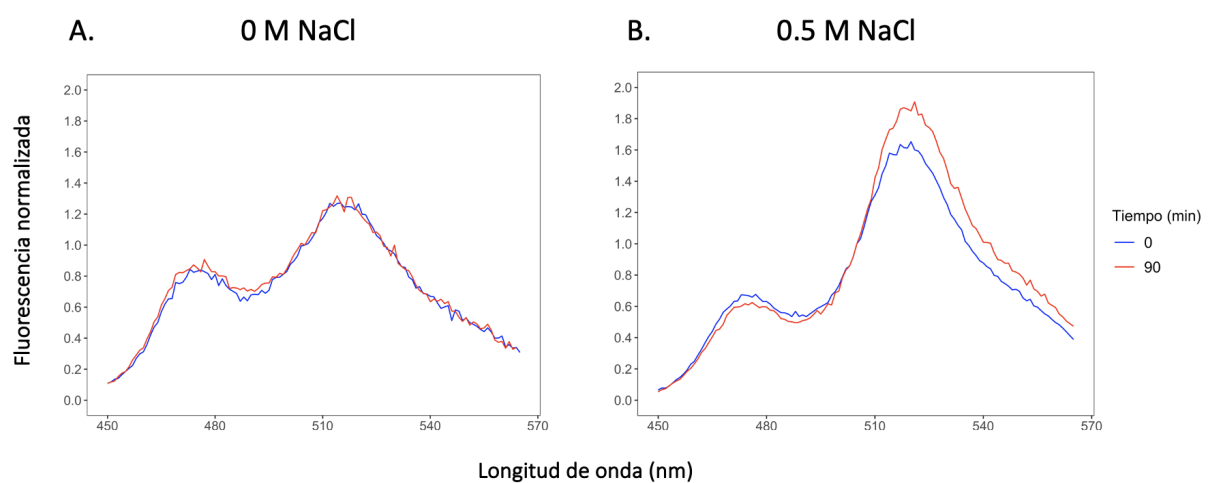
Una vez demostrado que la versión SED1-mTq2-mNG es un biosensor capaz de detectar y responder el choque hiperosmótico/iónico en células de levadura, se probó la funcionalidad de esta nueva versión de SED1 en células de *N. benthamiana*. Para ello, se expresó transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* (Figura 20). Para determinar si la expresión nuclear (dada por la señal de localización NLS) era la esperada, se analizaron mediante microscopía confocal. De acuerdo con lo esperado, los resultados mostraron que la versión SED1-mTq2-mNG se localizó en núcleos de las hojas de *N. benthamiana* (Figura 29).



**Figura 29.** Imagen de hoja de *N. benthamiana* que expresa SED1-mTq2-mNG con una señal de localización en núcleo (Escala=10  $\mu m$ ). Canal de GFP (izquierda), campo claro (centro) y superposición (derecha).

Para evaluar la respuesta a choques hiperosmóticos/iónicos de la versión SED1-mTq2-mNG en células de *N. benthamiana*, se realizó un ensayo en donde pequeños discos cortados de las hojas se expusieron a soluciones hipoosmóticas (agua) e hiperosmóticas (0.5M NaCl) durante 90 minutos (ver Materiales y métodos). En condiciones de 0.5 M de NaCl se observó un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor acoplado a una disminución en la emisión de fluorescencia del donador, es decir, una respuesta FRET positiva (Figura 30). Por el contrario, en

condiciones hiposmóticas no se observó una reducción de FRET, lo cual indica que la versión SED1-mTq2-mNG responde a choque hiperosmótico/iónicos, pero no al choque hiposmótico en células de *N. benthamiana*. Cabe resaltar que los niveles de FRET al inicio del tratamiento (0 min) fueron diferentes en cada uno de los discos de hoja probados (Figura 30 A y B). Esto podría ser causado por diferentes estados fisiológicos de los tejidos infiltrados. En conjunto, estos resultados, sugieren que la versión SED1-mTq2-mNG es un biosensor que se expresa y responde a una condición hiperosmótica en células vegetales.



**Figura 30.** Espectros de emisión de fluorescencia de células de *N. benthamiana* tratadas con agua (0M NaCl) y 0.5M NaCl que expresan el biosensor SED1-mTq2-mNG. **A.** 0 M NaCl y **B.** 0.5 M NaCl

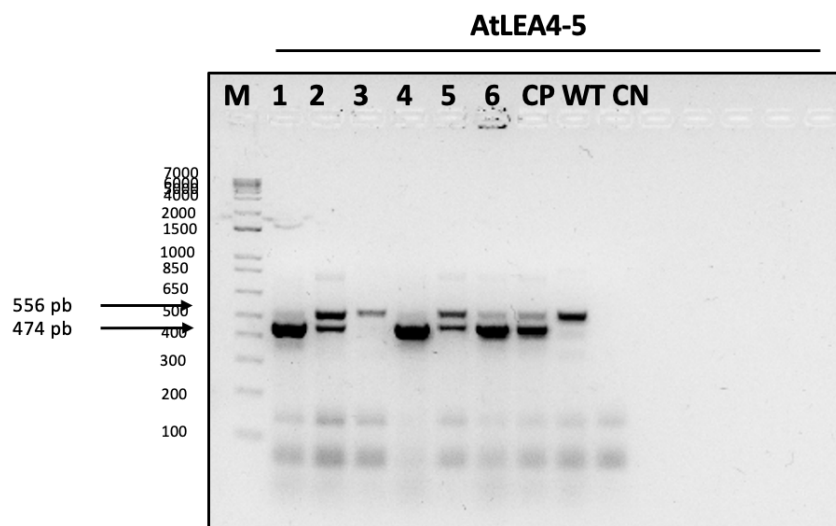
### **7.6 Generación de líneas transgénicas T1 de *Arabidopsis thaliana* que expresan el biosensor SED1-mTq2-mNG**

Una vez demostrado que la versión SED1-mTq2-mNG se expresa y responde en células de plantas, se realizó la transformación de 12 plantas de *A. thaliana* Col-0 mediante inmersión del meristemo floral. El método de inmersión meristemo floral consiste en sumergir los botones florales de la planta en una solución que contiene células de *A. tumefaciens* que contiene el plásmido vector con el fragmento de DNA de interés el cual se integra al genoma de las plantas.

