



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la influencia del ambiente sobre la conformación estructural de las proteínas LEA del grupo 4 de *Arabidopsis thaliana* a través de FRET

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:
Ing. Dante Cosío Acosta

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos Diciembre, 2017



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.

Reconocimientos

Agradecimiento especial al Dr. César Luis Cuevas Velazquez quien participó como *Asesor Técnico* del proyecto de investigación.

Al posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt) para el posgrado de Maestría (No. registro de CVU: 525939) y clave de proyecto de investigación: 221448.

A los miembros del Comité tutorial, por su gran contribución al desarrollo del proyecto,

Tutor principal: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Miembros del comité: Dr. Luis Cárdenas Torres

Miembros del comité: Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

A los miembros del jurado, por haber participado en la lectura y corrección de la tesis,

Presidente: Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Secretario: Dra. Rosario Muñoz Clares

Vocal: Dra. Nuria Sánchez Puig

Vocal: Dra. Svetlana Schishkova

Vocal: Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas

A todos mis amigos de la Maestría y del laboratorio por sus comentarios e ideas.

Y a mi familia por todo su apoyo incondicional y cariño.

Tabla de contenido

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

<i>El estrés abiótico</i>	1
<i>Estrés por sequía y desecación</i>	2
<i>El déficit hídrico y la planta</i>	4
<i>El estatus hídrico de la planta: Potencial Hídrico y sus componentes</i>	5
<i>El contenido relativo de agua CRA</i>	6
<i>Mecanismo de respuesta bioquímica-molecular al estrés: Papel de fitohormona ácido abscísico o ABA y la regulación de genes de estrés</i>	6
<i>Las proteínas LEA</i>	9
<i>Clasificación de las proteínas LEA</i>	10
<i>Grupo1</i>	10
<i>Grupo2</i>	11
<i>Grupo3</i>	12
<i>Grupo4</i>	13
<i>Grupo5</i>	15
<i>Grupo6</i>	15
<i>Grupo7</i>	16
<i>Proteínas intrínsecamente desordenadas o PID´s</i>	18
<i>Fluorescencia</i>	20
<i>Transferencia de energía de resonancia de förster (FRET del Inglés: Förster Resonance Energy Transfer)</i>	22

CAPITULO 2: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

<i>Antecedentes</i>	25
<i>Hipótesis, objetivo general y objetivos específicos</i>	27

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

<i>Características de las cepas bacterianas utilizadas</i>	28
--	----

<i>Células quimiocompetentes</i>	29
<i>Los vectores pFLIP</i>	30
<i>Transformación de bacterias</i>	31
<i>Purificación de DNA plasmídico de pFLIP, AtLEA4-5pEnter, AtLEA4-2pEnter y ArafpEnter mediante lisis alcalina</i>	32
<i>Caracterización de los plásmidos de entrada AtLEApEnter, ArafpEnter y vectores destino pFLIP</i>	33
<i>Verificación del plásmido AtLEA4-5pEnter por PCR</i>	34
<i>Digestión enzimática del DNA plasmídico</i>	35
<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	36
<i>Reacciones de recombinación in vitro utilizando la LR clonasa</i>	37
<i>Reacción en cadena de la polimerasa PCR</i>	38
<i>Estandarización de las condiciones de estrés</i>	39
<i>Caracterización de las construcciones recombinantes</i>	43
<i>Producción de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38 en la cepa Rosetta BL21 mediante inducción por IPTG</i>	43
<i>Obtención de extracto y purificación de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38</i>	44
<i>Ensayos de FRET in vitro con extracto de proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con sus respectivos pares pFLIPi</i>	45
<i>Ensayos de FRET in vitro con proteína pura AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38</i>	46

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<i>Caracterización de las construcciones recombinantes</i>	50
<i>Producción de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38 en la cepa BL21 Rosetta mediante inducción por IPTG</i>	52
<i>Ensayos de FRET in vitro usando extractos proteicos de AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con sus respectivos pares pFLIPi</i>	52
<i>Purificación de las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38</i>	56
<i>Ensayos de FRET in vitro utilizando las proteínas recombinantes purificadas AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38</i>	58

Discusión general.....	68
------------------------	----

CAPITULO 5: TRANSPORTADOR DE ARABINOSA ARAF

Análisis por FRET del efecto del ambiente sobre la conformación de AraFpFLIP38.....	72
---	----

CAPITULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

<i>Conclusiones y Perspectivas</i>	77
--	----

<i>Bibliografía</i>	78
---------------------------	----

<i>Anexos</i>	82
---------------------	----

<i>A. Condiciones de reacción para los PCR de colonia en cepa DH5α</i>	82
--	----

<i>B. Condiciones de reacción para los PCR de colonia en cepa Rosetta BL21</i>	85
--	----

<i>C. Geles de agarosa con los ORF para AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en las construcciones recombinantes en cepa DH5α</i>	87
--	----

<i>D. Geles de agarosa mostrando la restricción enzimática de las construcciones recombinantes mediante EcoRV</i>	93
---	----

<i>E. Cantidades obtenidas a partir de la purificación de DNA plasmídico de pFLIPi, AtLEA4-5pEnter, AtLEA4-2pEnter, AraFpEnter y construcciones recombinantes</i>	95
---	----

<i>F. Geles de agarosa con los ORF para AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en las construcciones recombinantes en cepa Roseta</i>	96
--	----

<i>G. Caracterización del proceso de elución de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y ArafpFLIPi38 mediante gradiente de imidazol</i>	101
--	-----

<i>H. Espectros de intensidad de la fluorescencia de las proteínas recombinantes en extracto</i>	106
--	-----

<i>I. Mediciones de intensidad de la fluorescencia y relación FRET de las proteínas recombinantes en extracto</i>	109
---	-----

<i>J. Promedios de intensidad de la fluorescencia de la proteína pura y su relación FRET</i>	116
--	-----

<i>K. Espectros de intensidad de la fluorescencia de la proteína pura</i>	121
---	-----

<i>L. Controles del sistema FRET para fluoróforo aceptor ante señal de estrés</i>	126
---	-----

Índice de Figuras

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Regiones áridas y semiáridas del mundo.....	2
Figura 2. Representación del proceso de ajuste osmótico.....	4
Figura 3. Factores transcripcionales de la familia DREB.....	8
Figura 4. Características fisicoquímicas de las proteínas LEA 4.....	14
Figura 5. Arreglo de los distintos motivos en cada una de las familias de las proteínas LEA.....	17
Figura 6. Clasificación de las PID's según su función.....	19
Figura 7. Diagrama Jablonski con eventos de absorción y fluorescencia.....	20
Figura 8. Diagrama Jablonski con eventos de la disminución de la fluorescencia.....	21
Figura 9. El fenómeno de FRET y el traslape de las longitudes de onda.....	23

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 10. Inserto AtLEA4-5 en pEnter.....	34
Figura 11. Doble digestión enzimática pFLIPi.....	36
Figura 12. Potencial osmótico de PEG.....	40
Figura 13. Potencial osmótico de glicerol.....	41
Figura 14. Potencial osmótico de KCl.....	42
Figura 15. Potencial osmótico de D-manitol.....	43
Figura 16. Ensayo de FRET con TFE.....	47
Figura 17. Ensayo de FRET con glicerol.....	48
Figura 18. Ensayo de FRET con manitol.....	48
Figura 19. Ensayo de FRET con cloruro de potasio.....	49
Figura 20. Ensayo de FRET con PEG 5,000.....	49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 21. Construcciones obtenidas con los ORF de AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con sus respectivos pares de fluoróforos.....	51
Figura 22. Insertos AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en pFLIPi38.....	51
Figura 23. Separación en gel de poliacrilamida y ensayo de fluorescencia de extracto de AtLEA4-2pFLIPi38.....	52
Figura 24. Espectro de fluorescencia de la proteína recombinante AtLEA4-5pFLIPi38 en extracto y cambio en su cociente de FRET.....	53
Figura 25. Cocientes normalizados de FRET para proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 en extracto con TFE.....	54
Figura 26. Cocientes normalizados de FRET para proteína AtLEA4-5 en extracto con gradiente de TFE.....	55
Figura 27. Control del sistema FRET con ArafpFLIPi en extracto.....	56
Figura 28. Fracciones de flujo, lavado y elución correspondientes a la proteína AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38.....	57
Figura 29. Fracciones de flujo, lavado y elución correspondientes a la proteína ArafpFLIPi38.....	57
Figura 30. Gel poliacrilamida y densitometría de banda para AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y ArafpFLIPi38.....	58
Figura 31. FRET intramolecular y control concentración.....	59
Figura 32. Controles donador cerulean y aceptor citrina en TFE.....	60
Figura 33. Cociente normalizado FRET AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con TFE.....	61
Figura 34. Controles donador cerulean y aceptor citrina en PEG.....	62
Figura 35. Cociente normalizado de FRET para AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con PEG 5000.....	63
Figura 36. Controles donador cerulean y aceptor citrina en KCl.....	64
Figura 37. Cociente normalizado FRET para AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con KCl.....	64
Figura 38. Controles donador cerulean y aceptor citrina en manitol.....	65
Figura 39. Cociente normalizado FRET para AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con D-manitol.....	66
Figura 40. Controles donador cerulean y aceptor citrina en glicerol.....	67

Figura 41. Cociente normalizado FRET para AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con Glicerol.....	67
Figura 42. Predicción del desorden y orden estructural para la proteína AraF obtenidos mediante los algoritmos PONDR y AGADIR.....	73
Figura 43. Estructura cristalográfica del transportador de arabinosa: AraF.....	73
Figura 44. Control sistema FRET con proteína pura AraF-pFLIPi38.....	74
Figura 45. Cociente normalizado de FRET AraFpFLIPi38 con TFE.....	75
Figura 46. Cociente normalizado de FRET AraFpFLIPi38 con PEG 5000.....	75
Figura 47. Cociente normalizado de FRET AraFpFLIPi38 con KCl.....	76
Figura 48. Cociente normalizado de FRET AraFpFLIPi38 con D-manitol.....	76
Figura 49. Cociente normalizado de FRET AraFpFLIPi38 con Glicerol.....	76

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico (Abscisic acid, por sus siglas en inglés).

ABRE: Elementos de respuesta a ABA (ABA Response Elements, por sus siglas en inglés).

ABREP: Proteínas de unión a elementos de respuesta a ABA (ABA Response Element Proteins, por sus siglas en inglés).

AmpR: Resistencia al antibiótico ampicilina.

Cer: Cerulean (Versión de CFP).

CFP: Proteína cyan fluorescente (Cyan Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés).

Cit: Citrina (Versión de YFP).

CmR: Resistencia al antibiótico cloranfenicol.

RWC: Contenido relativo de agua. (Relative Water Content, por sus siglas en inglés).

DNA: Ácido desoxiribonucleico (Desoxyribonucleic Acid, por sus siglas en inglés).

DRE: Elementos de respuesta a sequía (Drought Responsive Elements, por sus siglas en inglés).

DREBP: Proteínas de unión a elementos de respuesta a sequía (Drought Response Element Binding Proteins, por sus siglas en inglés).

DxAm: Emisión de fluorescencia del aceptor (Am), después de excitar el donador (Dx).

DxDm: Emisión de fluorescencia del donador (Dm), después de excitar el donador (Dx).

FRET: Transferencia de energía por resonancia de forster (Forster Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés).

GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés).

IDR: Región intrínsecamente desordenada (Intrinsically Disordered Region, por sus siglas en inglés).

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, por sus siglas en inglés).

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LEA: Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant Proteins, por sus siglas en inglés).

ORF: Marco abierto de lectura (Open Reading Frame, por sus siglas en inglés).

MAPK's: Proteínas cinasas activadas por mitógeno (Mitogen Activated Protein Kinase, por sus siglas en inglés).

MDH: Malato deshidrogenasa.

MoRF's: Regiones de reconocimiento molecular (Molecular Recognition Features, por sus siglas en inglés).

Ni-NTA: nickel-nitrilotriacetic acid.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés).

pFLIPi: Plásmidos de Proteínas indicadoras fluorescentes (Fluorescent Indicator Proteins Plasmids, por sus siglas en inglés).

IDP's: Proteínas intrínsecamente desordenadas (Intrinsically Disordered Proteins, por sus siglas en inglés).

PYR/PYL: Receptores de resistencia a pirabactina (Pyrabactin Resistance/Pyrabactin Resistance Like Receptors, por sus siglas en inglés).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, por sus siglas en inglés).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid, por sus siglas en inglés).

YFP: Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés).

RESUMEN

Durante la evolución, se han seleccionado mecanismos complejos en las plantas que les han permitido resistir a la falta de agua. Un grupo de proteínas, cuya acumulación se ha asociado altamente a esta condición de estrés, es el grupo llamado proteínas abundantes en la embriogénesis tardía o LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*). Debido a que las proteínas LEA se encuentran típicamente acumuladas en las semillas secas ortodoxas, se les ha asignado un rol de protección molecular en la planta durante la sequía.

La mayoría de las proteínas LEA se consideran como proteínas intrínsecamente desordenadas debido a que muestran una elevada flexibilidad estructural en solución acuosa. Sin embargo, para algunas de ellas se ha demostrado que son capaces de adquirir una estructura tipo alfa-hélice en condiciones de baja disponibilidad de agua y/o en condiciones de amontonamiento molecular. Este es el caso para el grupo 4 de las proteínas LEA. Aunado a que este cambio conformacional pudiera ser relevante para un reconocimiento apropiado de sus ligandos o bien, para estabilizar las interacciones con sus blancos, se ha correlacionado el papel protector del grupo LEA 4 con su capacidad de adquirir estructura. Debido a que estas propiedades se han descrito en condiciones *in vitro*, estamos interesados en determinar si cambios conformacionales pudieran ocurrir *in vivo* en condiciones de baja disponibilidad de agua y/o de amontonamiento molecular. Para poder detectar cambios conformacionales ocurridos *in vivo* decidimos usar el sistema de FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*, por sus siglas en inglés). Para esto, como primer paso, establecimos un sistema experimental de FRET de forma *in vitro* usando fusiones de AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con distintos pares de proteínas fluorescentes y evaluamos su respuesta de FRET en distintas concentraciones de osmolitos (glicerol, manitol y KCl) y del amontonador molecular polietilenglicol (PEG 5,000). Nuestros resultados demostraron que ambas fusiones de proteínas, Cit-AtLEA4-2-Cer y Cit-AtLEA4-5-Cer, generaron respuestas de FRET en los diferentes tratamientos probados, siendo consistentes con los resultados previos mediante el estudio por dicroísmo circular. Nuestros resultados también soportan el uso de esta estrategia experimental para determinar si cambios conformacionales ocurren *in vivo*.

ABSTRACT

During evolution, complex mechanisms have been selected in plants to withstand water scarcity. One set of proteins whose accumulation is associated with this stress condition are the so-called Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. They typically accumulate in dry orthodox seeds suggesting a role in plant drought tolerance. Most LEA proteins are considered as intrinsically disordered proteins because they show elevated structural flexibility in aqueous solution. However, for some of them it has been shown that they acquire alpha-helix secondary structure under low water availability and/or macro-molecular crowding. This is the case of group 4 LEA proteins. While this conformational change may be important for an appropriate ligand recognition or stabilization of these interactions, LEA4 protein protective role has also been associated with its order acquisition ability. Because this disorder-to-order transition has been described *in vitro*, we are interested in determining whether these conformational changes occur *in vivo* under water limitation. To be able to detect protein conformational changes *in vivo*, we decided to use FRET (Forster Resonance Energy Transfer) systems. To test this possibility, we first established an *in vitro* experimental FRET system using AtLEA4-2 and AtLEA4-5 protein fused to different fluorescent protein pairs and determine their FRET response in different osmolyte (glycerol, mannitol, KCl) or crowding agent concentrations polyethylene glycol (PEG 5,000). Our results show that both fusion proteins, Cit-AtLEA4-2-Cer and Cit-AtLEA4-5-Cer, produce FRET responses under the different treatments, consistent with previous circular dichroism analyses. These results also support the use of this experimental approach to determine whether these structural changes occur *in vivo*.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

El estrés abiótico

El estrés abiótico es el conjunto de fenómenos ambientales que repercuten negativamente en un sistema biológico que en el caso de esta tesis se enfocará sobre sistemas vegetales. El estudio del impacto de cada una de las condiciones ambientales adversas sobre los sistemas vegetales ha contribuido de manera importante a su mejor entendimiento (Jenks et al., 2005). Entre los factores ambientales que afectan negativamente el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas se encuentran principalmente la disponibilidad de agua, la salinidad y las temperaturas extremas, así como, el déficit de oxígeno en el suelo causado por inundaciones, el estrés oxidativo generado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la concentración de ozono en el medio, entre otros (Buchanan et al., 2000).

Los efectos negativos del estrés abiótico sobre los sistemas vegetales impacta de forma relevante a diferentes aspectos de la sociedad humana; ya que afecta sus recursos alimenticios, vegetales y animales y, a la vez, a la economía que se sustenta en los recursos provenientes de los diferentes cultivos, tanto aquéllos de importancia alimenticia como los de relevancia industrial. Cada año, en el mundo, se estima que existen enormes pérdidas en los cultivos de entre 50-80% debido solamente al efecto del estrés abiótico (Jenks et al., 2005). En particular, el estrés causado por la sequía ha resultado ser uno de los que produce mayores pérdidas en la agricultura; en parte debido a lo imprevisto de su advenimiento y a la severidad con la que se puede llegar a presentar. Actualmente, su impacto se refleja en las pérdidas que llegan a ser, para algunos cultivos como el frijol de hasta el 80%. Así mismo, los cambios en el clima de la Tierra han traído consigo períodos de sequía cada vez más largos y severos que se evidencian por el crecimiento de los desiertos (aproximadamente 35% de la superficie terrestre es árida a semiárida y la cual ya no es útil como tierra de cultivo) y, que ha llevado a producir sequías aún más severas que las que hasta ahora se han presentado (Fig. 1). A este panorama habría que adicionarle el efecto que ha tenido sobre los terrenos cultivables la agricultura intensiva, la cual ha aumentado la concentración de sales provocando por lo tanto una menor disponibilidad de agua para las plantas, aún en condiciones de irrigación artificial (Jenks et al., 2005).

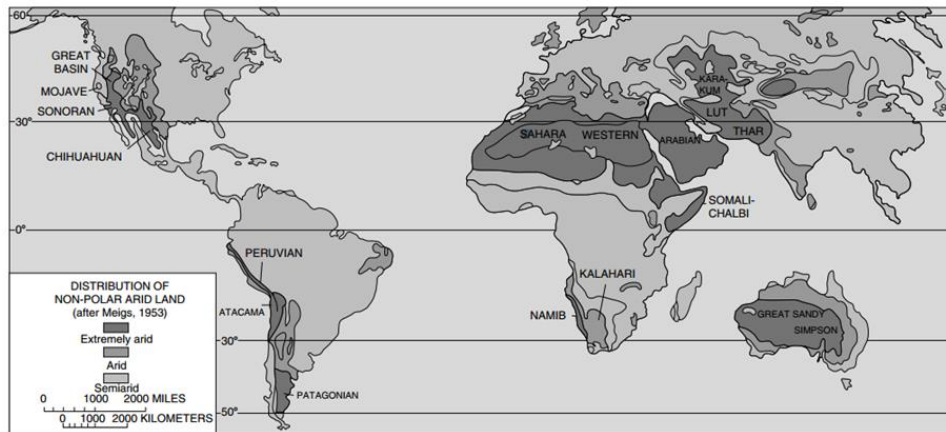


Figura 1. Regiones áridas y semiáridas del mundo (Tomado de Jenks et al., 2005).

Dado que en la naturaleza las plantas están expuestas constantemente a diferentes ambientes estresantes de una forma combinada, como es el caso de las altas temperaturas y la sequía, resulta evidente que no es suficiente estudiar el efecto de cada uno de las condiciones adversas de forma individual, sino también se requiere de incorporar en estos estudios el efecto combinado; ya que se esperaría que este no causaría necesariamente las mismas respuestas (Jenks et al. 2005). En las plantas, como en otros organismos, existen mecanismos que les permiten evadir o tolerar el estrés. En los mecanismos de evasión, la planta trata de evitar su exposición al ambiente hostil; en cambio, en el caso de la tolerancia, ésta incluye mecanismos que le permiten a la planta contender contra el estrés. También se han seleccionado a lo largo de la evolución mecanismos de resistencia en especies particulares que les permiten crecer y reproducirse aún bajo situaciones ambientales adversas. Otra estrategia adaptativa es la aclimatación, o bien, el ajuste en la homeostasis de los individuos en respuesta a la exposición gradual y/o repetida a ambientes desfavorables (Buchanan et al., 2000).