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia al marcador de selección con glufosinato de amonio (BASTA). Para corroborar esta selección y descartar los posibles falsos positivos, se analizaron las

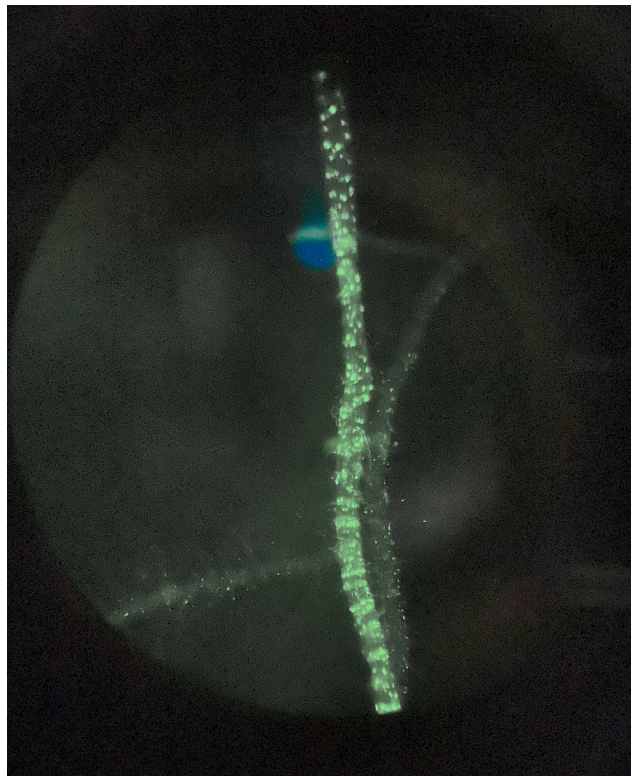
raíces de plántulas de dos semanas con ayuda de un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Ex= 460-490; Em = 510-550 nm) para determinar la emisión de fluorescencia. Las raíces que mostraban fluorescencia se plantaron en tierra para su crecimiento.

Para confirmar la inserción del fragmento de DNA en las plantas de *A. thaliana* se extrajo DNA genómico con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (ver Materiales y métodos) y se validó su presencia mediante PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican el fragmento de la proteína AtLEA4-5. Se utilizó como control positivo el biosensor SED1 original y como control negativo a la planta *A. thaliana* silvestre. Se encontraron tres líneas transgénicas T1 (línea transgénica 2, 5 y 6) que presentaban dos bandas, una de 474 pb, correspondiente al ORF de la proteína AtLEA4-5 del biosensor SED1-mTq2-mNG, y una de 556 pb, correspondiente al ORF de la proteína AtLEA4-5 endógena de *A. thaliana* (Figura 31). Esta diferencia de tamaños se debe a que la proteína endógena tiene un intrón de 82 pb, el cual no se encuentra en el dominio sensor del biosensor SED1-mTq2-mNG. Las tres líneas presentaron los fragmentos de DNA esperados cuando al usar oligonucleótidos que bordean los extremos del fragmento SED1-mTq2-mNG, demostrando que las tres líneas contienen el fragmento esperado (datos no mostrados).



**Figura 31.** Genotipificación de posibles líneas transgénicas de *A. thaliana* seleccionadas con BASTA en un gel de agarosa al 1.5%. M: Marcador 1 kb; Pozos (1-6): Líneas transgénicas independientes; CP: control positivo (pGPTVII-nlsSED1); WT: *A. thaliana* silvestre; CN: control negativo.

## Discusión





## 8. Discusión

El estrés por déficit hídrico desencadena múltiples mecanismos de respuesta en las plantas. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de percepción que directamente detectan el desbalance en la homeostasis celular. La falta de herramientas dinámicas y no destructivas para monitorear los cambios intracelulares causados por condiciones de déficit hídrico ha sido un obstáculo en la investigación del tema.

El biosensor SED1 es una herramienta útil que permite reportar los efectos del estrés osmótico en diferentes organismos como *N. benthamiana*, pero no así en *A. thaliana* (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2021). La falta de respuesta de SED1 podría ser el resultado de diferentes factores. Por ejemplo, la localización subcelular de la proteína AtLEA4-5. Se ha reportado que la proteína AtLEA4-5 se localiza en núcleo y citoplasma (Candat *et al.*, 2014; Martínez-Martínez, 2016) y se acumula en diferentes tejidos (Martínez-Martínez, 2016). Esto nos hace pensar en la diversidad de funciones que podría tener en estos compartimentos de los diferentes tejidos como también las interacciones con diferentes blancos endógenos. El uso de un péptido señal con retención en otro compartimento diferente a núcleo y citoplasma podría facilitar la respuesta de la proteína AtLEA4-5. Esta estrategia se abordó a inicios de esta investigación en colaboración con el Dr. José Dinneny, generando una versión de SED1 con una señal de retención en retículo endoplásmico (HDEL) con el fin de mantener a la proteína AtLEA4-5 con menores interacciones de blancos endógenos, sin embargo, no se obtuvo respuesta de SED1 expresado en retículo endoplásmico de *A. thaliana* (datos no mostrados).

Adicionalmente, el citoplasma es el sitio principal de las modificaciones post-traduccionales, como lo son las fosforilaciones. Las modificaciones postraduccionales regulan la función, estructura, localización celular, estabilidad y asociación proteica (Hernández-Sánchez *et al.*, 2022). Las fosforilaciones en las proteínas LEA se han estudiado poco en las proteínas LEA, pero se ha reportado que las proteínas LEA de los grupo 2 y 3 experimentan fosforilaciones en segmentos ricos en serina para regular diferentes funciones (Liu *et al.*, 2017).

Por otra parte, de acuerdo con lo reportado por Cuevas-Velázquez *et al.* (2021), la caracterización de SED1 mostró un alto FRET basal en condiciones

estándar. Posiblemente, este efecto se deba a la proximidad entre las proteínas fluorescentes o al posible fotoblanqueo que experimentan las proteínas fluorescentes. La estrategia propuesta en este trabajo buscó mejorar a SED1 a partir de i) evitar las fosforilaciones en la proteína AtLEA4-5 (Mergner *et al.*, 2020) o ii) disminuir los niveles de fotoblanqueo e inestabilidad del donador y el aceptor en plantas (Denay *et al.*, 2019; Stoddard y Rolland., 2019).

Para abordar la primera de estas limitaciones, se modificó a la proteína AtLEA4-5 reemplazando todos los residuos de serina, treonina y tirosina por alaninas, nombrando esta versión SED1-fosfo-nula (SED1-FN) (Figura 13). Es importante destacar que estas modificaciones fueron realizadas con anterioridad por Cuevas-Velázquez sin previo conocimiento de los dieciséis residuos con potencial de ser fosforilados, descritos por Mergner *et al.*, 2020 (Figura 1-Anexo A). La intención detrás de esta modificación consistía en evaluar si la falta de fosforilaciones contribuía a la respuesta de FRET en *A. thaliana*. Para llevar a cabo esta evaluación, en esta tesis caracterizamos la versión SED1-FN expresada en células de levadura, la cual mostró bajos niveles de cambio FRET en respuesta al choque hiperosmótico/iónico en comparación con la versión de SED1 original. Este resultado sugiere tres posibles puntos: 1) los residuos fosforilables de la proteína AtLEA4-5 son necesarios para el plegamiento inducido por estrés hiperosmótico/iónico, 2) los niveles de acumulación de la proteína fueron bajos en las células de levadura o 3) la versión de esta proteína se degrada rápidamente. En relación con la primera posibilidad, se ha reportado que las fosforilaciones en las dehidrasas TsDHN-1 y TsDHN-2 de *Thellungiella salsuginea*, regulan el plegamiento inducido por cationes en respuesta al estrés por déficit hídrico promoviendo su capacidad para polimerizar filamentos de actina (Rahman *et al.*, 2011). Asimismo, se ha reportado que la mayoría de los proteomas, entre ellos el de *Arabidopsis*, tienen carga neta negativa a pH fisiológico, lo cual evita la autoasociación o agregación a través de las repulsiones de las cargas negativas (Romero-Perez *et al.*, 2023).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que las células de levadura que expresaron a SED1-FN presentaron una menor tasa de crecimiento (datos no mostrados), posiblemente debido a un efecto tóxico para la levadura. Se informó en un estudio que el gen de la proteína LEA del grupo II del trigo (DHN-5) en células de *E. coli* transformadas condujo a una mayor tasa de crecimiento en comparación a las células control. Además, la expresión heteróloga del gen en células de levadura

condujo a una mejor tolerancia a una serie de condiciones de estrés abiótico (Abdul Aziz *et al.*, 2021). Sin embargo, en otro estudio en *E. coli* demuestran que al expresar diferentes formas del gen DHN-5 (sin segmento K), las versiones que no expresan uno o dos segmentos K pierden la tolerancia al estrés y disminuye su tasa de crecimiento ya que el segmento K estabiliza y regula la transición conformacional (Drira *et al.*, 2016). Interesantemente, la predicción del desorden estructural con el software online PONDR de la proteína AtLEA4-5 (fosfo-nula) mostró mayor desorden estructural en la región C-terminal (140-158 aminoácidos) que la proteína AtLEA4-5 silvestre (Figura 14). Además, con las predicciones del modelo estructural con el software AlphaFold2 se observó la formación de estructuras alfa-hélice. Por lo tanto, especulamos que un mayor desorden en el C-terminal altera la distancia entre las proteínas fluorescentes; que la región C-terminal podría estar interactuando fuertemente con las estructuras alfa-hélice, impidiendo la compactación; o que las estructuras alfa-hélice se compactan demasiado afectando la sensibilidad ante los cambios osmóticos. En conjunto, las evidencias encontradas en esta tesis muestran que la versión SED1-FN no resultó ser un biosensor adecuado.

La segunda limitación aborda el fotoblanqueo de la proteína fluorescente donadora mCerulean3 en células de plantas (Denay *et al.*, 2019). Además, se abordó la inestabilidad de la proteína fluorescente aceptora citrina en células de plantas. En un estudio se demostró que en hojas de *N. benthamiana* la proteína citrina formó agregados al fusionarlo con una proteína ribosomal localizada en el citoplasma (RPP3A) de *Arabidopsis* en condiciones control (Stoddard y Rolland, 2019). En ese sentido, modificamos el par FRET de SED1 por un nuevo par FRET, nombrando a esta versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen (SED1-mTq2-mNG).

Al expresar SED1-mTq2-mNG en células de levadura observamos un alto cambio de FRET en respuesta al choque hiperosmótico/iónico con un rango dinámico similar al de SED1, sugiriendo que un alto rango dinámico en el par mTurquoise2-mNeonGreen permitirá una adecuada relación señal-ruido, lo que respalda la detección de eventos celulares con alta sensibilidad. Además, nuestros datos demuestran que las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen no se ven afectadas por el tratamiento de choque osmótico. Recientemente, en un estudio se demostró que las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen expresadas en células de levadura de *S. cerevisiae* son proteínas estables ante excitaciones con luz y ante pH, son brillantes y no exhiben variación al expresarse en células de

levadura (Botman *et al.*, 2019). En esta tesis también se determinó la eficiencia FRET de la versión SED1-mTq2-mNG, la cual indica que existe proximidad entre las proteínas fluorescentes debido al cambio conformacional del dominio sensor.

Por otra parte, al expresar la versión SED1-mTq2-mNG en células de plantas observamos la acumulación en núcleo de hojas de *N. benthamiana*, debido a la señal de localización que se introdujo en el marco abierto de lectura del vector de expresión. Lo cual sugiere que SED1-mTq2-mNG no sufre proteólisis en la célula vegetal en condiciones normales. Sería importante probar la estabilidad de SED1-mTq2-mNG en el núcleo bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico a través del tiempo mediante microscopía confocal y asegurar su estabilidad. Sin embargo, el reto sería el montaje de la muestra tras imponer un choque osmótico sin dañar la hoja y sobrepasar con el microscopio la capa cerosa de la hoja.

Por otro lado, tras inducir el choque hiperosmótico/iónico en discos de hojas de *N. benthamiana* y monitorearlo a diferentes tiempos, nuestros resultados demuestran que SED1-mTq2-mNG exhibe un cambio en los niveles de FRET en respuesta al tratamiento por choque hiperosmótico/iónico. Cuando los discos de hoja se trataron con agua (solución hipoosmótica) no se observó un cambio, lo que indica que la versión SED1-mTq2-mNG es capaz de responder solamente a choques hiperosmóticos/iónicos y no hipoosmótico en células de *N. benthamiana*.