Estrés por sequía y desecación

Es importante resaltar la diferencia que existe entre la tolerancia al estrés por sequía y la tolerancia a la desecación debido a que ambas condiciones involucran la pérdida de agua; sin embargo, existen distintos mecanismos de protección asociadas a cada una de estas respuestas. La condición de tolerancia a estrés por sequía se genera cuando sólo existe

una deshidratación moderada, aproximadamente de un 23% del contenido de agua en peso fresco, o bien, 0.23 g H₂O/g peso seco. En tanto que durante la desecación existe una deshidratación severa, en donde la supervivencia de una población puede ocurrir con un nivel de agua por debajo del 5% o del 0.05 g H₂O/g peso seco (Caramelo, 2009; Shih et al., 2008). Se ha propuesto que en ambas condiciones participan ciertas macromoléculas como azúcares o proteínas, entre otros componentes celulares, lo cual dependerá de la severidad de la pérdida de agua. Entre las hipótesis propuestas asociadas con la tolerancia a la sequía, está aquella que considera que los azúcares o ciertos osmolitos pequeños pueden promover la formación de un escudo de agua alrededor de las proteínas que les permite mantener su actividad. Mientras que en la tolerancia a la desecación se ha sugerido que los grupos hidroxilo de los azúcares permitirían formar puentes de hidrógeno con los residuos polares de las proteínas formando un *biocristal* el cual reemplazaría el volumen de agua perdido y que, finalmente, logra estabilizar a la célula como un todo (Ingram et al., 1996). A este estado se le conoce como *estado vítreo* y, se presenta naturalmente en la semilla seca (Shih et al., 2008). Para lograr una tolerancia a la desecación también se han involucrado respuestas adicionales y diversas, como lo son la modificación estructural de la pared celular, de las membranas y de los organelos; así como, sistemas muy efectivos para la activación de mecanismos de reparación y de eliminación de radicales libres. También, se ha documentado la acumulación de macromoléculas como oligosacáridos y proteínas, dentro de las cuales se encuentran un grupo de proteínas que muestran una elevada acumulación en las semillas secas y cuya abundancia es aparente a partir del inicio de la etapa de embriogénesis tardía cuando las semillas ortodoxas inician su período de deshidratación. Por lo que se les conoce como *proteínas abundantes de la embriogénesis tardía*; o bien, como proteínas LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*). Algunos autores las consideran como uno de los componentes de los *biocristales* en las semillas secas (Shih et al., 2008). El estudio de este tipo de proteínas fue el objetivo del presente trabajo.

El déficit hídrico y la planta

La transpiración o pérdida de vapor de agua mediante los estomas (Bray, 2007) es una forma que podría derivar en un déficit hídrico, el cual se presenta cuando la tasa de transpiración rebasa la tasa de toma de agua por parte de la planta (Bray, 1997). Durante el déficit hídrico, diferentes *osmolitos compatibles*, como los azúcares o ciertos aminoácidos, protegen a la célula modificando el potencial osmótico y, con ello evitando que continúe la pérdida de agua; o bien, a través de mantener el agua necesaria por exclusión molecular alrededor de macromoléculas y, con ello, preservando sus conformaciones activas (Buchanan et al., 2000; Caramelo et al., 2009). Una de las estrategias que utiliza la célula para responder ante una condición de deshidratación parcial es mediante el ajuste en su potencial osmótico (Fig. 2). Los *osmolitos compatibles* permiten disminuir el potencial osmótico en el interior de la célula aumentando su concentración y, en consecuencia, disminuyendo el potencial hídrico, de tal forma que el flujo del agua se mantiene en dirección desde el suelo hacia la raíz, y permitiendo así que se conserve el turgor (Buchanan et al., 2000). Los *osmolitos compatibles* tienen la característica intrínseca de ser altamente solubles, ser inocuos para la célula, de no interferir en sus procesos metabólicos, y de cumplir funciones adicionales como son la protección de enzimas o contender contra el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan bajo condiciones de déficit hídrico (Bray, 2007).

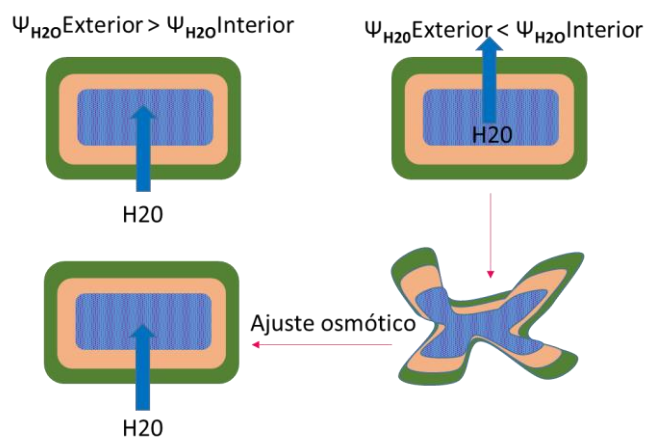


Figura 2. Representación del proceso de ajuste osmótico (Modificado de Bray, 2007).

El estatus hídrico de la planta: El potencial hídrico y sus componentes

Puesto que todo tipo de macromolécula requiere de ciertos niveles de moléculas de agua para su buen funcionamiento, una medida del estatus hídrico de una célula está dado por la determinación de la cantidad de agua disponible, la cual se obtiene al determinar la energía libre del agua, a través de la medida de lo que se conoce como *potencial hídrico*. Este parámetro se ve afectado por factores físicos en el medio, como son la cantidad de solutos disueltos, la presión interna, la fuerza de la gravedad y la presencia de matrices que tengan afinidad por el agua, todo esto a temperatura constante (Buchanan et al., 2000). Dado que la disponibilidad de agua se puede afectar por diferentes factores abióticos o bióticos se ha considerado que el potencial hídrico es un parámetro que refleja el estado de salud de una planta (Taiz et al., 1991). El potencial hídrico (ψ_w) representa una medida de la capacidad para realizar trabajo de las moléculas de agua y es indicativo del agua disponible en un sistema determinado (células o sustratos). El potencial hídrico resulta de la suma del potencial osmótico (ψ_s), potencial de presión (ψ_p), potencial de gravedad (ψ_g) y potencial mátrico (ψ_m). Aunque es una expresión de la energía libre del agua, pero por convención se expresa en unidades de presión, megapascuales o bares (Buchanan et al., 2000).

$$\psi_w = \psi_s + \psi_p + \psi_g + \psi_m \quad \text{Ec.1. Ecuación de potencial hídrico (Buchanan, 2000)}$$

ψ_s = En función de la concentración de solutos disueltos en agua (El potencial hídrico celular disminuye al aumentar la concentración de solutos, lo que a su vez conduce a la disminución del potencial osmótico).

ψ_p = Presión de turgor o presión positiva que ejerce el contenido celular hacia su pared celular (El potencial hídrico celular aumenta si la presión positiva o turgor se incrementa).

ψ_g = Generalmente se desprecia cuando el sistema de análisis es una célula o una planta pequeña. Se toma en cuenta en distancias verticales mayores a 5 m.

ψ_m = En función de la capacidad de unión que presenta el agua hacia las superficies (El potencial hídrico celular disminuye al bajar el potencial mátrico).

El contenido relativo de agua

Otro parámetro que puede representar de forma indirecta el estatus hídrico de una célula, de un tejido o tejidos, de un órgano o de un organismo (e.g. una planta) es el *Contenido Relativo de Agua (CRA)* (o *RWC del inglés Relative Water Content*). El *CRA* se considera, conjuntamente con el potencial hídrico, como las determinantes que nos indican el estado fisiológico de la planta en relación a la disponibilidad del agua (Ec.2). Por ejemplo, el *CRA* crítico para la mayoría de los tejidos vegetales es por debajo del 50% (Buchanan et al., 2000).

$$CRA = \frac{Peso\ fresco - Peso\ seco}{Peso\ turgor - Peso\ seco} * 100$$

Ec. 2. Contenido relativo de agua (Buchanan et al., 2000)

Mecanismo de respuesta bioquímico-molecular al estrés: Papel de la fitohormona ácido abscísico (ABA) y la regulación de genes en la respuesta al estrés

Para la maquinaria celular no le es suficiente disminuir su potencial osmótico a través de eventos meramente físicos (entrada y/o salida de osmolitos de la célula por diferencias en los potenciales), también necesita activar o reprimir genes, empezando con el reconocimiento de una señal que le indique que hay menos agua disponible y la transducción de esa señal, lo cual ocurre a través de ciertos factores, uno de los cuales es la fitohormona ABA. Esta señalización resulta en la amplificación del estímulo percibido por medio de segundos mensajeros, como lo es el ión calcio, lo que finalmente conlleva a ajustes en el metabolismo, la fisiología y el desarrollo de la planta (Buchanan et al., 2000; Bray, 2007). Aunque el conocimiento en relación a los mecanismos de percepción de la célula vegetal ante una situación de déficit hídrico es muy limitado aún, se ha propuesto que uno de ellos puede estar relacionado con la detección de cambios en la presión de turgor en los diferentes tipos celulares, los cuales afectarían el estado de ciertas proteínas superficiales para posteriormente generar una señal bioquímica que desencadenaría en una respuesta molecular a través de la expresión de genes y regulación de la actividad de

proteínas (Bray, 2007) que deriva en la modulación de diversos procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas.

La fitohormona ABA juega un papel crítico durante el desarrollo del embrión y en el proceso de establecimiento de la dormancia o latencia, de la tolerancia a la desecación y de la germinación; en particular, en el caso de semillas ortodoxas, las cuales requieren pasar por un período de desecación para poder proseguir su desarrollo. El ABA es un regulador central durante la etapa de la embriogénesis tardía o maduración de la semilla; ya que, participa en la inducción de la acumulación de reservas de nutrientes y de los procesos que confieren tolerancia a la desecación (Leung, et al., 1998). La regulación de estos procesos implica un aumento en los niveles del ABA en la semilla y, su disminución permite romper la latencia y con ello dar paso a la germinación y desarrollo de la planta. Los niveles endógenos de ABA también aumentan ante varias condiciones de estrés; en particular, se ha ligado íntimamente con aquéllas que causan déficit hídrico (Ingram et al., 1996). Se han investigado algunas de las vías de señalización por las cuales ABA regula la expresión genética. A la fecha se conocen algunos aspectos de cada una de estas vías; por ejemplo, la participación de MAPK's (Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno) y de fosfatasas (Fujii et al., 2007; Meyer et al., 1994). Por otro lado, se han descrito algunos de los posibles receptores de esta hormona, como es el caso de los llamados PYR/PYL (Park et al., 2009), y del receptor de la proteína que une guanósín trifosfato o receptor de la proteína G (Pandey S. et al., 2004). Con base en los fenotipos encontrados para diferentes mutantes nulas en genes para proteínas G, se ha establecido que éstas regulan casi todos los aspectos relacionados a la señalización por ABA en plantas (Pandey et al. 2009). Mutantes en el gen para la proteína tipo receptor acoplado a proteínas G (GPCR del inglés), llamada GCR, muestran un fenotipo de hipersensibilidad al ABA, en muchas de las respuestas típicas para esta hormona (Pandey and Assmann, 2004). En tanto que, mutantes GPCRs de tipo GTG1 y GTG2 muestran un fenotipo de hiposensibilidad. Se ha propuesto que estas últimas funcionan en un complejo como receptores membranales de ABA. En tratamientos con ABA, las plantas en la doble mutante *gtg1 gtg2* mostraron un decremento significativo en el cerrado de los estomas (Pandey et al. 2009).

A la fecha se han detectado, al menos, dos vías de regulación transcripcional en respuesta al estrés abiótico: Una vía independiente y otra dependiente del ABA (Fig. 3). Dentro de la vía ABA-independiente, se encuentran secuencias de regulación o potenciadores en el DNA conocidos como DRE (o *Dehydration Response Elements*, por sus siglas en inglés) y, factores transcripcionales denominados como DREBP (o *Dehydration Responsive Element Binding Proteins*, por sus siglas en inglés). Los elementos DRE contienen una secuencia consenso TACCGACAT denominada Repetidos-C (C por Cold) que fueron identificadas durante el estudio de la respuesta al estrés por frío (Bray, 2007). Dentro de los factores transcripcionales DREB se encuentran dos familias denominadas DREB1/CB, involucradas en la expresión de genes ante estrés por frío, y DREB2 cuya participación está relacionada en la expresión de genes por estrés osmótico (Yamaguchi et al., 2009).

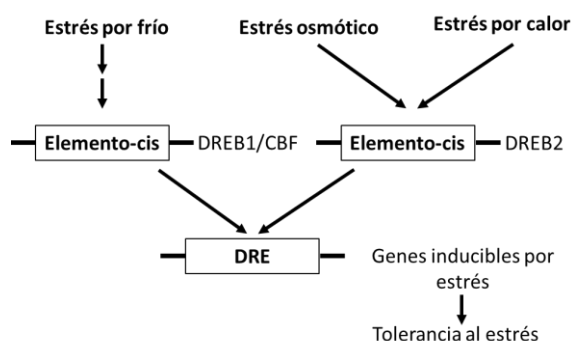


Figura 3. Factores transcripcionales de la familia DREB (Modificado de Yamaguchi et al., 2009).

En la vía ABA-dependiente están los potenciadores ABRE (o *ABA Responsive Element*, por sus siglas en inglés); así como, los factores transcripcionales ABREBP (o *ABA Responsive Element Binding Proteins*, por sus siglas en inglés) (Bray, 2007; Ingram et al., 1996). Las secuencias regulatorias ABRE presentan un motivo repetido ACGT, llamado caja-G, y están presentes en la mayoría de los genes regulados por ABA, dentro de los cuales se encuentran los que codifican para proteínas LEA (Leung et al.1998). Se han identificado tres factores transcripcionales tipo bZIP en *Arabidopsis thaliana* que responden a ABA: AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3 y que se unen a estos elementos *cis* (Bray, 2007).

Las proteínas LEA

Las plantas continuamente se encuentran expuestas a condiciones de estrés generado tanto por factores bióticos como abióticos, por lo que éstas han desarrollado mecanismos complejos para aclimatarse o ajustarse y, en un proceso de evolución, para llegar a adaptarse. Dentro de los factores abióticos que afectan a la planta está la disponibilidad de luz, agua, variación en la temperatura y salinidad del suelo, entre otros (Buchanan et al., 2000). Una condición de déficit hídrico puede ser provocada por la exposición de la planta a temperaturas extremas, particularmente bajas, a salinidad o a sequía. Durante el déficit hídrico se activa y reprime la transcripción de múltiples genes con muy diversas funciones. Entre los genes cuya transcripción se activa bajo estas condiciones están aquellos que codifican para las llamadas proteínas LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*) (Battaglia et al., 2013). Estas proteínas, como su nombre lo indica, se acumulan en niveles elevados cuando se inicia la pérdida de agua durante el desarrollo de las semillas ortodoxas, en la fase tardía de la embriogénesis. En este proceso, la semilla llega a perder hasta el 98% de su contenido de agua. La mayoría de estas proteínas pertenecen a la familia de las *hidrofilinas*, las cuales presentan un elevado contenido de aminoácidos hidrofílicos (con un índice de hidrofiliidad total mayor a 1.0) y de residuos de glicina (> 6%) (Garay-Arroyo et al., 2000). Las hidrofilinas son proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en organismos de los tres dominios de la vida. Mientras que las proteínas LEA son ubicuas en el reino vegetal, encontrándose en plantas no vasculares (e.g. briofitas) y vasculares (e.g. gimnospermas y angiospermas) (Battaglia et al., 2008). Estas proteínas se expresan en órganos vegetativos y reproductivos, generalmente, bajo condiciones de estrés abiótico. Sin embargo, también se llegan a acumular bajo condiciones óptimas de crecimiento en tejidos en donde existe un gradiente pronunciado de potencial hídrico, como lo son ciertas regiones de crecimiento; o bien durante el desarrollo de la semilla o del polen (Battaglia et al., 2008). Generalmente se localizan en el citosol, sin embargo, también se han encontrado en el núcleo, y algunas están en cloroplastos o en mitocondrias (Battaglia et al., 2013). A la fecha, se distinguen siete grupos de proteínas LEA, de acuerdo a la similitud en su secuencia de aminoácidos, lo que sugiere una diversidad funcional (Battaglia et al., 2008). El grupo de investigación del que soy miembro ha estado interesado en estudiar

las bases moleculares y celulares de la respuesta de las plantas a esta condición de estrés ambiental y, entre otros proyectos de investigación, en dilucidar la función de las proteínas LEA, por lo que se han enfocado en el análisis genético, celular, estructural y funcional de tres grupos de estas proteínas, los grupos 1, 4 y 6 de modelos experimentales como la planta *Arabidopsis thaliana* y la leguminosa de origen mesoamericano *Phaseolus vulgaris* (frijol).

Clasificación de las proteínas LEA

La clasificación que hemos seguido es la que propuso en sus inicios el Dr. L Dure (Dure, 1993b), quien consideró como criterio central de clasificación a los motivos conservados entre ellas. Con este criterio, el análisis de las secuencias de las diferentes proteínas LEA llevó a clasificarlas en siete grupos, cada uno de los cuales muestra motivos distintivos (Battaglia et al., 2008). Los primeros cuatro grupos fueron caracterizados inicialmente en algodón. El quinto grupo está compuesto por proteínas LEA hidrofóbicas, las cuales no están dentro de ninguna clasificación por lo que se agrupan como proteínas LEA atípicas. Mientras que los últimos dos grupos, seis y siete, tienen como proteínas representativas las que inauguraron estos grupos PvLEA18 y ASR1, respectivamente (Battaglia, 2008).

Grupo 1

Este grupo está comprendido por proteínas con una composición aproximada de 40% de aminoácidos cargados y de un 18% de glicina, por lo que su estructura se puede predecir como desordenada en solución acuosa. Este grupo está presente en todos los taxones y contiene un motivo altamente conservado de 20 residuos, organizados en tándem de 1 a 4 repetidos en las especies vegetales estudiadas. Así mismo, también se ha descrito que poseen extremos carboxilo y amino altamente conservados. La acumulación de estas proteínas se da en mayor cantidad durante el desarrollo del embrión en semilla seca, aunque también está presente en polen. Los genes para las proteínas LEA del grupo 1 responden a ABA y a condiciones de limitación de agua. En este grupo se pueden encontrar proteínas que van de ácidas a neutras (Tabla 1). Son moléculas pequeñas con

un peso molecular promedio de 11.5 kDa, con un máximo de 20.3 kDa y un mínimo de 6.8 kDa (Shih et al., 2008; Battaglia et al., 2008).

Tabla1. Distribución del punto isoeléctrico en proteínas LEA 1 (Shih et al., 2008).

% de LEAs tipo 1	Punto Isoeléctrico (pI)
58 %	< 6
26%	Mayor o igual a 6 , Menor o igual a 9
16%	> 9

Grupo 2

Este grupo se conoce como RAB (*Responsive to ABA*) o más comunmente como ‘dehidrininas’. El primer nombre es más bien histórico pues ese no lo distingue de las proteínas en los otros grupos, en donde un alto porcentaje de sus genes se regula por ABA, además de que también existen proteínas LEA de este grupo que no responden a ABA. Las proteínas LEA 2 pueden presentar residuos no polares e hidrofóbicos, aunque muestran una notable deficiencia en Trp y Cys. La distinción de este grupo radica en la presencia de una región en la proteína rica en residuos de Lys, regularmente en su zona carboxilo denominada segmento-K. Sin embargo, también existen otros motivos comunmente presentes en proteínas de este grupo como el motivo Y, el cual presenta una secuencia repetida en tándem de 1 a 35 residuos, y un dominio rico en Ser con susceptibilidad a ser fosforilado. La fosforilación de estos residuos se ha asociado con su translocación al núcleo, aunque se localizan principalmente en el citosol. Los diferentes motivos que las caracterizan han llevado a clasificarlas en subgrupos dependiendo de la representación de cada uno de los motivos que las distinguen. A la fecha se han identificado cinco sub-grupos de acuerdo al arreglo y presencia de los dominios K, Y y S: YSK, SK, K, KS, YK (Fig. 5). Estas proteínas varían de neutras a básicas (Tabla 2) y presentan masas moleculares promedio de 18.3 kDa, con un mínimo de 5.3 kDa y un máximo de 66.3 kDa. Se ha reportado que algunos miembros del grupo 2 se acumulan abundantemente durante la desecación de la semilla; así como, por déficit hídrico. Las

dehidrinas en uno de los sub-grupos se caracterizan por ser ácidas, y su acumulación se ha detectado mayoritariamente inducida por bajas temperaturas. Una función que pareciera ser característica de este grupo de proteínas radica en su capacidad de unir iones calcio; tal es el caso de ciertas dehidrinas de Arabidopsis que parecen localizarse en vacuolas y, las cuales unen iones calcio, lo que llevó a sugerir que actúan como buffers de calcio; o bien, cuya función protectora o su localización depende de la unión a este ión. También actúan uniendo metales durante déficit hídrico, lo cual indica que pudieran controlar los niveles de especies reactivas de oxígeno que se generan en esta condición (Shih et al., 2008; Battaglia et al., 2008).

Tabla 2. Distribución del punto isoelectrico en proteínas LEA 2 (Shih et al., 2008)

% de LEAs tipo 2	Punto Isoeléctrico (pI)
7 %	< 6
58 %	Mayor o igual a 6 , Menor o igual a 9
35 %	> 9

Grupo 3

Este grupo se caracteriza por presentar arreglos de once aminoácidos y se divide en dos subgrupos de acuerdo con la diversidad de los onceámeros. Los onceámeros están conservados y contienen residuos hidrofóbicos, y cargados negativa o positivamente. La presencia en tándem de los motivos determina la variabilidad en su masa molecular. El subgrupo 3A comprende a los motivos altamente conservados tres y cinco de los onceámeros. El subgrupo 3B es más heterogéneo en el arreglo de los onceámeros con los motivos uno a cuatro y presenta un quinto dominio exclusivo de este subgrupo (Fig. 5). Estudios de análisis estructural por difracción de rayos X y por espectroscopía de infrarrojo (IR) demuestran que este grupo carece de una estructura secundaria definida en solución acuosa; sin embargo, en presencia de sacarosa, glicerol o etilenglicol adoptan una estructura secundaria estable tipo alfa-hélice (Shih et al., 2008; Battaglia et al., 2008). Una función propuesta para las proteínas en este grupo es que conjuntamente con

azúcares pueden formar un biocristal mediante puentes de hidrógeno otorgando una mayor estabilidad a los azúcares durante la anhidrobiosis, hipótesis conocida como “Remplazo del agua”. Esta hipótesis se basa en ensayos realizados mediante espectroscopía FTIR (Fourier Transformation Infra-Red) comparando los espectros de la mezcla deshidratada de sacarosa y aquellos con LEA3 D-7, ésta última proveniente de polen, se observó una mayor temperatura de transición de formación del biocristal así como mayor fuerza de unión en los puentes de hidrógeno en la mezcla D-7 con sacarosa (Wolkers et al., 2001). Estas proteínas son moléculas con una masa promedio de 22.5 kDa, con un mínimo de 7.2 kDa y un máximo de 67.2 kDa y sus pIs van de neutros a básicos (Tabla 3) (Shih et al., 2008; Battaglia et al., 2008).

Tabla 3. Distribución del punto isoeléctrico en proteínas LEA 3 (Shih et al., 2008)

% de LEAs tipo 3	Punto Isoeléctrico (pI)
20 %	< 6
37 %	Mayor o igual a 6 , Menor o igual a 9
46 %	> 9

Grupo 4

Este grupo de proteínas LEA, al igual que las proteínas LEA de los grupos 1, 2 y 3, no precipitan al ser calentadas en una disolución acuosa durante un período de 10 minutos. Al igual que la gran mayoría de las proteínas LEA, las proteínas LEA 4 son ubicuas en el reino vegetal y tienen un extremo amino-terminal altamente conservado de aproximadamente 70 a 80 residuos y un extremo carboxilo-terminal variable en tamaño (Fig. 4). Son proteínas con una masa molecular promedio de 12.6 kDa, con un mínimo de 8.4 kDa y un máximo de 18.8 kDa, y la mayoría son básicas con valores altos de pI (Tabla 4) (Shih et al., 2008; Battaglia et al., 2008). Los porcentajes de identidad y similitud de las proteínas LEA 4 se determinaron mediante los alineamientos de secuencia (Tabla 5). Mayores detalles sobre este grupo de proteínas LEA se describen en la sección de *Antecedentes*.

Tabla 4. Distribución del punto isoelectrico en las proteínas LEA 4 (Shih et al., 2008)

% de LEAs tipo 4	Punto Isoeléctrico (pI)
22 %	< 6
22 %	Mayor o igual a 6, menor o igual a 9
56 %	> 9

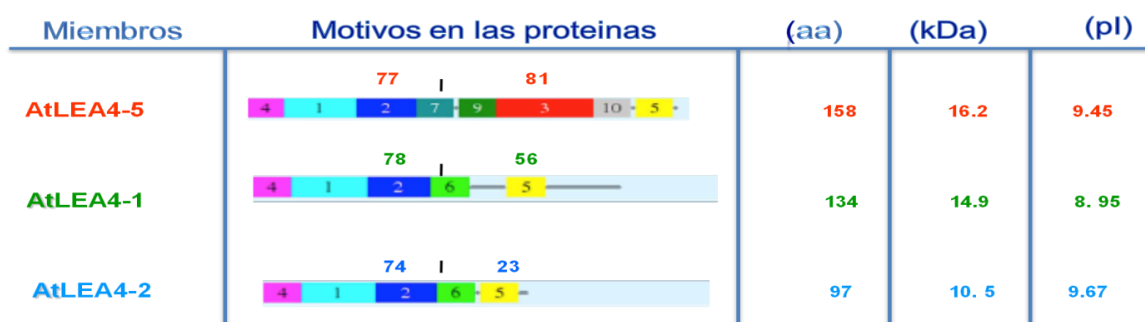


Figura 4. Características fisicoquímicas de proteínas LEA 4. 4-5: Localización en el cromosoma 5, 4-1: Localización en el cromosoma 1, 4-2: Localización en el cromosoma 2. (Tomado de Olvera-Carrillo et al., 2011).

Tabla 5. Porcentajes de similitud e identidad entre proteínas LEA 4 de *A. thaliana*

	AtLEA4-1 vs AtLEA4-2	AtLEA4-1 vs AtLEA4-5	AtLEA4-2 vs AtLEA4-5
% Similitud	66.7	44.3	40.5
% Identidad	56.3	32.9	29.7

Grupo 5

Es un grupo atípico de proteínas las cuales contienen una mayor proporción de residuos hidrofóbicos que las proteínas LEA típicas y presentan una conformación globular. El criterio para integrar este grupo ha sido tan simple como reunir a todas aquellas proteínas LEA con estas características, por lo que en este grupo se podrán encontrar proteínas que no presenten similitud alguna. A pesar de poseer características fisicoquímicas contrastantes con las proteínas LEA típicas, comparten con estas últimas el hecho de que sus transcritos también se acumulan en la última etapa del desarrollo de la semilla, así como en condiciones de sequía, luz ultravioleta, frío, salinidad y en heridas. En general, son proteínas ácidas (Tabla 6), con una masa molecular promedio de 18.1 kDa, con un máximo de 38.5 kDa y un mínimo de 5.3 kDa (Battaglia et al., 2008).

Tabla 6. Distribución del punto isoeléctrico en proteínas LEA 5 (Shih et al., 2008).

% de LEAs tipo 5	Punto Isoeléctrico (pI)
87 %	< 6
6 %	Mayor o igual a 6 , Menor o igual a 9
7 %	> 9

Grupo 6

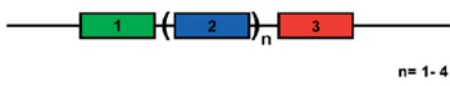
La primera proteína descubierta de este grupo corresponde a la PvLEA18 proveniente de la planta *Phaseolus vulgaris*, comúnmente conocida como frijol. Aunque no hay información directa acerca de su función, estudios de deshidratación *in vitro* muestran que PvLEA18 no desempeñe un papel protector contra la inactivación de enzimas reporteras por lo que se sugiere que puedan existir blancos distintos para este grupo particular de proteínas (Reyes et al., 2005). Las proteínas LEA 6 se distinguen por su pequeño tamaño con masas moleculares que van desde 7 kDa a 14 kDa. Respecto a su estructura, las proteínas LEA 6 presentan cuatro dominios, de los cuales el primero y el segundo están altamente conservados. El primer dominio presenta la secuencia conservada LEDYK, en tanto que el segundo dominio tiene los residuos prolina y treonina conservados en las posiciones seis y siete, respectivamente. La proteína

PvLEA18 se localiza en el citosol y en el núcleo. Durante una condición de desarrollo normal su acumulación ocurre en la zona de expansión de los hipocotilos, en el meristemo apical, en el cilindro vascular y en tejido epidérmico. También está presente en semilla y en polen (Battaglia et al., 2008). También se acumulan en órganos vegetativos en respuesta a déficit hídrico y a tratamientos con ABA. (Rivera-Nájera et al., 2014).

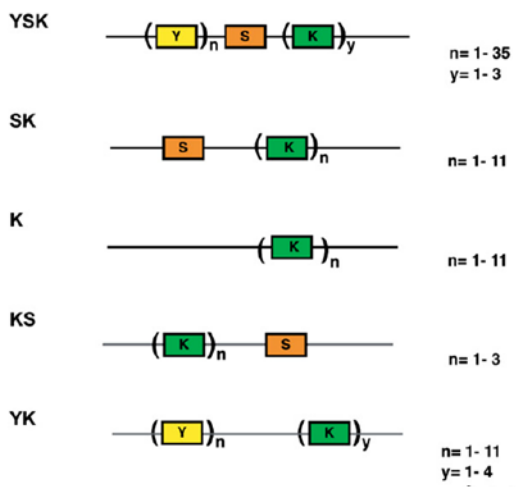
Grupo 7

Este grupo, denominado también como proteínas ASR por Abscisic acid Stress Rippening, fue descrito por primera vez en frutos de tomate en donde se encontró que se acumulaba durante la maduración de este fruto y en respuesta a tratamientos con ABA, de ahí su nombre. Posteriormente se han descrito proteínas similares en otras especies vegetales con excepción de Arabidopsis. Este grupo de proteínas LEA presenta cinco dominios, de los cuales tres (dominios 3, 1 y 2) están altamente conservados. El tercer dominio se encuentra en el extremo carboxilo y contiene una secuencia que señala su translocación al núcleo, mientras que los dominios primero y segundo contienen residuos de His, los cuales se sugiere que unen metales de Zn^{2+} . El quinto dominio sólo está presente en el extremo amino terminal y también es responsable de unir metales de Zn^{2+} . La acumulación de los transcritos es diversa y se ha detectado en fruto, raíz, hoja, polen y semilla. También se ha detectado su acumulación en respuesta a déficit hídrico y durante la embriogénesis tardía de la semilla. Se ha reportado que aunque son desordenadas en solución acuosa, la proteína ASR1 tiene la capacidad de adquirir una conformación estable al unir metales (Battaglia et al., 2008).

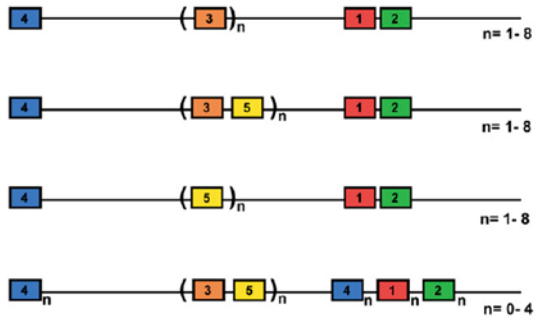
Group 1 (D-19) 83-153 aa 20 mer
PFAM: PF00477



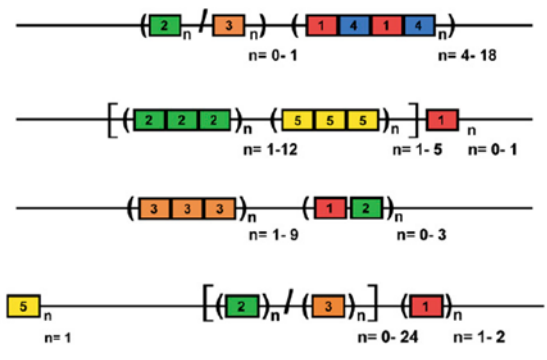
Group 2 (D-11) 80-620 aa
PFAM:PF00257



Group 3 A (D-7) 109-226 aa 11 mer
PFAM:PF02987



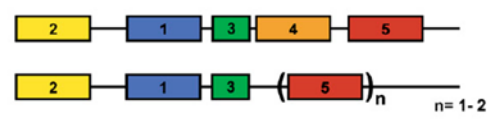
Group 3 B (D-29) 172-555 aa 11 mer
PFAM:PF02987



Group 4 A 80-124 aa
PFAM:PF03760



Group 4 B (D-113) 108-177 aa
PFAM:PF03760



Group 6 (PvLEA18) 80-130 aa
PFAM: PF10714



Group 7 (ASR) 87-268 aa
PFAM:PF02496

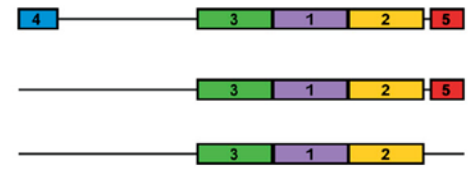


Figura 5. Arreglo de los distintos motivos en cada una de las familias de las proteínas LEA. Los colores son ilustrativos y no representan una relación en secuencia de los motivos entre los diferentes grupos. Los motivos conservados fueron analizados mediante el programa MEME donde el valor (1) corresponde al motivo más conservado (Tomado de Battaglia et al., 2008).

Proteínas Intrínsecamente Desordenadas

Si bien es cierto que el estudio de la estructura y función de las proteínas ha sido en gran parte dirigido hacia el análisis de los datos obtenidos por cristalografía de proteínas; también es cierto que este tipo de análisis ha limitado el conocimiento de las PID's. El primer estudio de una PID fue hecho con la caseína de la leche en donde se usó rotación óptica (McMeekin, 1952), comparándola con distintas proteínas globulares en estado nativo y desnaturalizado. La conclusión fue que la caseína presentaba una configuración desplegada inusual con lo cual se introdujo el concepto principal para una PID que se refiere a su desorden intrínseco (Wright et al., 1999; Dunker 2001; Tompa et al., 2010). Entre los distintos nombres usados para describir este tipo de proteínas se encuentran: proteínas flexibles, proteínas móviles, proteínas reomórficas, nativamente desplegadas, nativamente desordenadas, proteínas parcialmente plegadas, nativamente desnaturalizadas, proteínas camaleón, proteínas maleables, etc. Sin embargo, el término más aceptado hasta la fecha ha sido el de "Proteínas Intrínsecamente Desordenadas" basado más en el estado funcional activo de una proteína o región de la proteína (IDR o Intrinsically Disordered Region por sus siglas en inglés); ya sea, si ésta se encuentre en una conformación colapsada o extendida, en su estructura secundaria o terciaria (Uversky, 2011). La importancia biológica de las PID's se puede abordar y corroborar a través de la función identificada para algunas de ellas y, por su abundancia natural mediante análisis *in silico*; en donde se predice que el 30% de las proteínas eucarióticas presentan desorden. Cabe llamar la atención sobre el hecho de que el 70% de las proteínas consideradas como de señalización también presentan regiones desordenadas. (Uversky, 2011). Esto llevó a la pregunta de por qué el desorden estructural se conservó a lo largo de la evolución en estas proteínas; así como, más interrogantes respecto a su dinámica, mecanismo de unión a posibles ligandos y función.

Muchas de las PID's experimentan un cambio conformacional pasando de un estado desordenado a un estado plegado cuando interactúan con su blanco (Liu et. al. 2014, Uversky, 2011). En la dinámica de "plegamiento y unión acoplada" de una PID existen regiones denominadas MoRF's o (Molecular Recognition Features por sus siglas en inglés), las cuales están involucradas en el reconocimiento del blanco y son las regiones que sufren un cambio de conformación pasando de un estado desordenado a un estado

ordenado (Liu, 2014). Sin embargo, el desorden de la proteína puede mantenerse aún después de la unión en los llamados “complejos difusos”, donde se crea una red de conexiones entre proteínas con sitios de unión dinámicamente distribuidos y de baja afinidad existiendo la misma probabilidad de que cualquier sitio de unión de la proteína desordenada interactúe con cualquier sitio de unión de sus blancos y de esta manera realizar una función. (Liu, 2014; Uversky, 2011). De acuerdo a su función, se ha agrupado a las PID’s en seis tipos, en los que se puede distinguir su participación como proteínas de andamiaje o ensambladoras, como chaperonas, efectores, sitios de reconocimiento, cadenas entrópicas y proteínas de recolección o *scavengers* (Fig. 6).



Figura 6. Clasificación de las PID's según su función (Modificado de Van der Lee, 2014).

Las proteínas denominadas hidrofílicas que se mencionaron anteriormente se pueden agrupar como PID's, ya que comparten ciertas características fisicoquímicas como ser proteína con un alto contenido de amino ácidos cargados y su propensión a poseer un alto desorden estructural (Covarrubias et al., 2011).

Fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de luz de una sustancia y se divide, dependiendo del estado excitado del electrón, en los procesos de fluorescencia y fosforescencia. El presente trabajo se enfoca en el proceso de fluorescencia, el cual ocurre apartir de un estado singlete excitado del electrón (Fig. 7). La absorción de luz es un proceso en el cual la energía de un fotón se transfiere a un electrón. La absorción es un evento instantáneo (10^{-15} s) de tal forma que no existe el tiempo necesario para experimentar un movimiento molecular. Una vez que el electrón ha sido excitado, este puede experimentar una relajación vibracional cayendo a niveles energéticos inferiores o cruzar de un estado singlete a otro, proceso llamado conversión interna con un lapso de tiempo de 10^{-12} s. La fluorescencia es un proceso radiativo con un tiempo de vida de 10^{-9} s que ocurre a un nivel de energía menor en comparación a la absorción y a una mayor longitud de onda, o desplazamiento de Stokes (Lakowicz, 2006).

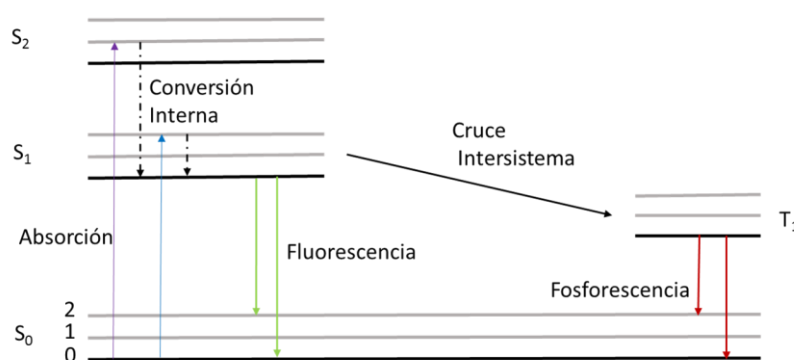


Figura 7. Diagrama Jablonski con eventos de absorción y fluorescencia: Absorción (Flecha morada y azul), Fluorescencia (Flecha verde), Fosforescencia (Flecha roja). S₀: Estado singlete excitado basal, S₁: Estado singlete excitado primario, S₂: Estado singlete secundario, T₁: Estado triplete excitado (Modificado de Lakowicz, 2006).

El apagamiento de la fluorescencia, o quenching, puede ser ocasionado por mecanismos como la desactivación colisional y por FRET (Fig.8). La desactivación colisional sucede cuando el fluoróforo en estado excitado entra en contacto con una molécula provocando que el fluoróforo regrese a su estado basal de energía S₀. Entre las moléculas que pueden intervenir como desactivadoras se encuentra el oxígeno, halógenos, aminas y moléculas deficientes en electrones como la acrilamida. Por otra parte, FRET es un proceso que deja

menos energía disponible a la molécula donadora y que en consecuencia baja su emisión de fluorescencia (Lakowicz, 2006). A continuación, se describe detalladamente el proceso de FRET.

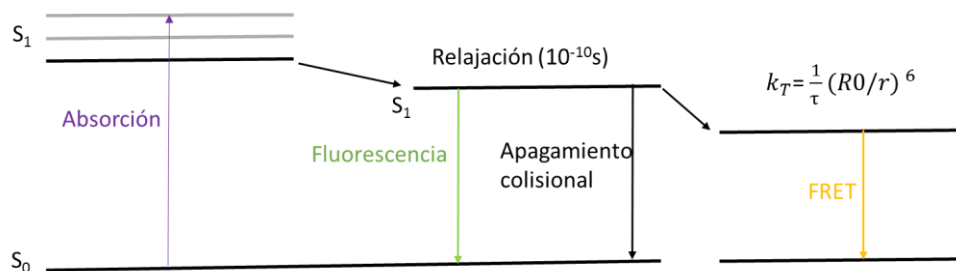


Figura 8. Diagrama Jablonski con eventos de la disminución de la fluorescencia: Apagamiento colisional (flecha negra) y FRET (flecha amarilla). k_T : Velocidad de la transferencia de energía (Modificado de Lakowicz, 2006).

Transferencia de Energía por Resonancia de Forster (Forster Resonance Energy Transfer, FRET)

A continuación se presentan algunas de las definiciones descritas en la literatura acerca de la transferencia de energía por resonancia de Forster:

- “Es el proceso por el cual el estado energético excitado de un fluoróforo donador se transfiere a un segundo fluoróforo aceptor cercano como resultado de interacciones eléctricas dipolo-dipolo entre ambos fluoróforos” (Wouters, 2013)
- “Es un efecto fotofísico en donde la energía se transfiere de un fluoróforo donador, previamente excitado, a uno receptor” (Verveer et al., 2003).
- “Es un proceso de transferencia de energía sin radiación desde un fluoróforo donador a un segundo aceptor apropiadamente posicionado” (Chen et al., 2003)

Cuando los criterios de traslape en las longitudes de onda de la emisión del donador y excitación del aceptor, la orientación correcta de ambos dipolos y la corta distancia entre fluoróforos se cumplen, se transfiere la energía y, finalmente, esto conlleva a una intensidad mayor de fluorescencia por parte del receptor (Ec. 3 y Ec. 4) (Chen et al., 2003). Sin embargo, el primer criterio de traslape de la longitud de onda de emisión del donador y la excitación del receptor para que ocurra FRET, también es causante de ruido y ‘contaminación’ directa e indirecta en el espectro de interés por parte del donador hacia el receptor por lo que es necesario ‘limpiar’ la señal de *FRET* (Fig. 9) (Wouters, 2013). La contaminación directa se genera por el traslape en las longitudes de onda de excitación del donador y aceptor dando como resultado la excitación directa de la molécula receptora por la excitación del donador y su consecuente emisión. La contaminación indirecta se puede producir por el traslape del espectro de emisión del donador y del receptor, dando como resultado un filtrado de fotones de la molécula donadora en la longitud de onda de emisión en el rango de detección del canal FRET (Altenbach, 2009; Chen et al., 2003; Sekar, 2003; Wouters, 2013). Como se mencionó anteriormente, es necesario ‘limpiar’ la señal de FRET restando ambos efectos ya que la señal obtenida en estas condiciones sería mayor a la real. Sin embargo, mientras que las moléculas donadora y aceptor se encuentren físicamente conectadas, lo cual sucede normalmente

en los sensores FRET, la estequiometría se mantendría fija por lo que la contaminación de la señal FRET puede ser tolerada (Wouters, 2013).