Nuestros resultados, hasta ahora, demuestran que la versión SED1-mTq2-mNG se expresa y responde en células de plantas, lo cual fortalece su posible aplicación en *A. thaliana*. Además, de la fotoestabilidad de mTurquoise2 y mNeonGreen, éstas también mostraron un alto rango dinámico y una alta eficiencia FRET tras imponer un choque hiperosmótico/iónico. Estas propiedades permiten una mayor precisión en las mediciones al reducir el ruido de la señal de fondo. En particular, la alta eficiencia de FRET de este par indica que permitirá detectar cambios en las diferentes condiciones de déficit hídrico que se impongan. Aunque reconocemos que el espectro de emisión de las proteínas fluorescentes podría verse afectado por la autofluorescencia de las plantas. Para resolver este problema, se podría recurrir a la técnica conocida como *time-gating*, la cual se basa en la capacidad del detector para diferenciar la señal que llega en diferentes tiempos, es decir, registra la señal en un intervalo de tiempo dado ignorando la señal de fondo antes o después del tiempo establecido (Kodama, 2016).

Finalmente, el presente trabajo de investigación aporta un biosensor mejorado SED1-mTq2-mNG, que reporta una condición hiperosmótica en células de levadura y, con el potencial para reportar esta condición en células de plantas, en la espera de ser caracterizado en raíces de *A. thaliana*. El desarrollo de biosensores como SED1-mTq2-mNG funcional en células de plantas permitirán contestar la pregunta ¿cómo los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la célula alteran procesos biológicos relevantes? Nuestros datos muestran que, debido a sus propiedades fisicoquímicas, la combinación de este par de proteínas fluorescentes son candidatos potenciales debido a sus propiedades fisicoquímicas para desarrollar nuevos biosensores fluorescentes tipo FRET utilizando otro tipo de proteínas intrínsecamente desordenadas como dominio sensor.

## 9. Conclusiones

El uso de las proteínas fluorescentes mTurquoise2 y mNeonGreen fusionados entre la proteína AtLEA4-5, permitió obtener un biosensor mejorado capaz de reportar los efectos del estrés hiperosmótico/iónico, pero no hipoosmótico en células de *N. benthamiana*. La caracterización de un nuevo par FRET en células de levaduras y células de plantas permitirán desarrollar nuevos biosensores para estudiar una variedad de procesos biológicos.

Por otro lado, la falta de todos los residuos con potencial de ser fosforilados (serina, treonina y tirosina) a lo largo de la secuencia de la proteína AtLEA4-5 perjudicó la expresión y respuesta del nuevo biosensor SED1-fosfo-nula en células de levadura y células de plantas. La evidencia de este trabajo permitirá estudiar el impacto de las fosforilaciones en la estructura y función de las proteínas LEA del grupo 4 de *Arabidopsis thaliana in vivo*.

## 10. Perspectivas

- Evaluar la versión SED1-mTurquoise2-mNeonGreen en raíces de *Arabidopsis thaliana* T3 bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico mediante ensayos de microscopía confocal (FLIM-FRET).
- Evaluar la posible competencia o interacción entre la proteína AtLEA4-5 endógena de *A. thaliana* con la proteína AtLEA4-5 del biosensor SED1-mTurquoise2-mNeonGreen.
- Generar una mutante de AtLEA4-5 descartando los aminoácidos con potencial de ser fosforilados que están reportados en el fosfoproteoma de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1- Anexo A) (Mergner *et al.*, 2020), y evaluar su respuesta en células de levadura y células de plantas.
- Expresar SED1-mTurquoise2-mNeonGreen en otras especies vegetales bajo condiciones de estrés hiperosmótico/iónico.

## 11. Bibliografía

- Abdul Aziz, M., Sabeem, M., Mullath, S. K., Brini, F., & Masmoudi, K. (2021). Plant Group II LEA Proteins: Intrinsically Disordered Structure for Multiple Functions in Response to Environmental Stresses. *Biomolecules*, *11*(11), 1662. <https://doi.org/10.3390/biom11111662>
- Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, *11*(1), 3-42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>
- Bajar, B. T., Lam, A. J., Badiie, R. K., Oh, Y.-H., Chu, J., Zhou, X. X., Kim, N., Kim, B. B., Chung, M., Yablonovitch, A. L., Cruz, B. F., Kulalert, K., Tao, J. J., Meyer, T., Su, X.-D., & Lin, M. Z. (2016). Fluorescent indicators for simultaneous reporting of all four cell cycle phases. *Nature Methods*, *13*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4045>
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008a). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, *148*(1), 6-24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Botman, D., de Groot, D. H., Schmidt, P., Goedhart, J., & Teusink, B. (2019). In vivo characterisation of fluorescent proteins in budding yeast. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38913-z>
- Bray, E. A. (1993). Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiology*, *103*(4), 1035-1040. <https://doi.org/10.1104/pp.103.4.1035>
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, *2*(2), 48-54. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9)
- Candat, A., Paszkiewicz, G., Neveu, M., Gautier, R., Logan, D. C., Avelange-Macherel, M.-H., & Macherel, D. (2014). The Ubiquitous Distribution of Late Embryogenesis Abundant Proteins across Cell Compartments in Arabidopsis



- Offers Tailored Protection against Abiotic Stress[C][W][OPEN]. *The Plant Cell*, 26(7), 3148-3166. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127316>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Cuevas-Velazquez, C. L., Velloso, T., Guadalupe, K., Schmidt, H. B., Yu, F., Moses, D., Brophy, J. A. N., Cosio-Acosta, D., Das, A., Wang, L., Jones, A. M., Covarrubias, A. A., Sukenik, S., & Dinneny, J. R. (2021a). Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25736-8>
- Cuevas-Velazquez, C. L., Velloso, T., Guadalupe, K., Schmidt, H. B., Yu, F., Moses, D., Brophy, J. A. N., Cosio-Acosta, D., Das, A., Wang, L., Jones, A. M., Covarrubias, A. A., Sukenik, S., & Dinneny, J. R. (2021b). Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25736-8>
- Darling, A. L., & Uversky, V. N. (2018). Intrinsic Disorder and Posttranslational Modifications: The Darker Side of the Biological Dark Matter. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00158>
- Denay, G., Schultz, P., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S., & Simon, R. (2019). Over the rainbow: A practical guide for fluorescent protein selection in plant FRET experiments. *Plant Direct*, 3(12), e00189. <https://doi.org/10.1002/pld3.189>
- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1842>