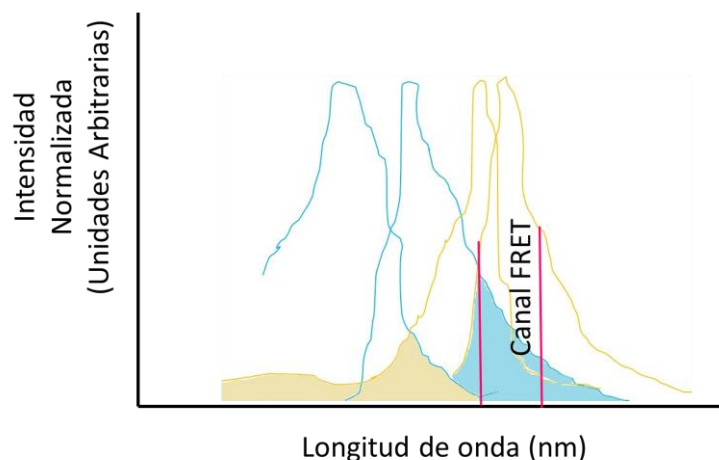


Figura 9. El fenómeno de FRET y el traslape de las longitudes de onda. Color crema: Contaminación directa. Color celeste: Contaminación indirecta. (Modificado de Chen et al., 2003)

$$R_0 = .0218 [K^2 \times \Phi_D \times n^{-4} \times J]^{1/6}$$

Ec. 3. Distancia de Forster (Wouters, 2013)

Donde:

R_0 = Separación Crítica Molecular o Distancia de Forster (distancia a la que el 50% de la población donadora excitada se desactiva por FRET, o distancia a la cual la transferencia de energía es de 50 %).

K^2 = Factor de Orientación entre dipolos Rango (0-4).

Φ_D = Rendimiento de Fluorescencia del donador en ausencia del aceptor.

n = Índice de refracción del medio.

J = Traslape entre emisión del donador y excitación del aceptor.

La eficiencia de FRET o E puede expresarse como un cociente de distancias entre R_0 y R (Ec.4):

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$$

Ec. 4. Eficiencia de FRET distancias (Wouters, 2013)

Donde:

R = Distancia real entre molécula donadora y receptora.

O bien, como un cociente de intensidades de fluorescencia (Ec.5), donde:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Ec. 5. Eficiencia de FRET fluorescencias (Wouters, 2013)

Donde;

F_{DA} = Intensidad de Fluorescencia del aceptor en presencia del donador.

F_D = Intensidad de Fluorescencia del donador.

CAPITULO 2: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes

En plantas superiores, el grupo 4 de las proteínas LEA (LEA 4) muestra un elevado nivel de conservación a lo largo de la evolución. El análisis filogenético de esta familia ha mostrado una posible sub-especialización funcional en dos sub-grupos (Olvera-Carrillo et al., 2010). En el genoma de *A. thaliana*, el grupo 4 de las proteínas LEA está codificado por los genes *AtLEA4-1*, *AtLEA4-2* (ambos del sub-grupo 4A) y *AtLEA4-5* (sub-grupo 4B). Análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de las proteínas en este grupo han llevado a definir un dominio N-terminal altamente conservado, de aproximadamente 70 a 80 residuos de aminoácidos, que presenta una tendencia hipotética a formar una alfa hélice anfipática (Dure, 1993b; Battaglia et al., 2008) y, un dominio C-terminal con una baja conservación, de longitud variable y con una tendencia a presentar estructuras de vueltas al azar ('random coil') (Fig. 4) (Battaglia et al., 2008; Olvera-Carrillo et al., 2010).

La mayor acumulación para las proteínas LEA del grupo 4 se da en la etapa de embriogénesis tardía, cuando se inicia el proceso obligado de deshidratación de la semilla. Aunque en niveles menores, también se acumulan en los órganos vegetativos durante el crecimiento y desarrollo de la planta en respuesta a condiciones de limitación de agua impuestas por deshidratación parcial, salinidad o frío (Olvera-Carrillo et al., 2010). Se ha observado que plantas de *Arabidopsis* que sobre-producen la proteína *AtLEA4-5* muestran una mayor tolerancia a sequía en etapa adulta que las plantas silvestres. Asimismo, la sobre-producción de la proteína *AtLEA4-5* confirió mayor capacidad de recuperación después de un tratamiento de sequía severa, además de inducir un mayor número de yemas axilares y florales. En contraparte, aquellas mutantes en las que no se expresaban una, dos o a las tres proteínas LEA 4 mostraron un fenotipo de mayor sensibilidad al déficit hídrico (Olvera-Carrillo et al., 2010).

Aunque a la fecha, no se ha determinado con precisión la función de este grupo de proteínas, ensayos *in vitro*, en donde se someten a enzimas reporteras lactato deshidrogenasa o malato deshidrogenasa (LDH o MDH) a tratamientos de deshidratación parcial o de congelamiento-descongelamiento, han demostrado que estas proteínas son

capaces de prevenir la inactivación de la enzima reportera. Además de evitar los cambios conformacionales responsables por la pérdida de actividad ante estas condiciones (Reyes et al., 2005; 2007; César-Velázquez, 2016). Resultados similares se han obtenido con proteínas LEA de otros grupos y con algunas hidrofílicas de bacterias y levaduras (revisado por Battaglia et al., 2008). Para explicar estos resultados se han propuesto dos mecanismos principales; uno en el que se plantea que varias moléculas de proteínas LEA forman un escudo alrededor de la proteína blanco para evitar los cambios conformacionales provocados por los efectos del estrés y, otro en el que se propone una interacción directa entre la proteína LEA y su proteína blanco (Olvera-Carrillo et al., 2011; Cuevas-Velazquez et al., 2014). Dado el desorden estructural que se ha predicho por análisis *in silico* para las proteínas LEA y, el ya demostrado para las proteínas LEA 4, en particular, hemos propuesto que las proteínas LEA son capaces de adoptar una estructura más estable (de alfa hélice) bajo condiciones de limitación de agua. Lo anterior se demostró recientemente por análisis de dicroísmo circular para la proteína PvLEA6 de frijol (Rivera-Nájera et al., 2014) y para las proteínas AtLEA4 (Cuevas-Velázquez, 2016). Esto ha llevado a proponer que este cambio estructural podría ser relevante para el reconocimiento de los ligandos a ser protegidos por las proteínas LEA y/o para la estabilización de esta interacción. Así mismo, podría ser relevante para la especificidad y/o eficiencia en su función protectora. Este descubrimiento podría ser importante no sólo para la función de las proteínas LEA mismas, sino para algunas otras proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs). Este grupo de proteínas ha cobrado relevancia en el área de la biología estructural y funcional de proteínas debido a su abundancia en genomas eucariontes y procariontes. Cabe hacer notar que las PIDs están representadas en, aproximadamente, un 30 % en el genoma humano. Aunado a ello, a las PIDs también se les han asignado funciones centrales en las células, ya que se ha demostrado que participan como ‘nodos’ en diversas vías de señalización o que funcionan como factores transcripcionales en diversos procesos. Para algunas de estas PIDs se ha demostrado que adquieren estructura, generalmente de alfa hélice, al momento de interactuar con su blanco, lo cual se ha convertido en un paradigma para estas proteínas (Sun et al., 2013; Fink, 2005).

Es por lo anteriormente dicho que en este trabajo se propone abordar la pregunta de si la capacidad de las proteínas LEA 4 de plegarse *in vitro* ante condiciones prevalentes en baja disponibilidad de agua también ocurre *in vivo* bajo la misma condición de estrés.

Hipótesis

La generación de construcciones quiméricas utilizando proteínas fluorescentes que flanqueen a las proteínas LEA del grupo 4 permitirán determinar sus cambios conformacionales bajo condiciones prevalentes durante el déficit hídrico.

Objetivo

Estudiar los cambios conformacionales de las proteínas LEA del grupo 4 de *Arabidopsis thaliana* mediante análisis por transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

OB1 Establecer el sistema experimental de FRET que permita detectar cambios conformacionales *in vivo*.

OB1.1 Obtener los plásmidos de expresión con los ORFs para las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 y los pares de fluoróforos a probar.

OB1.2 Determinar la eficiencia de cada proteína quimérica bajo condiciones que generen cambios conformacionales.

OB2 Determinar *in vitro* los posibles cambios conformacionales de las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 a través de FRET en diferentes condiciones.

CAPITULO 3: MATERIALES y MÉTODOS

Características de las cepas bacterianas utilizadas

Para realizar las transformaciones con los vectores pFLIPi (presentan inserto *ccdB*) se utilizó la cepa DB3.1; ya que, presenta la mutación *gyrA462*, la cual altera el gen para la girasa lo que le confiere resistencia al producto del gen *ccdB*. Por otra parte, para llevar a cabo la obtención de plásmidos, PCR de colonia, pruebas control y transformaciones con el producto de la recombinación se utilizó la cepa DH5 α . En esta última cepa el gen *gyrA462* no está mutado por lo que permite la selección apropiada de colonias recombinantes mediante el sistema de *Gateway*. Por otra parte, Rosetta BL21 contiene a los ácidos ribonucleicos de transferencia para los codones AUA (Isoleucina), AGG (Arginina), AGA (Arginina), CUA (Leucina), CCC (Prolina) y GGA (Glicina) de proteínas eucarióticas que comúnmente no se encuentran en la cepa bacteriana de *E. coli* con motivo de aumentar la producción de proteína (Tabla7).

Tabla 7. Resistencia natural y genotipo de las cepas bacterianas utilizadas

Cepas <i>Escherichia coli</i>	Resistencia a antibióticos	Genotipo
DB3.1	Streptomycin	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , Δ (<i>sr1-recA</i>), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^r), <i>xyl5</i> , Δ <i>leu</i> , <i>mtl1</i>
DH5 α	Ácido nalidíxico	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _{KM} K ⁺), λ ⁻
BL21 Rosetta	Cloranfenicol	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) pRARE (Cm ^R)

Para corroborar la identidad de ambas cepas se crecieron en presencia de distintos antibióticos como kanamicina, ampicilina, nalidíxico, cloranfenicol y streptomina. Para esto, se puso un inóculo de cada cepa en tubos de ensayo con 3 ml de medio Luria con 3 ul de antibiótico. Cada ensayo se realizó por duplicado. Ver Tabla 8.

Tabla 8. Crecimiento de cepas utilizadas

	Kanamicina	Ampicilina	Nalidíxico	Cloranfenicol	Streptomina
DH5	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
DB3.1	Negativo	Negativo	Ligeramente	Negativo	Positivo

Células quimiocompetentes

Las células quimiocompetentes se prepararon usando protocolo descrito por *Invitrogen web*. Se agregó 1 ml de inóculo (3 ml de medio LB+ células *ON*.) a 100 ml de medio Luria Broth (LB) y se dejó en agitación (incubadora New Brunswick Scientific) a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.45 a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) (espectrofotómetro BECKMAN DU 640). Posteriormente, las células se enfriaron por un lapso de 20 min a 4 °C y se continuó con el proceso de centrifugación a 5000 rpm durante 10 min manteniendo la temperatura a 4 °C. En seguida se eliminó el sobrenadante y se conservó la pastilla de células. Se añadieron 5 ml de cloruro de calcio 0.1 M en donde se resuspendieron las células hasta obtener una mezcla homogénea. Dicha mezcla se almacenó durante 1 h, con el fin de aumentar la eficiencia, manteniendo la temperatura a 4 °C. Se repitió el paso de centrifugación bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de cloruro de calcio 20 mM en 10% glicerol. Se obtuvieron un total de 40 alíquotas cada una con un volumen final de 50 µl de la suspensión celular. Las células quimiocompetentes se almacenaron a -70 °C. Cabe mencionar que la eficiencia de transformación con estas células se verificó mediante la fórmula obtenida del mismo manual (Ver Ec. 6), usando como vector a pUC19 (10 pg/µl) (Invitrogen, lote: 1155132), el cual contiene con marcador de selección la resistencia a ampicilina (Amp^R) transformando con un volumen de 1 µl.

$$\epsilon = \frac{\text{Número de colonias o transformantes}}{\text{pg DNA transformante}} * \frac{E^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} * \frac{\text{volumen total}}{\text{volumen en placa}}$$

Ec. 6. Cálculo de la eficiencia de transformación

$$\text{DB3.1 } \epsilon = \frac{16 \text{ colonias transformantes}}{10 \text{ pg DNA transformante}} * \frac{E^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} * \frac{1000 \mu\text{l}}{900 \mu\text{l}} = \frac{1.7E^6 \text{ colonias}}{\mu\text{g DNA}}$$

$$\text{DH5}\alpha \epsilon = \frac{23 \text{ colonias transformantes}}{10 \text{ pg DNA transformante}} * \frac{E^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} * \frac{1000 \mu\text{l}}{900 \mu\text{l}} = \frac{2.5 E^6 \text{ colonias}}{\mu\text{g DNA}}$$

$$\text{Roseta BL21 } \epsilon = \frac{35 \text{ colonias transformantes}}{50 \text{ ng DNA transformante}} * \frac{E^3 \text{ ng}}{\mu\text{g}} * \frac{1000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}} = \frac{7E^4 \text{ colonias}}{\mu\text{g DNA}}$$

Vectores pFLIPi

Se utilizaron los vectores pFLIPi37, pFLIPi38, pFLIPi39, pFLIPi42 y pFLIPi43, diseñados y proporcionados por el Dr. Alexander M. Jones (Ver Tabla 9). Dichos vectores presentan un inserto de 1667 pb con el gen *ccdB* y un marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm^R). Cada vector contiene el inserto *ccdB/Cm^R*, el cual está flanqueado por su respectivo par de fluoróforos. Además, todos contienen el gen para la beta-lactamasa la cual confiere Amp^R que permite la selección positiva de las colonias y la secuencia repetida CAT que codifica para una etiqueta de histidinas fusionada hacia el extremo amino del fluoróforo citrina.

Tabla 9. Propiedades de los vectores pFLIPi

Vector pFLIPi	Tamaño (pb)	Par de fluoróforos	Descripción	Color
pFLIPi37	6166	Cit-Cer	Citrine-Cerulean	Amarillo-Azul
*pFLIPi38	6166	sCit-sCer	stickyCitrine-stickyCerulean	Amarillo-Azul
*/**pFLIPi39	6094	sAFPt9-t7sCFPt9	Afrodita-Cyan	Amarillo-Azul
*pFLIPi42	6166	Cit-mCer	Citrine-monomeric Cerulean	Amarillo-Azul
*/**pFLIPi43	6139	sAFPt9-sCer	sAfrodita-sCerulean	Amarillo-Azul
*s = tendencia a formar dímero , m= monómero **t7/t9=Eliminación de 7/9 aminoácidos en -N o -C terminal				

Los vectores FLIPs (*Fluorescent indicator proteins*, por sus siglas en inglés) presentan algunas diferencias. El vector pFLIPi37 contiene la región codificante de la versión silvestre de las proteínas fluorescentes citrina y cerulean, las cuales presentan una tendencia ligera a formar dímeros. El vector pFLIPi38 también contiene la secuencia que codifica para citrina y cerulean, sin embargo, el dímero que se forma entre ambas proteínas es más estable. El vector pFLIPi39 contiene las regiones codificantes para la proteína fluorescente Afrodita, la cual es una versión de la proteína Venus que, a su vez, es una versión mejorada de YFP con menor sensibilidad a ciertas condiciones ambientales, como al pH ácido o la concentración de iones cloro. Afrodita corresponde a una versión diversificada en codones de Venus con el propósito de evitar una posible recombinación entre secuencias de nucleótidos que codifican CFP y YFP, puesto que presentan una alta identidad debido a que ambas proteínas provienen de GFP. Cerulean es una versión mejorada de CFP con un mayor coeficiente de extinción y rendimiento cuántico. En el caso del vector pFLIPi42, este contiene la secuencia que codifica la forma monomérica de cerulean.; en tanto que el vector pFLIPi43 contiene la secuencias para las versiones de afrodita y cerulean que forman dímeros más estables (Jones AM et al., 2014; Vinkenborg et al., 2007).

Transformación de bacterias

Las células quimiocompetentes de la cepa DB3.1 se transformaron con los vectores pFLIPi; en tanto que las células quimiocompetentes de la cepa DH5 α se transformaron con los plásmidos AtLEA4-5pEnter, AtLEA4-2pEnter y Araf-pEnter los cuales contienen los marcos abiertos de lectura para AtLEA4-5, AtLEA4-2 y AraF; así como, con los productos de las reacciones de recombinación usando el protocolo de transformación descrito por *Invitrogen*. Un volumen total de 50 μ l de células se transformó mediante choque térmico a 42 °C, por un lapso de 1 min con la cantidad apropiada de DNA plasmídico, se dejó reposar 1 min en hielo y se repitió el choque térmico. Las células se recuperaron inmediatamente en 1 ml de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Finalmente, se sembró un volumen de 900 μ l y 100 μ l de la mezcla de transformación y se incubó durante toda la noche a 37 °C. En el caso de los productos de cada recombinación, el volumen total de reacción fue de 5 μ l para transformar 50 μ l de células

DH5 α quimiocompetentes. La transformación de Roseta BL21 fue con ADN plasmídico aislado por minipreparaciones a partir de la cepa DH5 α .

Purificación del DNA plasmídico de pFLIPi, AtLEA4-5pEnter, AtLEA4-2pEnter y Araf-pEnter mediante lisis alcalina

Preparación del inóculo bacteriano

A un tubo de ensayo con un volumen de 3 ml de medio LB se añadieron 3 μ l del antibiótico ampicilina (100 mg/ml) o kanamicina (50 mg/ml) y se inocularon con las células bacterianas utilizando un asa bacteriológica. Se incubaron por 12 h a 37 °C. Para cada minipreparación se partió de 6 mL de cultivo.

Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se obtuvo por minipreparaciones usando el paquete de GeneJET (Thermoscientific). Para cada minipreparación se procesó un volumen inicial de 6 ml de cultivo. Para esto, se centrifugó a 13,200 rpm durante 2 min 1ml de cultivo en un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 ml, se repitió la operación hasta completar el volumen inicial de 6 ml y se obtuvo una pastilla de células. Se añadieron 250 μ l de solución de resuspensión obteniendo una mezcla completamente homogénea. Posteriormente, se añadieron 250 μ l de solución de lisis, agitando 6 veces hasta que se obtuvo una mezcla viscosa. Inmediatamente después se añadieron 350 μ l de solución de neutralización, mezclando 6 veces hasta que se obtuvo una solución viscosa con fragmentos de coloración blanco. A continuación, se llevó la centrifugación durante 5 min a 13,200 rpm y se transfirió el sobrenadante a la columna GeneJet Thermoscientific. Nuevamente, se centrifugó a 13,200 rpm durante 1 min y se descartó el sobrenadante quedando adherido el DNA a la columna de sílice. Se añadió a la columna 500 μ l de solución de lavado (conteniendo etanol al 96%) con el objetivo de eliminar los contaminantes, se centrifugó durante 1 min a 13,200 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso de lavado con etanol y además se centrifugó 1 min adicional para eliminar el etanol residual. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y, para eluir el DNA plasmídico adherido a la columna, se añadieron 30 μ l de agua mili-Q, se incubó durante 2

min y se centrifugó 2 min a 13,200 rpm. Se descartó la columna y se generaron viales con 30 µl de DNA plasmídico. Los viales se almacenaron a -20 °C. El plásmido resultante fue utilizado para transformar las respectivas cepas de *E. coli*.

Cuantificación del DNA

La concentración de DNA se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm (espectrofotómetro Nanodrop-ND1000). Para medir la absorbancia se utilizó la fórmula:

$$\text{Absorbancia} = -\log \left(\frac{\text{Intensidad}_{\text{muestra}}}{\text{Intensidad}_{\text{blanco}}} \right)$$

Ec. 7 Determinación de la absorbancia

La concentración de la muestra denotada por la variable **c** fue calculada con la Ley de Beer-Lambert:

$$C = (A * e) / b$$

Ec. 8 Ley de Beer-Lambert para ácidos nucleicos

Donde:

A: Absorbancia, e: coeficiente de extinción molar nucleicos (50 ng*cm/µl), b: longitud del “paso de luz” (10 mm), c: concentración de la muestra (ng/µl)

Caracterización de los plásmidos de entrada AtLEApENTER, ArafpEnter y vectores destino pFLIPi

Se realizó una dilución 1:10 de los plásmidos y vectores descritos en Tabla (Anexo E). Posteriormente se transformó con 1 µl de la dilución equivalente a un rango entre 20-50 ng y se plaqueó un volumen de 50 µl. Con el fin de caracterizar el comportamiento de todos los plásmidos y vectores en su respectiva cepa bacteriana, se sembraron parches de 15 colonias en medios con los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol por cada evento de transformación. Solamente se observó crecimiento de las cepas DH5α en medio LB con kanamicina lo cual es acorde con el marcador de resistencia a kanamicina contenido en el plásmido. Respecto a los vectores, solamente hubo crecimiento de las cepas DB3.1 en medio LB con ampicilina y cloranfenicol lo cual es acorde al marcador de resistencia de ampicilina e inserto ccdB/Cm del vector, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización por marcador de resistencia de plásmidos y vectores utilizados mediante crecimiento de las cepas transformadas

DH5a/Plásmido	<i>Crecimiento en antibiótico</i>		
	Kanamicina	Ampicilina	Cloranfenicol
4-5pEnter	Positivo	Negativo	Negativo
4-2pEnter	Positivo	Negativo	Negativo
ArapEnter	Positivo	Negativo	Negativo
DB3.1/Vector	<i>Crecimiento en antibiótico</i>		
	Kanamicina	Ampicilina	Cloranfenicol
pFLIPi37	Negativo	Positivo	Positivo
pFLIPi38	Negativo	Positivo	Positivo
pFLIPi39	Negativo	Positivo	Positivo
pFLIPi42	Negativo	Positivo	Positivo
pFLIPi43	Negativo	Positivo	Positivo

Verificación de plásmido AtLEA4-5-pEnter por PCR

Mediante PCR se verificó la inserción del marco abierto de lectura para AtLEA4-5 en el vector pEnter. Como control positivo se utilizó el plásmido LEA4-5-pTrc99A que presenta el mismo inserto. Se identificó un fragmento de 500 pb que corresponde al inserto del ORF para AtLEA4-5 (Fig. 10).