- Drira, M., Hanin, M., Masmoudi, K., Brini, F., Drira, M., Hanin, M., Masmoudi, K., & Brini, F. (2016). Comparison of full-length and conserved segments of wheat dehydrin DHN-5 overexpressed in *Arabidopsis thaliana* showed different responses to abiotic and biotic stress. *Functional Plant Biology*, 43(11), 1048-1060. <https://doi.org/10.1071/FP16134>
- Dure, L., & Chlan, C. (1981). Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: XII. PURIFICATION AND PROPERTIES OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS. *Plant Physiology*, 68(1), 180-186. <https://doi.org/10.1104/pp.68.1.180>
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrm1589>
- Enriquez -Toledo (2022). Caracterización de la sensibilidad estructural al ambiente osmótico de regiones intrínsecamente desordenadas *in vivo*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Goyal, K., Walton, L. J., & Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 151-157. <https://doi.org/10.1042/BJ20041931>
- Graether, S. P., & Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: A review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00576>

- Greenwald, E. C., Mehta, S., & Zhang, J. (2018). Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks. *Chemical Reviews*, 118(24), 11707-11794. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00333>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6488), 266-269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Haswell, E. S., & Verslues, P. E. (2015). The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *Journal of General Physiology*, 145(5), 389-394. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411295>
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Martínez-Martínez, C., Janis, B., Jiménez-Bremont, J. F., Covarrubias, A. A., Menze, M. A., Graether, S. P., & Thalhammer, A. (2022). LEAging through literature: Late embryogenesis abundant proteins coming of age—achievements and perspectives. *Journal of Experimental Botany*, 73(19), 6525-6546. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac293>
- Hincha, D. K., Zuther, E., & Popova, A. V. (2021). Stabilization of Dry Sucrose Glasses by Four LEA\_4 Proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Biomolecules*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/biom11050615>
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, 12(8), 343-351. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.013>
- Hundertmark, M., & Hincha, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>
- Ibraheem, A., & Campbell, R. E. (2010). Designs and applications of fluorescent

- protein-based biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(1), 30-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.033>
- Jones, R. (s. f.). *The Molecular Life of Plants*.
- Kodama, Y. (2016). Time Gating of Chloroplast Autofluorescence Allows Clearer Fluorescence Imaging In Planta. *PLOS ONE*, 11(3), e0152484.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152484>
- Liu, Y., Yang, M., Cheng, H., Sun, N., Liu, S., Li, S., Wang, Y., Zheng, Y., & Uversky, V. N. (2017a). The effect of phosphorylation on the salt-tolerance-related functions of the soybean protein PM18, a member of the group-3 LEA protein family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(11, Part A), 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.020>
- Liu, Y., Yang, M., Cheng, H., Sun, N., Liu, S., Li, S., Wang, Y., Zheng, Y., & Uversky, V. N. (2017b). The effect of phosphorylation on the salt-tolerance-related functions of the soybean protein PM18, a member of the group-3 LEA protein family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(11, Part A), 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.020>
- Mamontova, A. V., Grigoryev, A. P., Tsarkova, A. S., Lukyanov, K. A., & Bogdanov, A. M. (2017). Struggle for photostability: Bleaching mechanisms of fluorescent proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43(6), 625-633.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162017060085>
- Martínez, C (2016). Localización del transcrito y la proteína del gen AtLEA4-5 que participa en la respuesta al déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mergner, J., Frejno, M., List, M., Papacek, M., Chen, X., Chaudhary, A., Samaras, P., Richter, S., Shikata, H., Messerer, M., Lang, D., Altmann, S., Cyprys, P., Zolg,

- D. P., Mathieson, T., Bantscheff, M., Hazarika, R. R., Schmidt, T., Dawid, C., ... Kuster, B. (2020). Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome. *Nature*, 579(7799), Article 7799. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2094-2>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Newcombe, E. A., Delaforge, E., Hartmann-Petersen, R., Skriver, K., & Kragelund, B. (2022). How phosphorylation impacts intrinsically disordered proteins and their function. *Essays in Biochemistry*, 66(7), 901-913. <https://doi.org/10.1042/EBC20220060>
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J. L., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2010). Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(1), 373-390. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158964>
- Ovechkina, V. S., Zakian, S. M., Medvedev, S. P., & Valetdinova, K. R. (2021). Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Biomedical Applications. *Biomedicines*, 9(11), 1528. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111528>
- Popova, A. V., Rausch, S., Hundertmark, M., Gibon, Y., & Hinch, D. K. (2015). The intrinsically disordered protein LEA7 from Arabidopsis thaliana protects the isolated enzyme lactate dehydrogenase and enzymes in a soluble leaf proteome during freezing and drying. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1854(10 Pt A), 1517-1525. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.05.002>
- Rahman, L. N., Smith, G. S. T., Bamm, V. V., Voyer-Grant, J. A. M., Moffatt, B. A.,

- Dutcher, J. R., & Harauz, G. (2011). Phosphorylation of Thellungiella salsuginea Dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 Facilitates Cation-Induced Conformational Changes and Actin Assembly. *Biochemistry*, 50(44), 9587-9604. <https://doi.org/10.1021/bi201205m>
- Romero-Perez, P. S., Dorone, Y., Flores, E., Sukenik, S., & Boeynaems, S. (2023). When Phased without Water: Biophysics of Cellular Desiccation, from Biomolecules to Condensates. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00659>
- Ruibal, C., Salamó, I. P., Carballo, V., Castro, A., Bentancor, M., Borsani, O., Szabados, L., & Vidal, S. (2012). Differential contribution of individual dehydrin genes from Physcomitrella patens to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Science*, 190, 89-102. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.03.009>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Stoddard, A., & Rolland, V. (2019). I see the light! Fluorescent proteins suitable for cell wall/apoplast targeting in Nicotiana benthamiana leaves. *Plant Direct*, 3(1), e00112. <https://doi.org/10.1002/pld3.112>
- Swanson, S. J., & Gilroy, S. (2013). Imaging Changes in Cytoplasmic Calcium Using the Yellow Cameleon 3.6 Biosensor and Confocal Microscopy. En T. Munnik & I. Heilmann (Eds.), *Plant Lipid Signaling Protocols* (pp. 291-302). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-401-2\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-401-2_27)
- Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 11(4), 739-756.
- Uversky, V. N. (2014). Introduction to Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chemical Reviews*, 114(13), 6557-6560. <https://doi.org/10.1021/cr500288y>