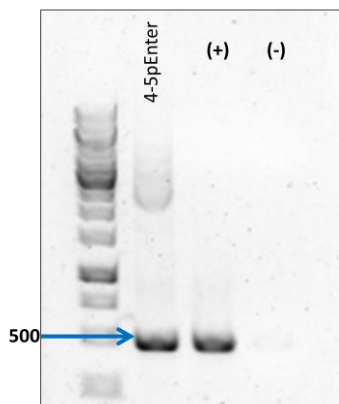


Figura 10. PCR del Inserto AtLEA4-5 en pEnter: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). AtLEA4-5pEnter corresponde con el tamaño esperado para el ORF de 500 pb

Digestión enzimática del DNA plasmídico

Con el propósito de corroborar la identidad a los vectores pFLIPi se realizaron dobles digestiones con las enzimas *EcoRV* (lote: 00076621) (Fermentas) y *Pst1* (lote: 39; New England Biolabs) en buffer R 10X con BSA (lote: 00134167; Thermoscientific) en un volumen total de reacción de 20 μ l. La reacción enzimática se incubó durante 12 h a 37°C para digerir una cantidad total de 1 μ g DNA (Tabla 11).

Tabla 11. Reacción de restricción para la doble digestión de los vectores pFLIPi.

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer R (10X)	2
<i>EcoRV</i> (10 U/ μ l)	0.5
<i>Pst1</i> (20 U/ μ l)	0.5
DNA (500 ng/ μ l)	2
Agua mili-Q	15

Como producto de la doble digestión con *EcoRV* y *Pst1* se obtuvieron 3 bandas del tamaño esperado 4397 pb, 1634 pb y 135 pb, ejemplificando a pFLIPi37 (Fig. 11). Cabe mencionar que aunque la tercera banda no se alcanza a percibir en la figura; sin embargo, aumentando la resolución usando el software ImageQuant-300 se logró distinguir claramente. Nótese que el plásmido sin digerir migra más allá de la banda que corresponde a su tamaño aproximado de 6000 pb debido a su condición de superenrollamiento. Con estos resultados se pudo identificar a los vectores pFLIPi por tamaño de fragmentos ya que todos presentaron bandas similares que migraron por igual a lo largo del gel de agarosa.

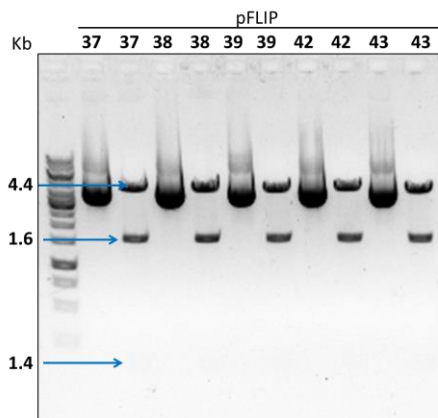


Figura 11. Doble digestión con enzimas de restricción de los vectores pFLIPi 37 – 43. Cada duplicado de pFLIPi representa la condición sin digerir y sometido a doble digestión, respectivamente.

En el caso de las construcciones recombinantes la restricción se realizó con la misma enzima *EcoRV* (lote: 00076621) (Fermentas). Se utilizó el mismo volumen de reacción y se incubó a 37°C durante 12 h (Tabla 12).

Tabla 12. Digestión de las construcciones recombinantes.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer R 10X	2
<i>EcoRV</i> (10 U/µl)	0.4
DNA (250 ng)	Ajustado a cada construcción
Agua mili-Q	Ajustado a cada construcción

Electroforesis en gel de agarosa

Para la realización de este tipo de experimentos se utilizó agarosa ultrapura (Invitrogen, lote: D121208). El gel de agarosa se preparó al 1% (1 g agarosa/100 ml Buffer TAE + 5 µl bromuro de etidio (10 mg/ml)). Como marcador se usó *Generuler* 1 kb (lote: 00093172, Fermentas). Los gels de agarosa se utilizaron para el análisis de los productos de reacciones enzimáticas con enzimas de restricción, o bien para la identificación de los productos obtenidos por medio de reacciones de polimerasa en cadena (PCR). Para llevar a cabo la electroforesis se usaron cámaras de electroforesis comerciales (BIORAD). Las condiciones de corrida fueron a 120 V por 20 min a temperatura ambiente. El DNA

teñido con bromuro de etidio en los geles se visualizó con el equipo y software de ImageQuant-300 (LG Technologies).

Reacciones de recombinación *in vitro* utilizando la LR Clonasa

Se adquirió el paquete de Gateway LR Clonasa II Enzyme Mix para efectuar las reacciones de recombinación entre los plásmidos pEnter con cada uno de los vectores pFLIPi. Se siguió la relación sugerida por el manual de *Invitrogen* solamente para calcular las cantidades teóricas apropiadas del DNA de plásmido y del vector en la reacción. La recomendación de ajustar la cantidad de moles a 10 fmol para el plásmido de entrada y a 20 fmoles el vector destino o pFLIPi fue con el propósito de mantener la proporción molar 2:1.

$$ng = (xfmol) * (N) * \frac{660 fg}{fmol} * \frac{1 ng}{E^6 fg}$$

Ec. 9 Cantidad de DNA en nanogramos para cada vector

Donde:

N = Tamaño en pares de bases (pb) del plásmido

Las cantidades teóricas apropiadas de DNA para las reacciones de recombinación fueron calculadas mediante la Ec. 9:

$$ng = (xfmol) * (N) * \frac{660 fg}{fmol} * \frac{1 ng}{E^6 fg}$$

$$pEnter (ng) = (10 fmol) * (4500) * \frac{660 fg}{fmol} * \frac{1 ng}{E^6 fg} = 29.7 ng$$

$$pFLIPi(ng) = (20 fmol) * (6000) * \frac{660 fg}{fmol} * \frac{1 ng}{E^6 fg} = 79.2 ng$$

Sin embargo, se siguió el protocolo de recombinación utilizado por Alexander M. Jones y se calculó la relación molar real mediante la misma ecuación. Para ésto se preparó un volumen total de 5 µl de reacción. Se utilizó 1 µl de la enzima LR clonasa y los plásmidos y vectores se diluyeron a una concentración de 25 ng/µl usando 2 µl y 1 µl, respectivamente. Finalmente, se aforó con agua mili-Q a 5 µl el volumen restante.

Las cantidades molares reales en la reacción de recombinación tomando en cuenta los nanogramos usados fueron también calculadas mediante la ecuación 9.

$$pEnter (x fmol) = \frac{50 \text{ ng}}{(4500) * \frac{660 \text{ fg}}{fmol} * \frac{1 \text{ ng}}{E^6 \text{ fg}}} = 16.84$$

$$pFLIPi(x fmol) = \frac{25 \text{ ng}}{(6000) * \frac{660 \text{ fg}}{fmol} * \frac{1 \text{ ng}}{E^6 \text{ fg}}} = 6.31$$

Por lo que la relación molar fue 2.6 = pEnter/pFLIPi

Tabla 13. Condiciones en la reacción de recombinación

Reacción de recombinación con LR Clonasa	
Reactivo	Volumen (μl)
pEnter (25ng/ul)	2
pFLIPi (25 ng/ul)	1
LR Clonasa II (Enzyme mix 5X)	1
Agua mili-Q	1

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar el análisis por PCR se utilizaron los oligonucleótidos sentido “TRC4-5F” y antisentido “TRC4-5R” de AtLEA4-5 para corroborar el inserto del gen AtLEA4-5 en pEnter. Posteriormente, se diseñaron y se mandaron a sintetizar a la UNIDAD DE SECUENCIA (IBt-UNAM) los oligonucleótidos par pFLIPi sentido “FLI-1F” y antisentido “FLI-1R” para corroborar el inserto del ORF para AtLEA4-5, AtLEA4-2, AraF en las construcciones recombinantes (Tabla 14).

Tabla 14. Propiedades de los oligonucleótidos para analizar los derivados de pFLIPi

Oligonucleótidos pFLIPi	TM (°C)	Tamaño (nt)	Concentración (pmol/μl)	Secuencia (5'---3')
FLI1-F	69.2	27	106	GCTGTACAAGGGTACCGATATCACAAG
FLI1-R	68	24	115	GCTCACACTAGTCGATATCACCAC

El volumen para cada reacción fue de 20 μ l. Como controles positivos se utilizaron el plásmido LEA4-5/pTrc99A y los vectores pFLIPi. Para cada uno de las PCR se utilizó como control negativo una mezcla de reacción sin DNA templado. Las condiciones de cada reacción se encuentran descritas en la sección de *Anexos A y B*.

Estandarización de las condiciones de estrés

Con el objetivo de comparar cada tipo de tratamiento se utilizó el osmómetro WESKOR VAPRO modelo 5600 para medir el potencial osmótico entre las soluciones de polietilenglicol (PEG 5,000), glicerol, cloruro de potasio y D-manitol a partir de distintas concentraciones (Fig. 12 a Fig. 15). La unidad que despliega en pantalla el osmómetro para cuantificar la osmolaridad de una solución es milimoles por cada kilogramo, posteriormente se hizo la conversión en bares. El intervalo de concentraciones usadas para cada tipo de tratamiento fue de 100-1400 mM aumentando por intervalos de 100 mM. Se hizo un ajuste lineal donde cada punto representa el promedio de tres mediciones.

Tabla 15 Potenciales osmóticos de la solución PEG

% PEG	mmol/kg (tres repeticiones)			mmol/kg (promedio)	bares
10%	75	80	83	79.3333333	-1.93
20%	274	276	284	278	-6.78
30%	689	720	725	711.3333333	-17.34
40%	1447	1430	1591	1489.33333	-36.32

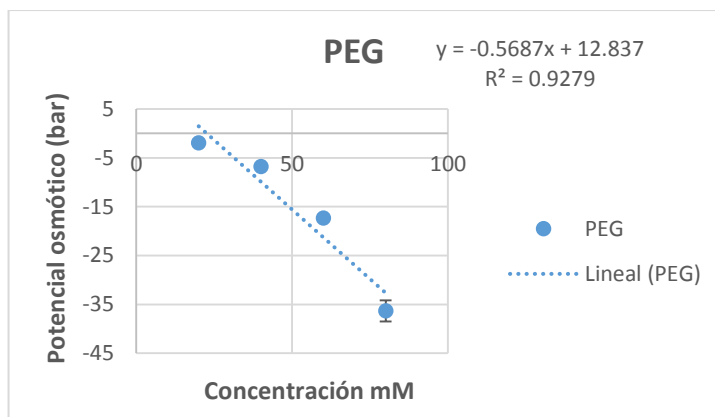


Figura 12. Potencial osmótico de PEG: Ajuste lineal de potencial osmótico en distintas concentraciones de PEG.

Tabla 16. Potenciales osmóticos de la solución glicerol

mM	mmol/kg (tres repeticiones)			mmol/kg (promedio)	bar
100	89	80	72	80.33	-1.95
200	163	283	157	201	-4.90
300	300	218	215	244.33	-5.95
400	328	317	295	313.33	-7.64
500	441	430	428	433	-10.56
600	638	515	511	554.66	-13.52
700	678	585	659	640.66	-15.62
800	703	673	678	684.66	-16.69
900	794	749	744	762.33	-18.59
1000	873	862	846	860.33	-20.98
1100	950	1069	985	1001.33	-24.42
1200	1060	1064	1075	1066.33	-26.00
1300	1240	1146	1144	1176.66	-28.69
1400	1298	1228	1236	1254	-30.58

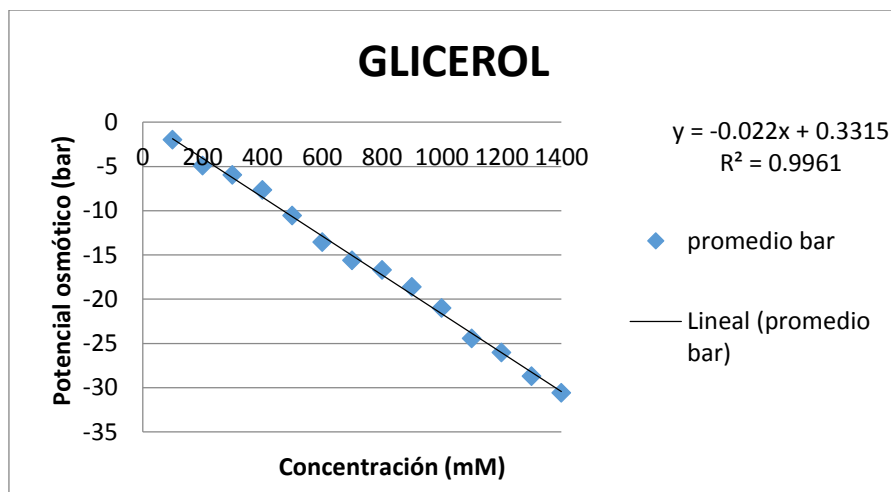


Figura 13. Potencial osmótico de glicerol: Ajuste lineal de potencial osmótico en distintas concentraciones de glicerol.

Tabla 17. Potenciales osmóticos de la solución cloruro de potasio (KCl)

mM	mmol/kg (tres repeticiones)			mmol/kg (promedio)	bar
100	238	240	239	239	-5.82
200	531	456	446	477.66	-11.65
300	685	708	710	701	-17.09
400	1049	1039	1038	1042	-25.41
500	1242	1251	1244	1245.66	-30.38
600	1452	1442	1442	1445.33	-35.25
700	1737	1724	1748	1736.33	-42.34
800	2240	2180	2140	2186.66	-53.33
900	2360	2280	2580	2406.66	-58.69
1000	2520	2440	2570	2510	-61.21
1100	2690	2710	2510	2636.66	-64.30
1200	2860	2850	2970	2893.33	-70.56
1300	3310	3150	2940	3133.33	-76.42
1400	2950	2800	4280	3343.33	-81.54

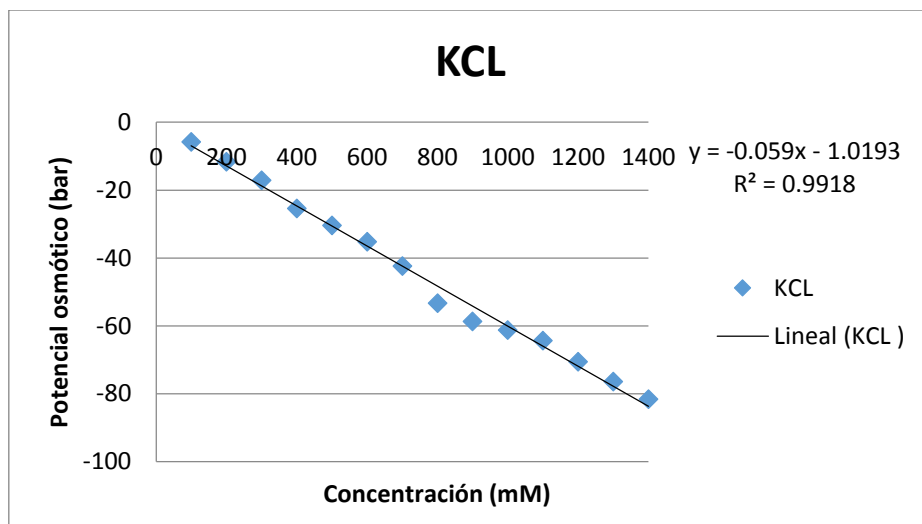


Figura 14. Potencial osmótico de KCl: Ajuste lineal de potencial osmótico en distintas concentraciones de KCl.

Tabla 18. Potenciales osmóticos de la solución de D-manitol

milimolar	mmol/kg			mmol/kg	bar
100	138	132	131	133.66	-3.26
200	217	218	214	216.33	-5.27
300	301	301	306	302.66	-7.38
400	400	402	407	403	-9.82
500	501	501	512	504.66	-12.30
600	611	619	608	612.66	-14.94
700	706	699	704	703	-17.14
800	812	805	818	811.66	-19.79
900	951	951	946	949.33	-23.15
1000	1141	1144	1163	1149.33	-28.03

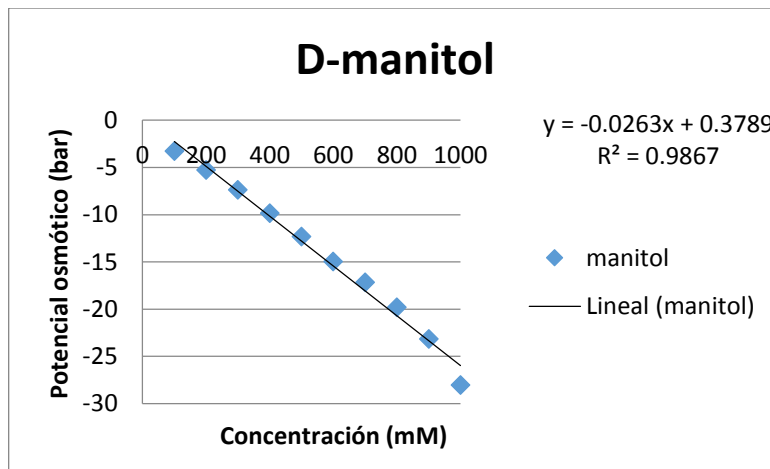


Figura 15. Potencial osmótico de D-manitol: Ajuste lineal de potencial osmótico en distintas concentraciones de D-manitol.

Caracterización de las construcciones recombinantes

Posterior a la reacción de recombinación LR clonasa, se transformó la cepa DH5 α con el volumen total de reacción de 5 μ l. Como siguiente paso, se sembraron colonias en parches para los análisis por PCR y, en paralelo, se realizó el ensayo por duplicado de la caracterización en antibióticos Amp^R y Cm^R por cada construcción recombinante. Una vez corroborado el análisis por PCR (*Anexo C*) y el crecimiento de las cepas con su respectiva construcción, se purificó ADN plasmídico de las tres primeras colonias que resultaron positivas para realizar las reacciones de restricción enzimática con *EcoRV* (*Anexo D*), así como para el análisis de secuencia. Como último paso, se transformaron las cepas ROSETTA BL21 con el plásmido que resultó positivo en secuencia con los ORF, de igual forma se sembraron colonias en parche para corroborar el inserto mediante PCR (*Anexo F*).

Producción de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38 en la cepa Rosetta BL21 mediante inducción por IPTG

La expresión de proteína se realizó en la cepa BL21 Rosetta usando cultivos de 100 ml creciendo en agitación a 250 rpm, a una temperatura constante de 25 °C para evitar la degradación de proteína y en ausencia de luz con motivo de no dañar a los pares de fluoróforos. Para determinar la mejor condición de expresión de proteína, se realizó una

cinética de inducción con IPTG. Se tomó como referencia a la proteína AtLEA4-2pFLIPi38 en la cepa Rosetta BL21 y se fijaron dos concentraciones de IPTG a 0.5 mM y 1 mM. Se inocularon siete tubos para obtener una densidad óptica inicial de 0.05 a partir de un cultivo de BL21 Rosetta crecido durante 12 h a 37 °C. Como paso siguiente, se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.5, punto en el cual se añadió el IPTG: dos tubos con IPTG 0.5 mM, otros dos tubos con IPTG 1 mM, dos tubos sin IPTG y 1 tubo testigo; éstos se incubaron a 25 °C por 16 h y 24 h para cada condición de IPTG. Finalmente, se tomó 1 ml de cada condición y tiempo como muestra para separar las proteínas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Fig. 23) y, con ello, validar la inducción mediante una medición de la intensidad de fluorescencia del par fluoróforo donador (Fig. 23). Posteriormente, se escaló el proceso de inducción con IPTG para AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38 a cultivos de 1 lt.

Obtención de extracto y purificación de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y ArafpFLIPi38

Apartir de cultivos de 100 ml, se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 min con el fin de eliminar el medio de cultivo. Para realizar el lavado del precipitado de las células se resuspendió de forma homogénea en 4 ml de solución 20 mM Tris-HCl pH 7.5 y se centrifugó a máxima velocidad. El paso de lavado se repitió nuevamente. Posteriormente, se resuspendió el precipitado de células en 4 ml de solución de lisis (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1% TRITON X-100, lisozima 2 µl/ml y DNasa 2 µl/ml) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se centrifugó a 20, 000 rpm durante 30 min a 4 °C y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente, se escaló el proceso de extracción a cultivos de 1 lt .

La purificación de proteína se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en columnas BIO-RAD con resina de Níquel PURE CUBE Ni-NTA aprovechando la etiqueta de histidina fusionada a las proteínas de interés. Para la purificación de proteína a partir de 4 ml de extracto, se cargó la columna con 1 ml de resina de níquel, se equilibró con 3 X 10 ml de agua y 3 X 10 ml de solución de lisis. Con la finalidad de evitar la unión de proteínas contaminantes a la resina de níquel se añadió imidazol 25 mM al extracto. Con el propósito de afinar la purificación de la proteína, se llevó a cabo la

elución con un gradiente de imidazol desde 50 mM hasta 200 mM con intervalos de 25 mM (*Anexo G*). Finalmente, de acuerdo a los resultados del gradiente, se concluyó purificar las proteínas con un lavado con 50 mM de imidazol (W1), eluyendo con 125 mM (E1-E3) y 150 mM imidazol (E4-E6) (Figs. 28 - 29). Posteriormente, se escaló el proceso de purificación para AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y ArafpFLIPi38 usando 40 ml de extracto apartir de cultivos de 1 lt.