- VanEngelenburg, S. B., & Palmer, A. E. (2008). Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.020>
- Waadt, R., Seller, C. A., Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>
- Wang, M., Da, Y., & Tian, Y. (2023). Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors. *Chemical Society Reviews*, 52(4), 1189-1214. <https://doi.org/10.1039/D2CS00419D>
- Yao, T., Zhang, J., Xie, M., Yuan, G., Tschaplinski, T. J., Muchero, W., & Chen, J.-G. (2021). Transcriptional Regulation of Drought Response in Arabidopsis and Woody Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.572137>
- Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G. W., Prusinkiewicz, P., Smith, R. S., & Weijers, D. (2014). Genetic Control of Plant Development by Overriding a Geometric Division Rule. *Developmental Cell*, 29(1), 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.02.002>
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66-71. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)
- Zivcak, M., Brestic, M., & Sytar, O. (2016). Osmotic Adjustment and Plant Adaptation to Drought Stress. In M. A. Hossain, S. H. Wani, S. Bhattacharjee, D. J. Burritt, & L.-S. P. Tran (Eds.), *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry* (pp. 105-143). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_5)

## 12. Anexos

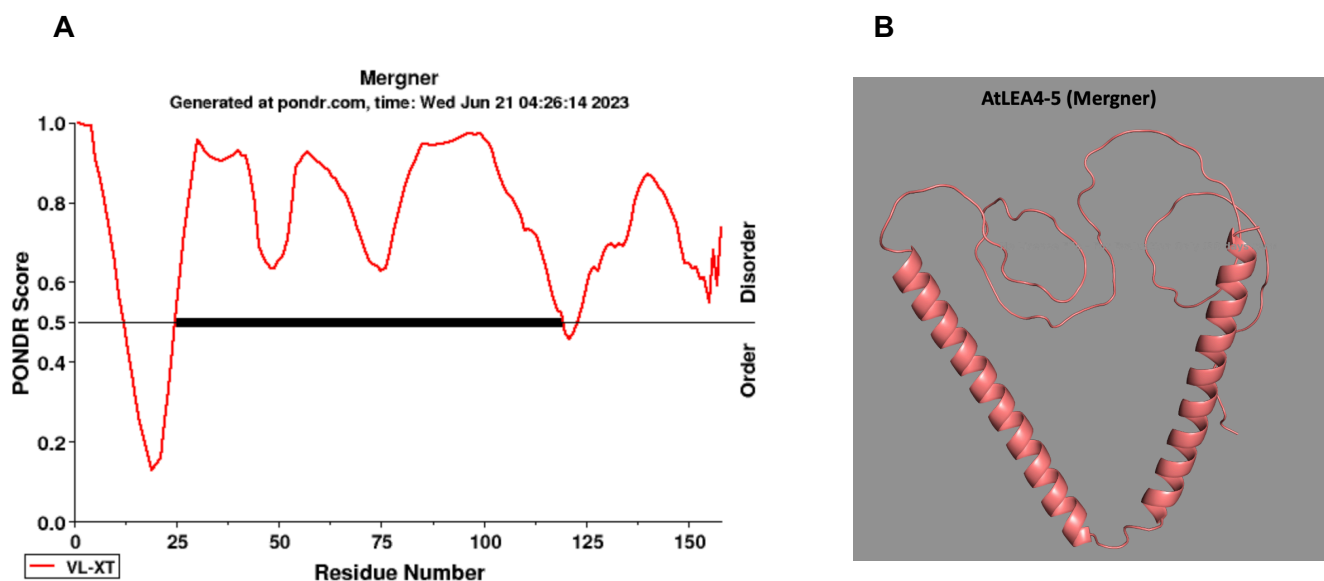




## Anexo A

	Protein	Amino acid	Position	Localization prob	Score	$-\log_{10}(\text{PEP})$	Sequence window
1	AT5G06760	S	87	0.57	207	205.99	AAGAGTGLGLGTATHSTTGQVGHGTGTHQMS
2	AT5G06760	S	9	1	95	3.93	_____MQSMKETASNIAASAKSGMDKTKA
3	AT5G06760	S	14	1	106	4.39	__MQSMKETASNIAASAKSGMDKTKATLEEK
4	AT5G06760	S	3	1	245	90.09	_____MQSMKETASNIAASAKSG
5	AT5G06760	T	83	0.2	174	133.29	AMKEAAGAGTGLGLGTATHSTTGQVGHGTGT
6	AT5G06760	T	85	0.23	174	133.29	KEAAGAGTGLGLGTATHSTTGQVGHGTGTHQ
7	AT5G06760	T	96	0.31	170	133.17	LGTATHSTTGQVGHGTGTHQMSALPGHGTGQ
8	AT5G06760	T	109	0.22	51	6.97	HGTGTHQMSALPGHGTGQLTDRVVEGTAVTD
9	AT5G06760	T	113	0.62	106	37.14	THQMSALPGHGTGQLTDRVVEGTAVTDPIGR
10	AT5G06760	T	135	0.5	227	115.83	TAVTDPIGRNTGTGRTTAHNTHVGGGGATGY
11	AT5G06760	T	140	0.89	127	26.68	PIGRNTGTGRTTAHNTHVGGGGATGYGTGGG
12	AT5G06760	T	148	0.94	135	33.86	GRTTAHNTHVGGGGATGYGTGGGYTG_____
13	AT5G06760	T	157	1	397	Inf	VGGGGATGYGTGGGYTG_____
14	AT5G06760	T	120	1	187	21.08	PGHGTGQLTDRVVEGTAVTDPIGRNTGTGRT
15	AT5G06760	T	123	1	171	13.91	GTGQLTDRVVEGTAVTDPIGRNTGTGRTTAH
16	AT5G06760	Y	156	0.96	86	11.29	HVGGGGATGYGTGGGYTG_____

**Figura 1.** Residuos con potencial de ser fosforilados en la proteína AtLEA4-5 reportados por Mergner *et al.*, 2020 Tomado de la base de datos ATHENA( [http://athena.proteomics.wzw.tum.de:5002/master\\_arabidopsishiny](http://athena.proteomics.wzw.tum.de:5002/master_arabidopsishiny)).



**Figura 2.** Predicción estructural de la proteína AtLEA4-5 con los residuos potencialmente fosforilados reportados por Mergner *et al.*, 2020. **A.** Predicción del desorden estructural con el software online PONDRA. **B.** Predicción del modelo estructural con el software online Alphafold2.

## Anexo metodológico

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para las versiones de SED1

Nombre	Descripción	Secuencia (5'→3')
<b>CCV001</b>	Forward para amplificar a la proteína AtLEA4-5	ATG CAG TCG ATG AAA GAA ACA GC
<b>CCV002</b>	Reverse para amplificar a la proteína AtLEA4-5	TCC AGT ATA TCC CCC GCC GGT TC
<b>IMR001</b>	Forward para amplificar NLS-mTurquoise2	tctgattaacagaCTAGTATGATGCTGCAGCCTAA GAAGAAGAGAAAGGTTGGAGGGGTGAGCAA AGGCGAGGAACTGTTTACCGGC
<b>IMR002</b>	Reverse para amplificar mTurquoise2	CTT TCA TCG ACT GCA TGA GCT CCT TAT ACA GTT CGT C
<b>IMR003</b>	Forward para amplificar mTurquoise2 y AtLEA4-5	GAC GAA CTG TAT AAG GAG CTC ATG CAG TCG ATG AAA G
<b>IMR004</b>	Reverse para amplificar mNeonGreen y AtLEA4-5	GCC CTT GCT AAC CAT AGA TCT TCC AGT ATA TCC CCC GCC
<b>IMR005</b>	Forward para amplificar AtLEA4-5 y mNeonGreen	GGC GGG GGA TAT ACT GGA AGA TCT ATG GTT AGC AAG GGC
<b>IMR006</b>	Reverse para amplificar mNeonGreen y pGPTVII	TGA GCT CCT ACC CGG GTT ATT TGT ACA GTT CAT CCA TGC CC
<b>IMR008</b>	Reverse para amplificar SED1-FN en pGPTVII-nls	tgattaacagACTAGTATGATGCTGCAGCCTAAG AAGAAGAGAAAGGTTGGAGGGGTGAGCAAA GGTGAAGAACTGTTTACCGG
<b>IMR009</b>	Forward para amplificar SED1-FN en pGPTVII-nls	TGAGCTCCTACCCGGGTTATTTGTACAGCTC GTCCATGCC
<b>IMR010</b>	Reverse para amplificar los extremos del vector pGPTVII-nls	CGA TTT GTG ATT TCT ATC TAG ATC TGG
<b>IMR011</b>	Forward para amplificar los extremos de pGPTVII-nls	CAC AAA CTT AAG CAC ACA AGC
<b>IMR012</b>	Forward para amplificar SED1-mTq2-mNG en pDRFLIP38	aaatataccccagcctcgatctagaATGGTGAGCAAAG GCGAGGAACT
<b>IMR013</b>	Reverse para amplificar SED1-mTq2-mNG en	TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTTATTTG TACAGTTCATCCATGCCCATCAC

	pDRFLIP38	
<b>CET025</b>	Forward para amplificar SED1-FN en pDRFLIP38	AAATATACCCCAGCCTCGATCTAGA
<b>CET027</b>	Reverse para amplificar SED-FN en pDRFLIP38	GTAATACGACTCACTATAGGGCG

## 12.1 Protocolo de PCR overlap

El PCR overlap consiste en dos pasos

1. PCR de los tres fragmentos individuales mTurquoise2, AtLEA4-5 y mNeonGreen (previamente cada fragmento fue aislado por PCR con oligonucleótidos específicos) sin oligonucleótidos por 15 ciclos.

<b>Reactivos</b>	<b>x1 rxn (uL)</b>
H <sub>2</sub> O	30.1
5X Platinum II PCR buffer	10
10 mM dNTP mix	1
Platinum II Taq HS DNA Polymerase	0.4
DNA de los 3 fragmentos	2 (mTq2); 1 (LEA) y 1.5(mNG)
Total	50

Condiciones:

94°C - 10 min

94°C - 30 seg

63°C - 1 min

72°C - 2 min

72°C - 5 min

2. Se agregaron 2 µL de oligonucleótidos IMR001 e IMR006. Manteniendo las mismas condiciones a 30 ciclos.

## 12.2 Protocolo de clonación mediante Gibson Assembly

1. En un tubo de PCR añadió para cada constructo los siguientes reactivos:

- SED1-FN

<b>Plantas</b>	
Máster Mix de Gibson	5 $\mu$ L
Vector abierto de pGPTVII-nls	5 $\mu$ L
Inserto (mCer3-AtLEA4-5(fosfo-nula)-Cit)	0.5 $\mu$ L
Total de la reacción	10 $\mu$ L

- SED1-mTq2-mNG

<b>Levaduras</b>	<b>Plantas</b>
Master Mix de Gibson = 5 $\mu$ L	Master Mix de Gibson = 5 $\mu$ L
Vector pGPTVII abierto = 4.5 $\mu$ L	Vector pGPTVII abierto = 2 $\mu$ L
Inserto (mTq2-AtLEA4-5-mNG) = 0.5 $\mu$ L	Inserto (overlap PCR) = 0.5 $\mu$ L
Total de la reacción = 10 $\mu$ L	Total de la reacción = 7.5 $\mu$ L + 2.5 $\mu$ L H <sub>2</sub> O NF

2. Se incubó la reacción a 37°C por 1h.

3. Se transformaron células de *E.coli* One Shot Mach 1 con 2  $\mu$ L de la reacción.

### 12.3 Transformación por choque térmico de bacteria y levadura.

#### Transformación de células de *Escherichia coli* (*One Shot Mach 1*)

Reactivos

Medio LB (Luria- Bertani)

Para 1L:

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 5 g NaCl

Procedimiento

1. Descongelar un tubo de células *One Shot Mach 1* durante 5-10 min.
2. Agregar 2 uL del Gibson Assembly de interés a las células de *E.coli*.
3. Dejar reposar 30 minutos en hielo.
4. Dar un choque de calor de 42°C durante 42 seg.
5. Pasar inmediatamente al hielo y dejar reposar 2 min.
6. Recuperar en 1 mL de LB e incubar el tubo eppendorf a 37°C durante 1h.
7. Plaquear en cajas con el antibiótico de selección.
8. Incubar a 37°C overnight.

#### Transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)

1. Descongelar las células competentes GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* en hielo por 15 minutos.
2. Añadir 2 uL de DNA plasmídico de interés a 100 uL de células competentes.
3. Congelar las células en N<sub>2</sub> líquido por 5 min.
4. Incubar a 37°C por 25 min en un thermoblock.
5. Agregar 1 mL de medio LB sin antibiótico
6. Incubar las células a 30°C por 3 h en agitación (225-250 rpm).
7. Plaquear las células en cajas de medio de LB con rifampicina (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL)
8. Incubar a 28°C por 2-3 días.