La integridad de las proteínas y su porcentaje de pureza se verificó separando las muestras por electroforesis desnaturalizante (PAGE-SDS) y despuyés de teñir con Coomassie se utilizó el software de Li Image Studio Lite para realizar un análisis por densitometría de las bandas del gel (Fig. 30). Para esto, se cargó 1 ug de cada una de las proteínas purificadas en un gel SDS-PAGE y el programa asignó valores de señal a cada banda del gel. Para determinar el porcentaje de pureza de las proteínas de interés se obtuvo la sumatoria de las señales de las bandas y el cociente producto de la cuantificación de la señal de la banda de la proteína de interés entre la sumatoria de las señales multiplicado por 100 resultó en el grado de pureza correspondiente. El proceso de purificación del control donador cerulean y del aceptor citrina se llevó a cabo de la misma forma, usando un lavado de 50 mM imidazol y fracciones de elución a 125 mM imidazol (*Anexo G*)

Ensayos de FRET *in vitro* con extracto de proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con sus respectivos pares pFLIPi

Las mediciones se realizaron con el espectrofluorómetro FS5 de Edinburgh Biosystems usando como parámetros la longitud de onda de excitación del par fluoróforo donador a 427 nm, la longitud de onda de emisión del par fluoróforo donador a 485 nm y la longitud de onda de emisión del par aceptor a 530 nm. También se seleccionó un intervalo de barrido de emisión entre 470 a 550 nm. Las mediciones se realizaron en una placa de 96 pozos con fondo negro (Greiner Microton).

Se realizaron los ensayos de FRET utilizando clarificado de células conteniendo las proteínas recombinantes AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con todos sus respectivos pares de fluoróforos. El experimento se realizó en condición control (sin tratamiento) y ante la presencia del inductor artificial de estructura secundaria tipo alfa-hélice, denominado

2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Las mediciones se hicieron por triplicado con un volumen por pozo de 200 μ l, sin embargo se preparó un volumen total de 700 μ l con el propósito de reducir el error de pipeteo.

Tabla 12. Ensayo de FRET utilizando extracto de proteína AtLEA4-2 y AtLEA4-5

A)			B)	
	0% TFE	10% TFE	Condición	Cociente
AtLEApFLIPi (μ l)	140	140	0% TFE	A= DxAm/DxDm
TFE (μ l)	-	70	10% TFE	B=DxAm/DxDm
Agua (μ l)	560	490	Δ FRET =	B/A
VolumenTotal	700	700		

Tabla 12. (A) Composición de las soluciones utilizadas. (B) Determinación del cociente FRET: DxAm: Emisión de fluorescencia del aceptor al excitar donador. DxDm: Emisión de fluorescencia del donador al excitar donador. B/A= Relación de los cocientes de las fluorescencias entre ambos tratamientos.

Se obtuvo el promedio de las tres réplicas para ambas condiciones (ver Tabla 12), el cual representa el cociente entre la emisión del aceptor y la emisión del donador al excitar el par fluoróforo donador, DxAm y DxDm, respectivamente. Para poder determinar si hubo un cambio en la señal de FRET causado por el estrés se obtuvo la relación entre ambos cocientes: con tratamiento y sin tratamiento. Como control del sistema FRET se usó a la proteína AraF fusionada a cada par pFLIPi., (AraFpFLIPi). Esta proteína funciona como un transportador de arabinosa en *E. coli* y ha sido utilizado en este tipo de experimentos (Kaper et al., 2008)

Ensayos de FRET *in vitro* con proteína pura AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38

Los ensayos de FRET con proteína pura se realizaron a partir de la muestra de proteína mostrada en la Fig. 30. La concentración se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar de la proteína de fusión en el espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000) con el propósito de fijar una misma concentración de proteína en cada experimento. La concentración utilizada para cada proteína fue de 1 μ M. Cada ensayo se realizó por triplicado llevando a un volumen final de 700 μ L y con un volumen por pozo de 200 μ l para reducir el error por pipeteo. Se estandarizó el sistema de FRET probando distintas concentraciones de tratamientos con PEG, manitol, KCl, TFE y glicerol (Figs. 16 - 20).

En el ensayo con PEG se fijó a un volumen de 250 μ l y, de igual manera, se realizó cada medición por triplicado en un volumen por pozo de 200 μ l con el propósito de reducir el error de pipeteo y además asegurar la distribución correcta de proteína por pozo, ésto debido a la alta viscosidad de esta solución. También se generaron los debidos controles para cada proteína, en los cuales se excitó solamente el fluoróforo donador y aceptor, y se midió su intensidad de fluorescencia ante cada tratamiento aplicado al sistema FRET. También se consideró la inclusión de un control en donde se utilizaron concentraciones más altas de proteína con la finalidad de descartar la posibilidad de que hubiera interferencia por la detección de FRET intermolecular. Además, se repitió el control ArafpFLIPi38 ahora con proteína pura.

AtLEA4-2pFLIPi38									
%TFE	0%	2%	4%	6%	8%	10%	20%	30%	40%
AGUA (ul)	684	670	656	642	628	614	544	474	404
Proteína (ul)	16	16	16	16	16	16	16	16	16
TFE (ul)	-	14	28	42	56	70	140	210	280
AtLEA4-5pFLIPi38									
%TFE	0%	2%	4%	6%	8%	10%	20%	30%	40%
AGUA (ul)	662	648	634	620	606	592	522	452	382
Proteína (ul)	38	38	38	38	38	38	38	38	38
TFE (ul)	-	14	28	42	56	70	140	210	280
ArafpFLIPi38									
%TFE	0%	2%	4%	6%	8%	10%	20%	30%	40%
AGUA (ul)	657	643	629	615	601	587	517	447	377
Proteína (ul)	43	43	43	43	43	43	43	43	43
TFE (ul)	-	14	28	42	56	70	140	210	280

Figura 16. Condiciones del ensayo de FRET con TFE.

AtLEA4-2pFLIPi38								
% Glicerol	0%	5%	10%	15%	20%	40%	60%	80%
AGUA (ul)	684	649	614	579	544	404	264	124
Proteína (ul)	16	16	16	16	16	16	16	16
Glicerol (ul)	-	35	70	105	140	280	420	560
AtLEA4-5pFLIPi38								
% Glicerol	0%	5%	10%	15%	20%	40%	60%	80%
AGUA (ul)	662	627	592	557	522	382	242	102
Proteína (ul)	38	38	38	38	38	38	38	38
Glicerol (ul)	-	35	70	105	140	280	420	560
ArafpFLIPi38								
% Glicerol	0%	5%	10%	15%	20%	40%	60%	80%
AGUA (ul)	657	622	587	552	517	377	237	97
Proteína (ul)	43	43	43	43	43	43	43	43
Glicerol (ul)	-	35	70	105	140	280	420	560

Figura 17. Condiciones del ensayo de FRET con glicerol.

AtLEA4-2pFLIPi38								
mM Manitol	0	100	200	300	400	500	600	700
AGUA (ul)	684	614	544	474	404	334	264	194
Proteína (ul)	16	16	16	16	16	16	16	16
Manitol (ul)	-	70	140	210	280	350	420	490
AtLEA4-5pFLIPi38								
mM Manitol	0	100	200	300	400	500	600	700
AGUA (ul)	662	592	522	452	382	312	242	172
Proteína (ul)	38	38	38	38	38	38	38	38
Manitol (ul)	-	70	140	210	280	350	420	490
ArafpFLIPi38								
mM Manitol	0	100	200	300	400	500	600	700
AGUA (ul)	657	587	517	447	377	307	237	167
Proteína (ul)	43	43	43	43	43	43	43	43
Manitol (ul)	-	70	140	210	280	350	420	490

Figura 18. Condiciones del ensayo de FRET con manitol.

AtLEA4-2pFLIPi38							
mM KCl	0	10	20	40	60	80	100
AGUA (ul)	684	677	670	656	642	628	614
Proteína (ul)	16	16	16	16	16	16	16
KCl (ul)	-	7	14	28	42	56	70
AtLEA4-5pFLIPi38							
mM KCl	0	10	20	40	60	80	100
AGUA (ul)	662	655	648	634	620	606	592
Proteína (ul)	38	38	38	38	38	38	38
KCl (ul)	-	7	14	28	42	56	70
ArafpFLIPi38							
mM KCl	0	10	20	40	60	80	100
AGUA (ul)	657	650	643	629	615	601	587
Proteína (ul)	43	43	43	43	43	43	43
KCl (ul)	-	7	14	28	42	56	70

Figura 19. Condiciones del ensayo de FRET con cloruro de potasio.

AtLEA4-2pFLIPi38						
X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3
% PEG	0	10	20	30	40	47
AGUA (ul)	244	194	144	94	44	9
Proteína (ul)	6	6	6	6	6	6
PEG (ul)	-	50	100	150	200	235
AtLEA4-5pFLIPi38						
X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3
% PEG	0	10	20	30	40	47
AGUA (ul)	236	186	136	86	36	1
Proteína (ul)	14	14	14	14	14	14
PEG (ul)	-	50	100	150	200	235
ArafpFLIPi38						
X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3
% PEG	0	10	20	30	40	47
AGUA (ul)	235	185	135	85	35	0
Proteína (ul)	15	15	15	15	15	15
PEG (ul)	-	50	100	150	200	235

Figura 20. Condiciones del ensayo de FRET con PEG 5,000.

CAPITULO 4: RESULTADOS y DISCUSIÓN

Caracterización de las construcciones recombinantes

Con la finalidad de establecer un sistema para determinar los cambios conformacionales en las proteínas LEA del grupo 4, se decidió utilizar el formato de los vectores pFLIP, en los cuales se fusiona cada uno de los extremos de la proteína en cuestión a una proteína fluorescente cuyos rangos de longitud de onda de excitación y emisión sean aceptables para un análisis por FRET, generando así una proteína quimérica que podría ser capaz de detectar estos cambios conformacionales al tener una cierta probabilidad de que el par de proteínas fluorescentes se acerque o aleje como reacción a los posibles cambios conformacionales que pudiesen ocurrir ante una condición ambiental determinada. Los pares de proteínas fluorescentes en cada uno de los vectores pFLIP que se consideraron para este análisis han sido utilizados en otros proyectos en donde se ha tratado de determinar los cambios conformacionales de una proteína ante la unión de un ligando (Jones et al.,2014), de tal manera que es conocido que estos fluoróforos cumplen con las características necesarias para ser utilizados como detectores de FRET. Sin embargo, era necesario determinar si alguno de estos pares de fluoróforos resultaba un mejor indicador en las condiciones de nuestro interés. Para ello se insertaron las secuencias nucleotídicas de los ORFs para las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-2 y AraF en cinco diferentes vectores pFLIP, cada uno con una combinación diferente de pares de fluoróforos (Fig. 21). La razón de incluir a la secuencia ORF para la proteína AraF (proteína que se encarga de transportar arabinosa localizada en el periplasma bacteriano y que presenta una alta afinidad por este azúcar (Kaper et al.,2008), fue el contar con una proteína cuyos cambios conformacionales se hubiesen determinado confiablemente por FRET utilizando este sistema de fluoróforos, de tal manera que nos señalaría si el procedimiento de medición era el adecuado. El procedimiento que se siguió para la obtención de las construcciones de interés se describe a continuación.

Las colonias provenientes de las transformaciones de la cepa DH5 α con las reacciones de recombinación, seleccionadas en los antibióticos correspondientes, se sometieron a un análisis por PCR de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados de este análisis, usando los oligonucleótidos FLIP1-F y FLIP1-R, mostraron que todas las

colonias seleccionadas fueron positivas (Fig. 22 y Anexo C). Algunas de estas construcciones también fueron verificadas por análisis de restricción (Anexo D) y por la secuencia nucleotídica. Para la expresión y purificación de cada una de las proteínas de interés codificadas en los plásmidos ya corroborados, estas construcciones (Anexo E) se introdujeron en la cepa ROSETTA BL21.

La identidad de los plásmidos introducidos en ROSETTA BL21 se verificó por PCR. En todos los casos (las fusiones con los ORFs de la AtLEA4-2 y de la AtLEA4-5 (Anexo F) se demostró que las construcciones eran las correctas.

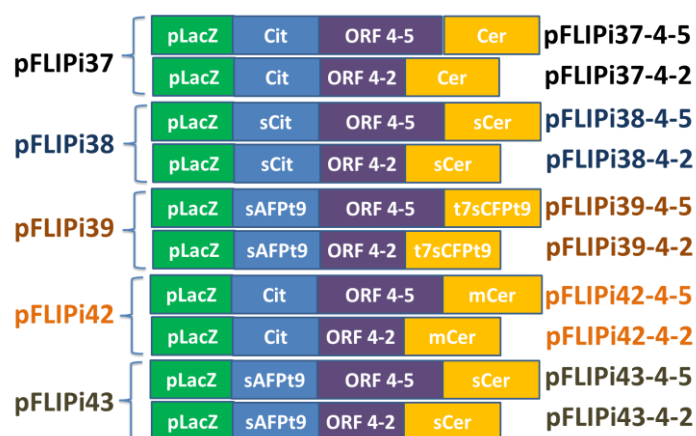


Figura 21. Esquema que muestra las construcciones obtenidas con los ORFs de las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 fusionadas a diferentes pares de fluoróforos.

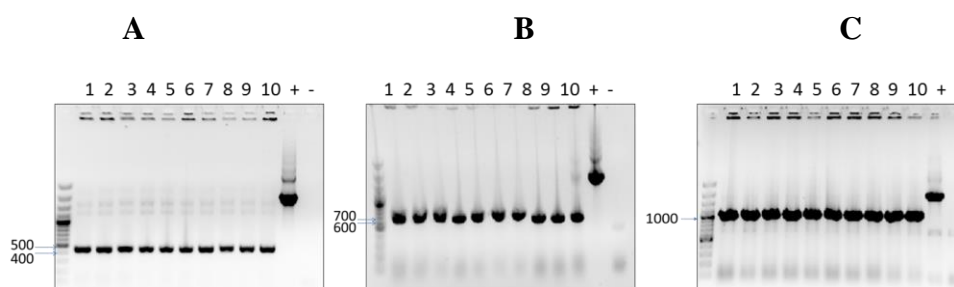


Figura 22. Análisis por electroforesis de los insertos correspondientes a las secuencias para AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en pFLiPi38: El control positivo aparece denotado con (+). El Control negativo aparece denotado con (-). Los números del 1 al 10 representan las diferentes colonias sembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias mostraron la presencia del fragmento del tamaño esperado para cada caso A: AtLEA4-2pFLiPi38 (423 pb), B: AtLEA4-5pFLiPi38 (606 pb) y C: AraFpFLiPi38 (1050 pb). El tamaño de cada fragmento aumenta 132 pb para cada ORF debido al posicionamiento de los oligos pFLiPi y al agregado de los sitios de recombinación attR y attL. Los ORF de AtLEA4-2 (291 pb), AtLEA4-5 (474 pb) y AraF (918 pb).

Producción de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38 en la cepa BL21 Rosetta mediante inducción por IPTG

La condición de inducción de las proteínas recombinantes fue indistinta entre 0.5 mM y 1 mM de IPTG, y entre 16 h y 24 h de inducción a 25 °C (Fig. 23A), por lo que la purificación de las proteínas se realizó induciendo con 0.5 mM de IPTG durante 16 h. Puesto que las proteínas quiméricas son fluorescentes estos datos se pudieron corroborar por ensayos de fluorescencia con los mismos resultados (Fig. 23B).

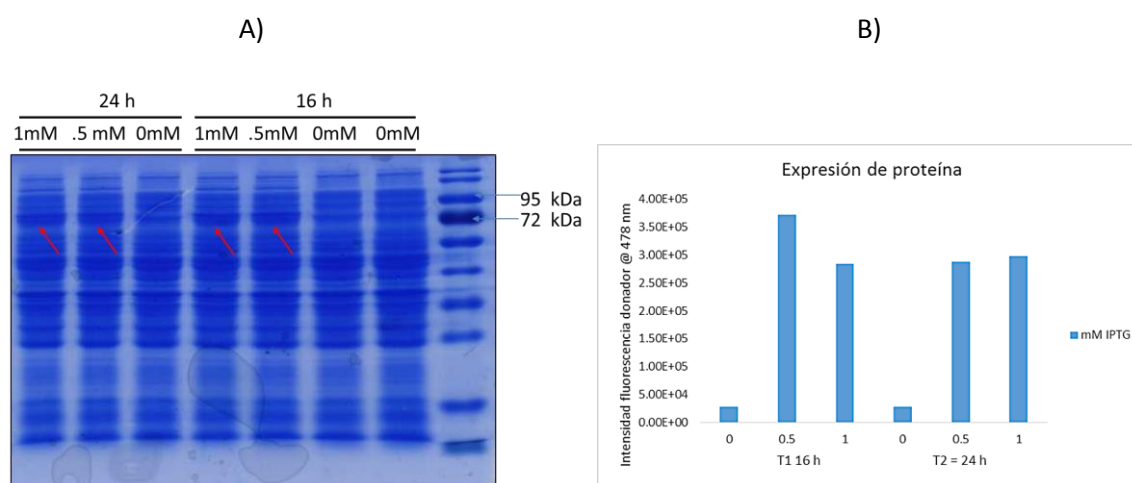


Figura 23. (A) Separación de los extractos bacterianos en gel de poli-acrilamida; (B) ensayo de fluorescencia utilizando extractos proteicos de células conteniendo AtLEA4-2pFLIPi38 (74 kDa).

Ensayos de FRET *in vitro* usando extractos proteicos de AtLEA4-2 y AtLEA4-5 con sus respectivos pares pFLIPi

Con el fin de seleccionar alguna(s) de las proteínas quiméricas fluorescentes para continuar con los análisis por FRET, se decidió realizar ensayos de FRET utilizando extractos proteicos totales obtenidos de bacterias en las cuales se indujo la producción de la proteína con IPTG. Adicionalmente, se realizaron estos ensayos en presencia o no de diferentes concentraciones de TFE, puesto que datos previos mostraron que este compuesto es capaz de inducir cambios conformacionales en las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2 (Cuevas-Velazquez et al., 2016).

Con la finalidad de mostrar de una forma más evidente los cambios en FRET, los resultados de estos experimentos se dan como el cociente de la diferencia entre los valores de fluorescencia de emisión del donador (DxDm) y del aceptor (DxAm) (DxAm/DxDm) entre las diferentes condiciones a comparar (ver Materiales y Métodos para detalles de este procedimiento) (Fig. 24 A y B).

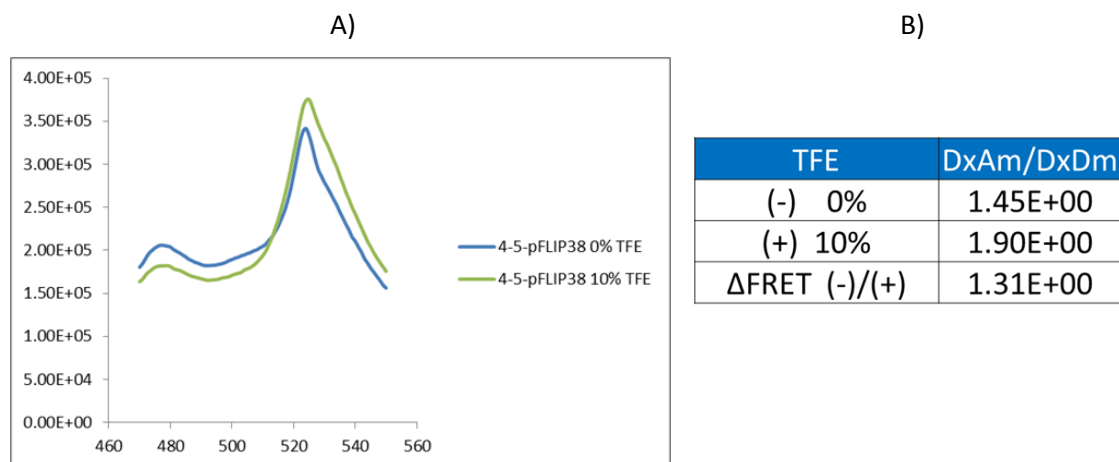


Figura 24. (A) Espectro de fluorescencia de la proteína quimérica codificada en AtLEA4-5pFLIPi38 a partir de extracto proteico. (B) Cambio en el cociente de FRET obtenido con la relación entre los valores de la fluorescencia de emisión del aceptor (DxAm) y de los valores de fluorescencia de emisión del donador, al excitar el fluoróforo donador (DxDm), entre las dos condiciones que se comparan (por ejemplo, 0% y 10% TFE).

Los diferentes tratamientos con TFE mostraron cambios en el cociente FRET para ambas proteínas, AtLEA4-2 y AtLEA4-5, con los distintos pares probados, excepto en el caso de AtLEA4-2pFLIPi39 (Fig. 25). Los resultados demostraron que la proteína quimérica obtenida a partir del vector pFLIPi38 obtuvo el mayor cociente en el cambio de la intensidad de FRET, al comparar sin o con 10% TFE, para ambas proteínas (Fig. 25). Con el fin de poder comparar los resultados entre las proteínas recombinantes fusionadas a diferentes pares de fluoróforos, se normalizó a 1 el valor obtenido para la condición control. Los resultados obtenidos indicaron que las proteínas quiméricas obtenidas a partir del pFLIPi38 serían la mejor opción para los ensayos posteriores, en las cuales las proteínas de interés se encuentran fusionadas a las proteínas fluorescentes citrina y cerúlean, en los extremos amino y carboxilo, respectivamente. Este resultado es consistente con la utilidad demostrada para el biosensor ABACUS1-2 reportado por Jones et al. (Jones et al., 2014), con el cual es posible detectar la fitohormona ABA, y que

consiste en una proteína recombinante obtenida a partir del vector pFLIPi38 y, por tanto, fusionada al mismo par de fluoróforos.