## Transformación de células de *Saccharomyces cerevisiae* (BJ5465)

### Reactivos:

- Buffer Lazy bones  
40% PEG 3350  
Acetato de litio 0.1 M  
Buffer Tris (pH 7.5) 10 mM  
EDTA 1 mM

Pesar los reactivos, añadir agua e incubar a 60°C hasta que el PEG se disuelva.

Esterilizar por filtración.

- DNA de esperma de Salmón (2 mg/mL)
- Buffer Tris (pH 7.5) 10 mM

### Procedimiento:

1. Inocular 1 mL de medio YPD con la cepa BJ5465 e incubar a 30°C overnight a 200 rpm.
2. Colectar 1 mL de medio en un tubo eppendorf y centrifugar a 12,000gs por 1 min. Desechar el sobrenadante.
3. Resuspender en 1 mL de Tris 10mM pH 7.4. No vortex
4. Centrifugar a 12,000gs por 1 min y remover el sobrenadante.
5. Resuspender en 500 uL de Lazy bones pipeteando.
6. Añadir 25 uL de DNA de esperma de salmón. Calentar a 100°C (con la tapa abierta) por 5 min y 5 min en hielo.
7. Añadir 500 ng de DNA plasmídico de interés.
8. Mantener a temperatura ambiente por 1h.
9. Dar un golpe de calor a 42°C por 12 min y pasar a hielo por 12 min.
10. Centrifugar a 12,000 gs por 1 min y desechar el sobrenadante.
11. Resuspender en 1 mL de Tris 10mM pH 7.4
12. Plaquear en cajas de SD-ura a 30°C por 2 días.

## 12.4 Ensayo de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

### Reactivos

- Medio LB (Luria-Bertani)

### Para 1L:

- 10 g Triptona
  - 5 g Extracto de levadura
  - 5 g NaCl
  - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [100 mM]  
4.066 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y disolver en 200 mL de agua
  - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [10 mM]  
Dilución 1:10 de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [100 mM]
  - Acetosiringona  
0.294 g de acetosiringona y disolver en 10 mL de DMSO
- Esterilizar por filtración

### Procedimiento

1. Preparar un pre-cultivo de cada constructo y de p19 en 3 mL de LB con antibióticos de selección (Rif + Kan). Incubar a 30°C overnight y con agitación (225 rpm).
2. Al día siguiente, medir la absorbancia de los pre-cultivos para tener una OD600 de 0.02 de cada constructo y p19. Tomar el volumen necesario y transferirlo a un nuevo LB fresco con antibióticos e incubar a 30°C overnight y con agitación (225 rpm).
3. Sacar los tubos de la incubadora, centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender en 5 mL de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10mM. Enseguida, medir la absorbancia haciendo una dilución 1:10 y usando como blanco  $\text{MgCl}_2$  10mM.
5. Calcular el volumen necesario para tener una OD600 de 0.75 de cada constructo en 5 mL de  $\text{MgCl}_2$  + p19 + AS (acetosiringona a 150 mM).
6. Incubar a temperatura ambiente por 3 horas.
7. Hacer pequeñas perforaciones a la parte abaxial de la hoja de *Nicotiana benthamiana* con una aguja de calibre 29.

8. Infiltrar en la parte abaxial de la hoja de *Nicotiana benthamiana* usando la jeringa sin aguja.
9. Regresar las macetas con las hojas infiltradas a las condiciones de crecimiento (16/8 h luz/oscuridad 20 °C).

## 12.5 Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión del meristemo floral

### Reactivos

- Medio de infiltración

Para 300 mL de agua:

- 15 g de sacarosa
- 0.6g de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O
- 75 uL de silwet-77

### Procedimiento para el medio de infiltración

1. Disolver en agua la sacarosa y el cloruro de magnesio hexahidratado.
2. Agregar el silwet L-77.

### Procedimiento floral dip.

1. Inocular en una caja de LB con antibióticos (Rifampicina y Kanamicina) la colonia positiva con el constructo de interés de *A. tumefaciens*.
2. Incubar a 30°C por 2 días.
3. Tomar las células de *A. tumefaciens* con un raspador estéril y transferirlo a un tubo falcón con 30 mL de medio de infiltración fresco.
4. Vortexear el tubo falcón hasta disolver la bacteria en la solución.
5. Transferir a una charola limpia la solución con la bacteria y ajustar el volumen a 300 mL.
6. Tomar las *Arabidopsis thaliana* Col-0, sin silicuas y con botones florales y sumergir por 3-5 min en la solución.
7. Escurrir y secar con papel la solución de *A. thaliana*.
8. Acostar las *A. thaliana* transformadas sin oscuridad overnight en las condiciones de crecimiento (16/8 h luz/oscuridad 20 °C).



## 12.6 Extracción y purificación de DNA vegetal

### Buffer CTAB

- 2.0 g de CTAB
- 10.0 mL de 1M Tris pH 8.0
- 4.0 mL de 0.5M EDTA pH 8.0
- 28.0 mL 5M NaCl
- 40.0 mL H<sub>2</sub>O
- 1g PVP40

Ajustar a pH 5.0 con HCl y aforar a 100 mL con H<sub>2</sub>O.

### Procedimiento

1. Aproximadamente 200 mg de tejido vegetal (una hoja completa) de una plántula de 2-4 semanas. Transferir a un tubo eppendorf de 2 mL.
2. Adicionar 500 uL de CTAB buffer y macerar el tejido con un pistilo estéril.
3. Calentar a 55°C por 15 min el extracto vegetal (con un termoblock).
4. Centrifugar el extracto de planta a 14,000 rpm por 5 min.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y desechar el precipitado.
6. Adicionar 250 uL de cloroformo (alcohol isoamílico / 24:1).
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.
8. Transferir el sobrenadante (fase acuosa con DNA) a un tubo limpio.
9. Adicionar 50 uL de 7.5M de acetato de amonio y 500 mL de EtOH absoluto frío. Invertir la mezcla (el precipitado blanco es el DNA de interés).
10. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min y desechar el sobrenadante.
11. Realizar 2 lavados con 500 uL de EtOH al 70% frío. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.
12. Descartar el sobrenadante y colocar el tubo de cabeza (abierto) sobre papel tipo sanitas para secar.
13. Resuspender en 62 uL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Incubar a 65°C por 10 min.
14. Medir la concentración en ng/uL en el nanodrop.