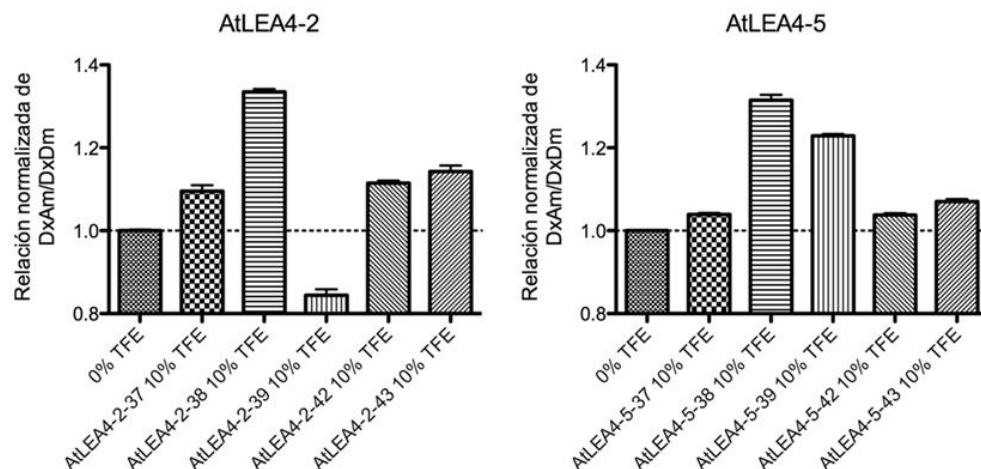


Figura 25. Cocientes de FRET normalizados a la condición de 0% TFE. Se utilizó extracto proteico conteniendo a la proteína recombinante AtLEA4-2 o AtLEA4-5, tratado con 10% TFE.

Aunque aquí sólo se muestran los resultados obtenidos con 10% TFE, los ensayos se realizaron con concentraciones mayores de TFE (20%, 30% y 40%); sin embargo, los resultados mostraron que concentraciones mayores al 10% provocaron que las intensidades de fluorescencia bajaran drásticamente, posiblemente debido al efecto de este compuesto sobre la conformación de los pares de fluoróforos, que podría causar una disminución en la eficiencia de transferencia de energía entre ellos.

Aún cuando los datos obtenidos por DC mostraron que el incremento en la concentración de TFE promueve un aumento en la formación de alfa-hélices en las proteínas AtLEA4-5 y AtLEA4-2, la mayor sensibilidad de la técnica de FRET permite detectar cambios significativos aún con concentraciones del 10% de TFE, las cuales por DC sólo se detectan cambios ligeros en la formación de alfa-hélices en ambas proteínas. También es posible que las altas concentraciones de TFE provoquen modificaciones conformacionales en las proteínas fluorescentes, como en este caso ocurre con las proteínas fluorescentes citrina y cerúlean.

Con el fin de determinar los niveles mínimos de TFE capaces de inducir cambios en los niveles de FRET se realizó un ensayo en el que se aplicaron concentraciones crecientes

de TFE con incrementos de 2%. Los resultados mostraron que incluso TFE 2% es capaz de inducir FRET y, por tanto, posiblemente cambios conformacionales en la proteína; en tanto que concentraciones mayores de 4% no mostraron diferencias significativas en el cambio de la intensidad de FRET (Fig. 26).

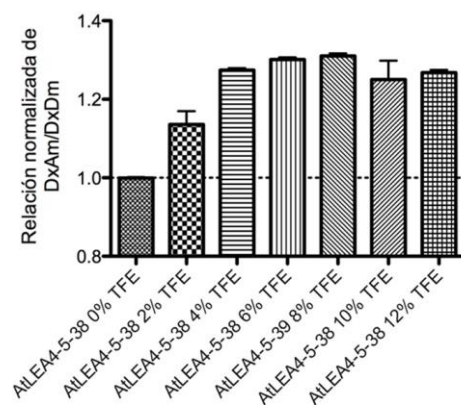


Figura 26. Cocientes de FRET normalizados obtenidos para extractos proteicos conteniendo a la proteína quimérica AtLEA4-5, tratados con diferentes concentraciones de TFE.

En el caso de la proteína recombinante AraF se demostró que ésta es capaz de responder a la presencia de arabinosa (10 μ M), como era de esperarse para esta proteína biosensora, de acuerdo a lo reportado por Kaper et al. (2008), obteniéndose en este caso la mayor intensidad de FRET para la proteína quimérica producida del vector pFLIPi42 (Fig. 2F). Estos resultados indican que los ensayos de FRET funcionan apropiadamente, con el equipo utilizado y bajo las condiciones probadas.

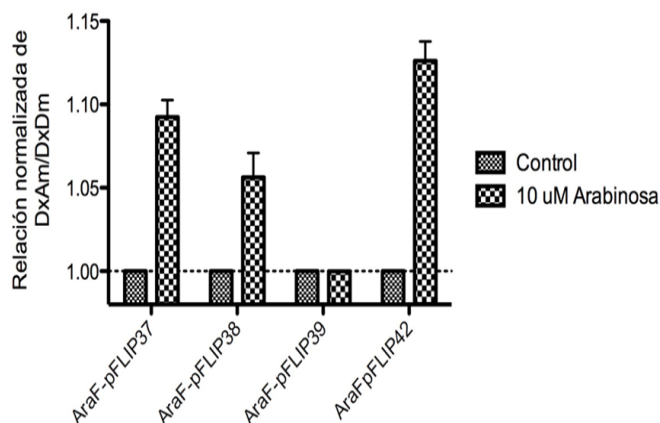


Figura 27. Cocientes de FRET normalizados para las proteínas AraF quiméricas obtenidas a partir de los diferentes vectores pFLIPi. Las mediciones se realizaron en extractos proteicos con o sin arabinosa 10 μ M.

Purificación de las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38

Con el objetivo de realizar experimentos en los que se probarán diferentes condiciones ambientales para determinar posibles cambios conformacionales por FRET, se purificaron las proteínas recombinantes de interés: AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38, a partir de extractos proteicos bacterianos previa inducción con IPTG, bajo las condiciones que se describen arriba. La purificación se realizó utilizando cromatografía de afinidad con resina asociada a níquel en donde por afinidad se unen las proteínas que contienen la etiqueta de histidinas (ver Materiales y métodos).

En la Figura 28 se muestran los geles teñidos con Coomassie blue en donde se separaron las proteínas antes, durante y después del procedimiento de purificación. La elución de las proteínas se llevó a cabo con diferentes concentraciones de imidazol para lograr una mejor separación de las impurezas que también presentaron afinidad al níquel. La elución se inició con 125 mM de imidazol (E1 – E3), para seguir con 150 mM (E4 – E6) (Figs. 28 y 29). Como es posible apreciar en ambas figuras, este procedimiento permitió un enriquecimiento significativo para las proteínas de interés tras la elución con una concentración de imidazol de 125 mM (Fig. 28 y Fig. 29). Para determinar el nivel de enriquecimiento de las proteínas purificadas, se realizó un análisis por densitometría de las bandas teñidas en el gel (Fig. 30 y Tabla 20).

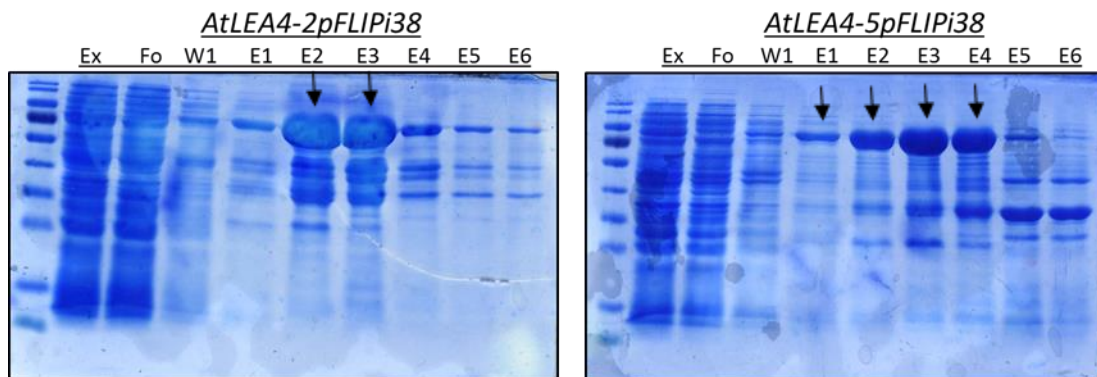


Figura 28. Gel de poliacrilamida-SDS (12%) teñido con Coomassie blue en donde se separaron las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a metales de las proteínas recombinantes *AtLEA4-2pFLIPi38* y *AtLEA4-5pFLIPi38*, correspondientes al flujo (Fo), lavado (W) y elución (E). Ex, extracto proteico total. La proteína recombinante *AtLEA4-2pFLIPi38* (74 kDa) se ve enriquecida en las fracciones de elución E2 y E3; en tanto que la proteína recombinante *AtLEA4-5pFLIPi38* (79 kDa) se enriquece en las fracciones E1 a E4. Las bandas correspondientes a estas proteínas se indican con una flecha

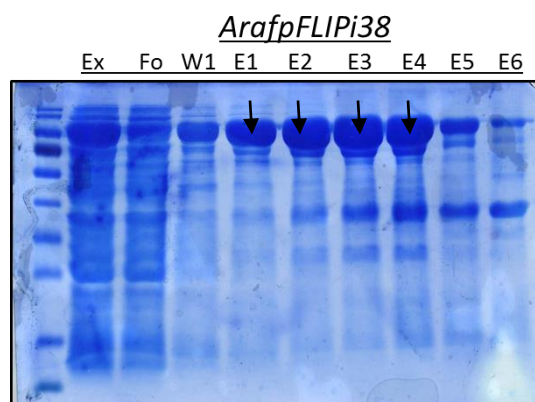


Figura 29. Gel de poliacrilamida-SDS (12%) teñido con Coomassie blue en donde se separaron las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad por metales de la proteína recombinante *AraFpFLIPi38* (99 kDa), correspondientes al flujo (Fo), lavado (W) y elución (E). Ex, extracto proteico total. La proteína recombinante de interés se ve enriquecida en las fracciones de elución E1 a E4. La banda correspondiente a *AraFpFLIPi38* se indica con una flecha.

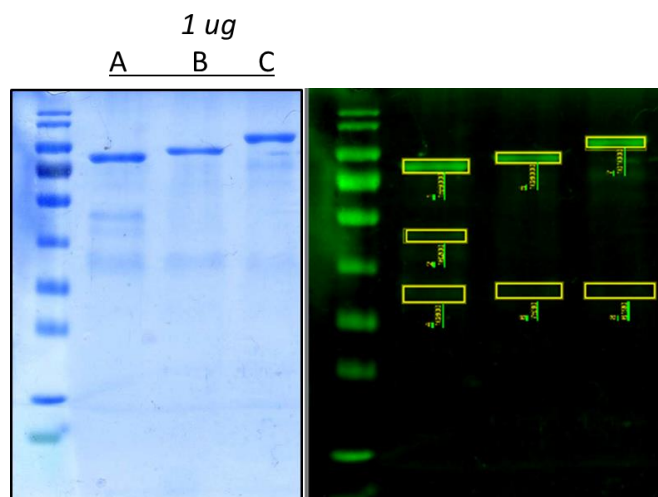


Figura 30. Gel de poliacrilamida-SDS (12%) teñido con coomassie blue en donde se separaron las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 (A); AtLEA4-5pFLIPi38 (B); AraFpFLIPi38 (C) purificadas (Panel izquierdo). Imagen obtenida durante el proceso de cuantificación, en donde se muestran en verde digital las bandas teñidas con coomassie blue, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de densitometría para su cuantificación.

Tabla 20. Resumen del proceso de purificación de las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y AraFpFLIPi38

Proteínas recombinantes	PM (kDa)	Concentración (mg/ml)	Volumen colectado (ml)	Pureza (%)	Cantidad total (mg)
AtLEA4-2pFLIPi38	74	3.25	4.0	85	13.0
AtLEA4-5pFLIPi38	79	1.47	8.0	93	11.8
AraFpFLIPi38	99	1.60	8.0	94	12.8

Ensayos de FRET *in vitro* utilizando las proteínas recombinantes purificadas AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38

Con la idea de abordar la pregunta de si ciertas condiciones ambientales prevalentes bajo deficiencia de agua causaban cambios conformacionales en las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 como se había demostrado utilizando espectrofotometría por dicroísmo circular, se realizaron mediciones de FRET con las proteínas recombinantes purificadas AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 en presencia de PEG para simular amontonamiento molecular, con manitol y glicerol para simular una condición hiperosmótica y KCl para simular incrementos en sales compatibles y osmoactivas. También se realizaron ensayos en presencia de TFE, dado que este compuesto es un fuerte inductor de alfa-hélices en proteínas.

Para eliminar la interferencia de señales provenientes de posibles interacciones interproteína se determinó la concentración de proteína en la que no se detectaran señales de FRET cuando la proteína se encontraba en solución sin las adiciones a probar. Los resultados obtenidos muestran que en un rango de concentración entre $0.5 \mu\text{M}$ y $1.5 \mu\text{M}$ de proteína no se detectaron cambios en el cociente de FRET que indicaran interacción intermolecular conforme ocurre el aumento en la concentración de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 (Fig. 31).

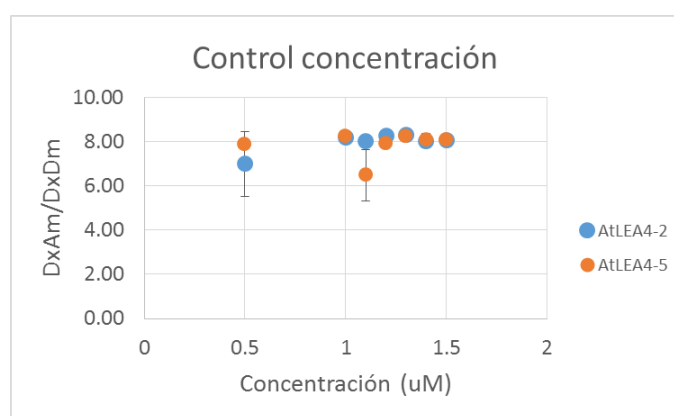


Figura 31. Cociente de FRET intramolecular detectado a diferentes concentraciones (μM) de las proteínas recombinantes AtLEA4-2 (círculos azules) y AtLEA4-5 (círculos anaranjados).

Otra interferencia que se podría presentar es que los diferentes tratamientos afectarían la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos, lo cual inevitablemente afectaría a su vez a los valores de FRET, generando así interpretaciones erróneas. Por ejemplo, si la fluorescencia del fluoróforo donador disminuyera por algún tratamiento esto llevaría a obtener un aumento artefactual en el cociente de FRET. Para ello se probó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la fluorescencia del fluoróforo donador (D), cerúleo. Los resultados obtenidos mostraron un efecto negativo sobre la fluorescencia de cerúleo a concentraciones de TFE mayores al 4% (Fig. 32 A).

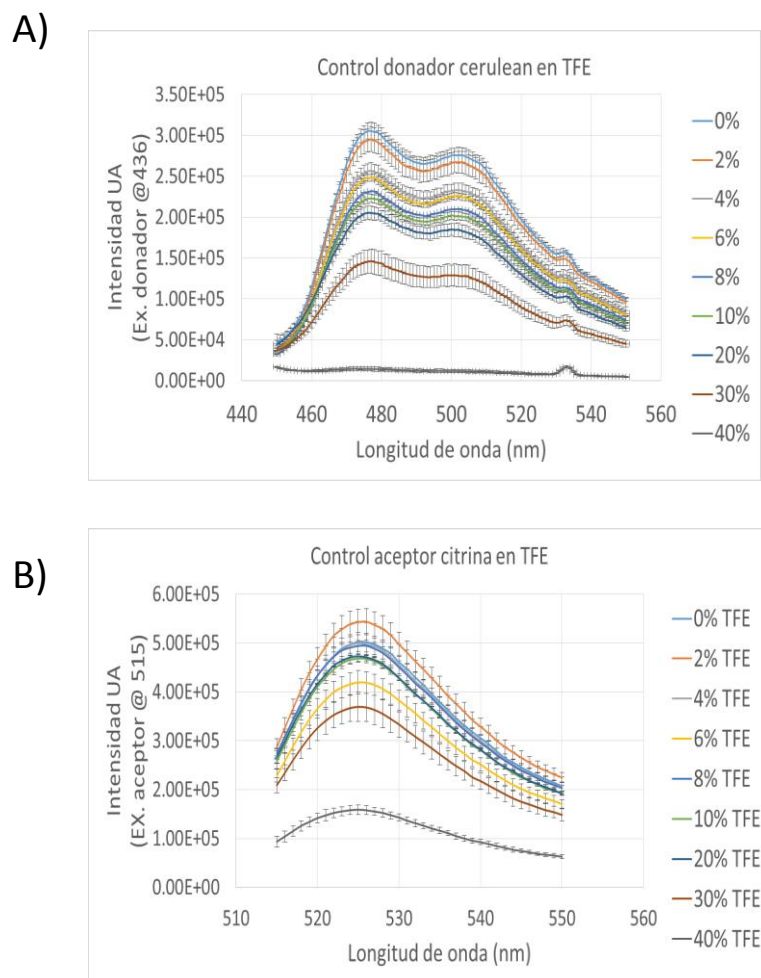


Figura 32. Efecto de los tratamientos con TFE sobre el fluoróforo donador cerulean (A) y sobre el fluoróforo aceptor citrina (B).

Un ensayo similar se realizó para detectar efectos sobre el fluoróforo aceptor (A), citrina. En estos ensayos se determinó el efecto tanto sobre la proteína fluorescente citrina purificada y como parte de la proteína recombinante. En ambos casos se detectó un efecto negativo en su fluorescencia conforme se aumentaron las concentraciones de TFE (Fig. 32B); sin embargo, esto no afectó la interpretación en cuanto a la generación de una señal de FRET entre ambos fluoróforos, ya que el tratamiento causó una disminución y no un aumento en su fluorescencia (Fig. 32 y Anexo L).

Cuando se realizaron las determinaciones de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38, se detectaron cambios en el cociente de FRET desde el 2% de TFE (Fig. 33). Estos resultados indican que aún en estas bajas

concentraciones de TFE ambas proteínas, AtLEA4-2 y AtLEA4-5, experimentan cambios conformacionales, interpretación que puede ser confiable dado que en estas concentraciones de TFE la fluorescencia del fluoróforo donador no se afecta. Aunque concentraciones mayores al 4% de TFE generan mayores valores para el cociente de FRET, éstos ya no son confiables pues a estas concentraciones de TFE se detectó una disminución en la fluorescencia del donador, reflejando efectos del TFE sobre la conformación misma de los fluoróforos reporteros. Estos resultados son consistentes con los obtenidos con los extractos proteicos.

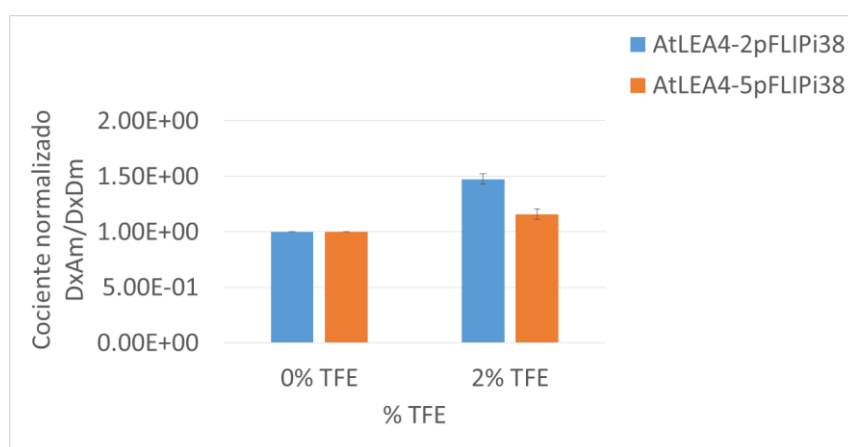


Figura 33. Cociente normalizado FRET AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 con TFE

Ensayos similares se realizaron con el resto de los tratamientos. En el caso de los tratamientos con PEG, éste sólo causó un efecto ligero, aunque no significativo, sobre la fluorescencia del fluoróforo donador en concentraciones entre 0% y 30%, en tanto que concentraciones mayores a esta última mostraron un efecto de mayor consideración (Fig. 34A)

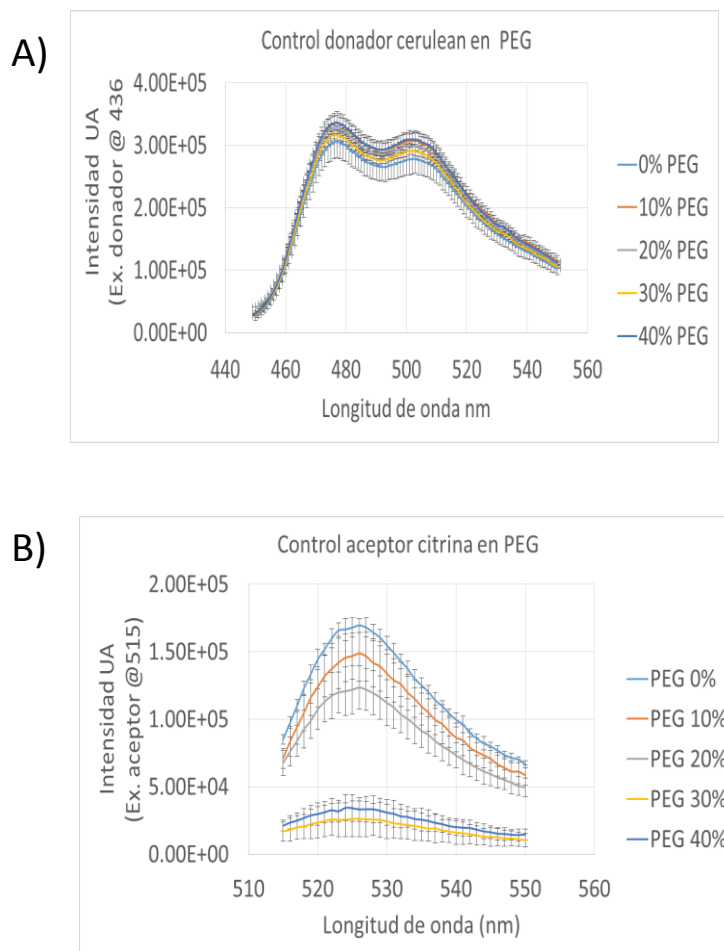


Figura 34. Efecto del incremento en la concentración de PEG sobre las proteínas fluorescentes donadora, cerulean (A), y aceptora, citrina (B).

En lo que respecta al efecto del PEG sobre el fluoróforo aceptor, se observó una disminución en su fluorescencia, aún en la concentración más baja utilizada (10%); ésto se detectó tanto con la citrina purificada (Fig. 34), como con la citrina en la proteína recombinante (Anexo L.13 a L.14). La determinación de FRET para la proteína AtLEA4-2 recombinante mostró un incremento lineal en el cociente de FRET ante un aumento en el porcentaje del PEG, lo cual no sucedió para AtLEA4-5 recombinante, para la cual se detectó un cambio hasta concentraciones mayores a 40% PEG (Fig. 35). Como en el caso de los tratamientos con TFE, el efecto negativo del PEG sobre el fluoróforo aceptor no elimina los cambios que se detectan en el FRET de las proteínas recombinantes, dado que provoca una disminución en la fluorescencia, de tal forma que el incremento en el cociente de FRET para las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 recombinantes se puede

considerar como indicativo de un cambio conformacional en estas proteínas causadas por el amontonamiento molecular y la disminución del agua disponible inducidos por los tratamientos con PEG.

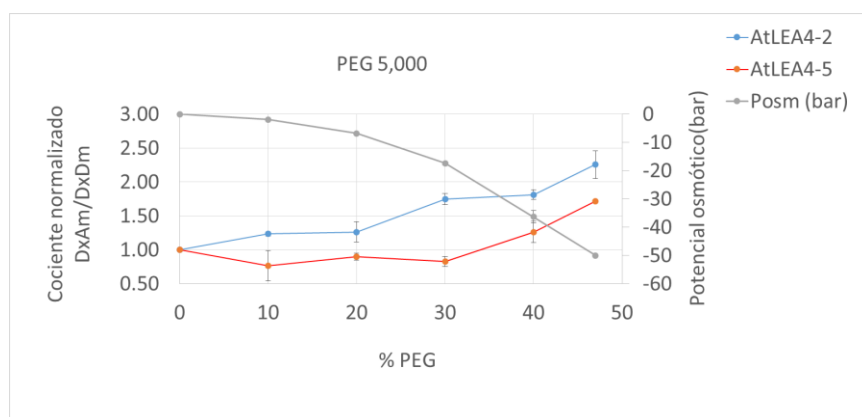
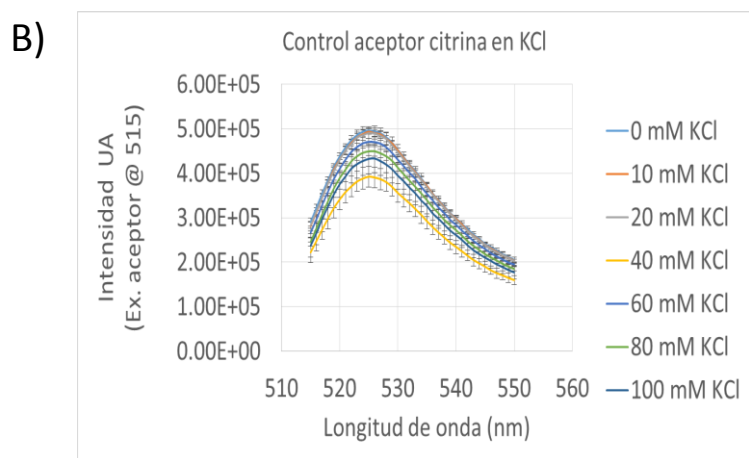
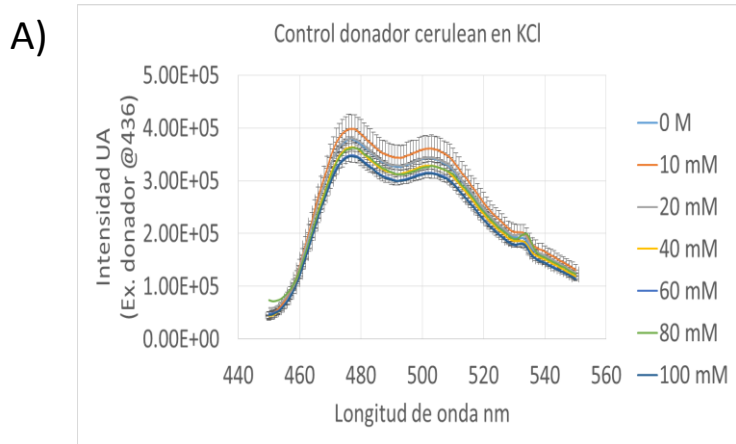


Figura 35. Cociente normalizado de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 bajo tratamientos con diferentes concentraciones de PEG 5000

Cuando se realizaron los tratamientos con KCl, no se detectaron efectos significativos en concentraciones entre 0 mM y 40 mM sobre la fluorescencia del donador cerúleo (Fig. 36A). Igualmente, no se detectó efecto significativo sobre el aceptor citrina en este mismo rango de concentraciones de KCl (Fig. 36B y Anexo L.10 y L.11). En cambio cuando se realizó la determinación para las proteínas recombinantes de interés, se detectaron diferencias en el cociente de FRET desde 10 mM, la menor concentración utilizada (Fig. 37). Sin embargo, cabe hacer notar que este efecto no incrementó con concentraciones mayores de KCl, a pesar de que se generó una ligera disminución en el potencial osmótico de la solución. En comparación a los tratamientos con PEG, en este caso aunque también ocurre una disminución en el potencial osmótico con el aumento en la concentración de KCl, éste presenta valores 10 veces mayores a los que se producen con el PEG; es decir, en las soluciones de KCl hay más agua disponible que en las de PEG.



s

Figura 36. Efecto del incremento en la concentración de KCl sobre las proteínas fluorescentes donadora-cerulean (A) y aceptora-citrina (B).

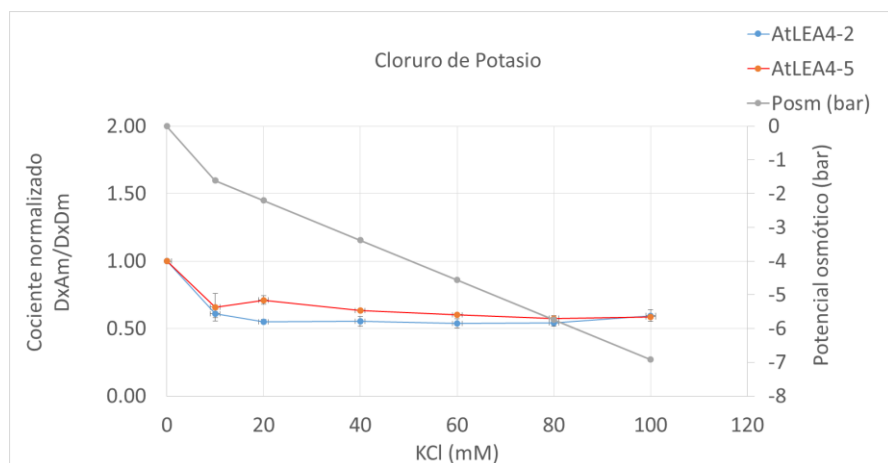


Figura 37. Cociente normalizado de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 ante tratamientos con diferentes concentraciones de KCl.

Los distintos tratamientos con concentraciones crecientes de D-manitol hasta 500 mM causaron una disminución en la fluorescencia del donador (cerúlean) que no fue significativa (Fig. 38A); en tanto que cuando se analizó el efecto sobre el fluoróforo donador (citrina), utilizando la citrina purificada (Fig. 38B) o la citrina en la proteína recombinante (Anexo L.7 a L.8) se detectó, como en los otros casos, una disminución significativa en su fluorescencia. Los valores en el cociente de FRET para la proteína recombinante AtLEA4-2pFLIPi38 mostraron una disminución ante el aumento en la concentración de manitol, indicando cambios en la conformación de esta proteína ante este tratamiento. Sin embargo para la proteína recombinante AtLEA4-5pFLIPi38, este cambio no se detectó sino hasta concentraciones mayores a 300 mM (Fig. 39).

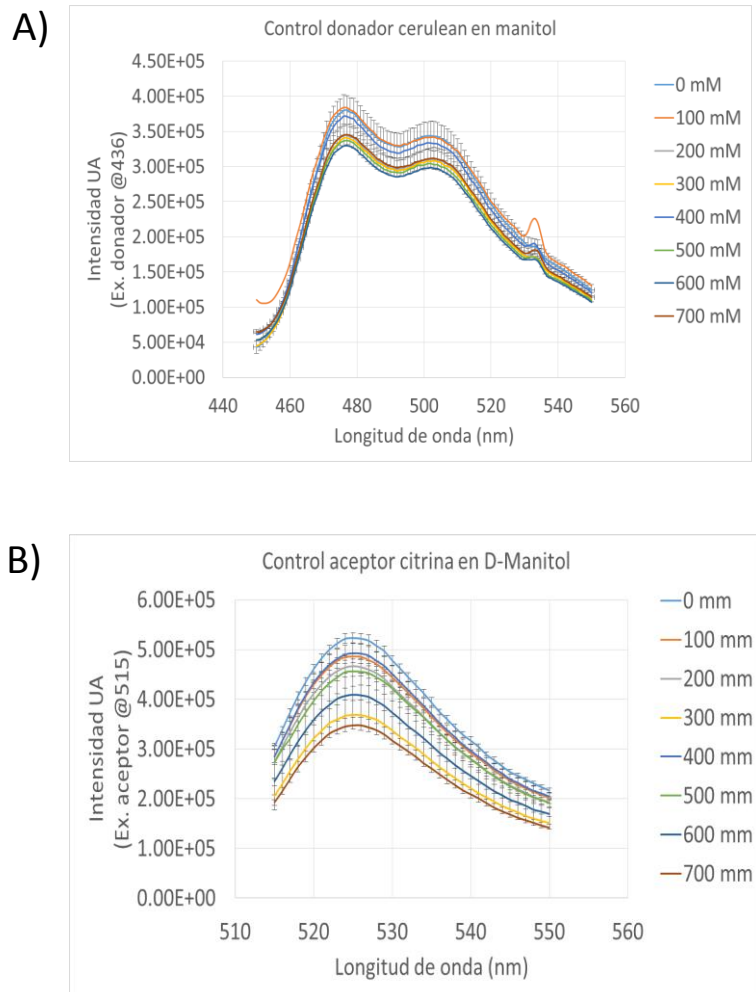


Figura 38. Efecto del incremento en la concentración de manitol sobre las proteínas fluorescentes donadora, cerulean (A), y aceptor, citrina (B).

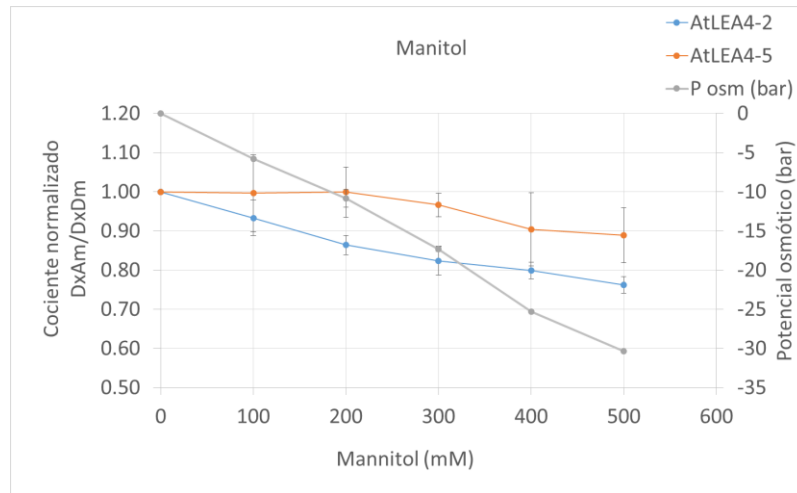


Figura 39. Cociente normalizado de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 ante tratamientos con diferentes concentraciones de D-manitol

Cuando se llevaron a cabo los tratamientos con diferentes concentraciones de glicerol, se detectaron diferencias significativas en la disminución de fluorescencia sobre el fluoróforo donador (Cerulean) después del 40% (Fig. 40A), por lo que se estableció esta concentración como el límite máximo para el análisis de los cocientes de FRET con las proteínas recombinantes. Así mismo, no se detectó disminución en la intensidad de fluorescencia en el fluoróforo aceptor (citrina) en el mismo rango de concentración (Fig. 40B y Anexo L.4 a L.5). La determinación del cociente de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 mostró que el incremento en la concentración de glicerol lleva a una disminución en estos cocientes. Esto ocurre desde concentraciones entre el 5% al 40% (Fig. 41). Se observó un incremento en la emisión de fluorescencia del fluoróforo donador y en contraparte una disminución en la emisión de fluorescencia del fluoróforo aceptor, posiblemente a consecuencia de un alejamiento de ambos pares de fluoróforos (Anexo K.4 a K.5). A concentraciones mayores entre 60% y 80% de glicerol hay una notable disminución en las relaciones FRET y en la emisión de fluorescencia de ambos controles, esto debido probablemente a que el glicerol genera potenciales osmóticos demasiado bajos afectando a todo el sistema de fluoróforos.

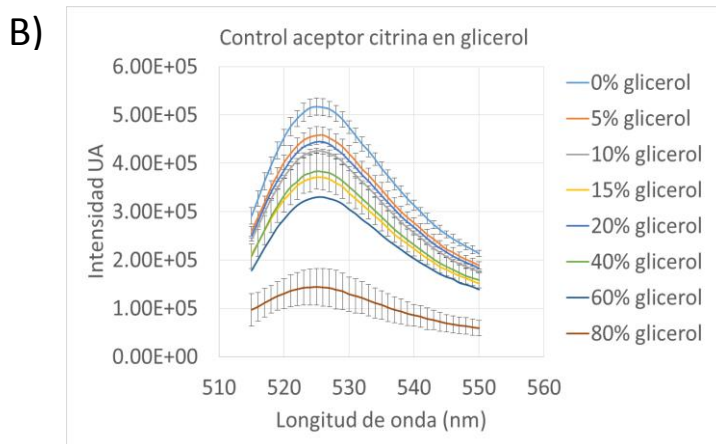
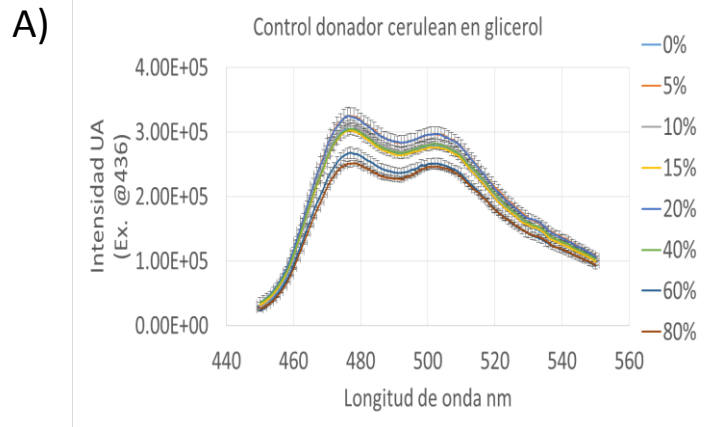


Figura 40. Efecto del incremento en la concentración de glicerol sobre las proteínas fluorescentes donadora, cerulean (A), y aceptora, citrina (B).

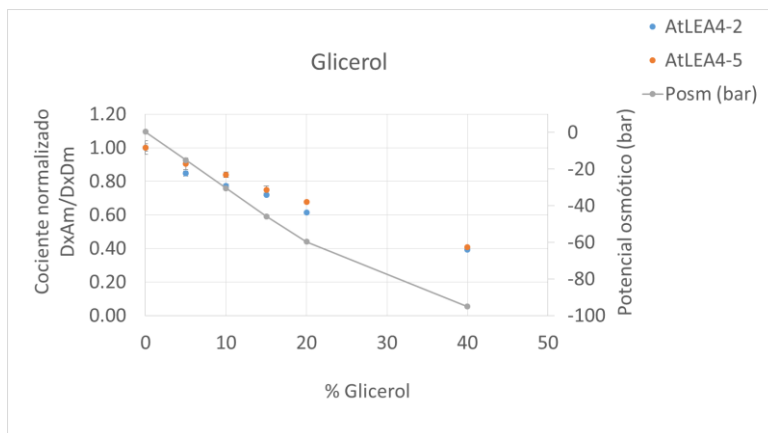


Figura 41. Cociente normalizado de FRET para las proteínas recombinantes AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38 ante tratamientos con diferentes concentraciones de glicerol.

Discusión general

En este trabajo se logró establecer un sistema para determinar cambios conformacionales en las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana*, AtLEA4-2 y AtLEA4-5. Se demuestra que es posible detectar cambios en el cociente de FRET que indican que cuando se modifican las condiciones ambientales en que se encuentran estas proteínas, éstas sufren ciertos cambios conformacionales que se reflejan por las diferencias observadas en los valores de transferencia de energía entre los fluoróforos reporteros seleccionados. Las modificaciones detectadas ocurren en condiciones en las cuales disminuye el agua disponible y/o aumenta el amontonamiento macro- o micro-molecular y que se inducen con la adición de diferentes compuestos, como el PEG (5000) que promueve el amontonamiento macro-molecular y disminuye al agua disponible, como lo muestra la disminución en el potencial osmótico de las soluciones utilizadas. También se usaron manitol y glicerol para causar una disminución en el agua disponible (reducción en los valores de potencial osmótico), así como micro-amontonamiento molecular. Uno de los compuestos que de forma universal usan los diferentes organismos para regular la cantidad de agua intracelular es el KCl, el cual a diferencia del NaCl se considera como un osmolito compatible en un rango amplio de concentraciones. Por ello también incluimos en este análisis la adición de diferentes concentraciones de KCl.

En nuestro grupo ya se había demostrado por dicroísmo circular que estas proteínas LEA son proteínas intrínsecamente desordenadas en solución acuosa y que compuestos como el PEG y el glicerol promueven cambios conformacionales en ellas, incrementando la abundancia de estructuras tipo alfa-hélice. Estas observaciones nos llevaron a hipotetizar que estas proteínas pueden cambiar su conformación estructural ante cambios en el ambiente celular, en particular ante cambios asociados a la deficiencia de agua. También propusimos que estas modificaciones estructurales podrían ser necesarias para que la proteína reconozca a sus blancos, y/o para que lleve a cabo su función óptimamente, con lo que ello pudiera implicar. Es por ello, que resulta apremiante contar con un procedimiento que permita determinar si estos cambios conformacionales ocurren *in vivo*. El uso de reporteros fluorescentes para determinar cambios estructurales en proteínas y para conocer la interacción ente una proteína y su(s) ligando(s) se ha convertido en una vía común para abordar este tipo de preguntas, dada la facilidad para detectar estas

señales en células vivas (Long et al., 2017). Para ello se han diseñado diferentes proteínas quiméricas, las cuales se fusionan con otras proteínas con la capacidad de emitir energía en forma de fluorescencia a longitudes de onda específicas al ser excitadas con una energía determinada y particular para cada caso. Este tipo de macromoléculas son conocidas como biosensores (Jones et al., 2014). Estas herramientas nos llevaron a la concepción de este proyecto con la idea de establecer un sistema experimental que nos permitiría detectar cambios conformacionales en las proteínas LEA de interés ante cambios en el ambiente intracelular *in vivo*. Así que, como una primera fase resultaba obligatorio el diseño de estas moléculas biosensoras conteniendo el ‘cuerpo’ de las proteínas AtLEA4-2 o AtLEA4-5. Como se describe en esta tesis, fue de gran ayuda que en la literatura estaban reportados pares con ciertas proteínas fluorescentes con las características apropiadas para este fin; es decir, que pudieran ser utilizadas para detectar FRET (ver Introducción para detalles). En concordancia con reportes de la literatura, el par de fluoróforos que presentó las mejores propiedades para nuestros fines es el formado por cerúlean como fluoróforo donador y citrina como el fluoróforo aceptor, presentes en el vector pFLIPi38. A su vez, estas proteínas fluorescentes son versiones mutantes de las silvestres en las que los cambios generados causaron una mayor tendencia a formar dímeros estables, de tal forma que una vez que se acercan pueden permanecer más tiempo juntas, promoviendo así una mejor señal de FRET (Vinkenburg et al., 2007). Las proteínas quiméricas, conformadas por las secuencias de las proteínas AtLEA4-2 o AtLEA4-5, flanqueadas por las secuencias de citrina en sus extremos amino y cerúlean en sus extremos carboxilo, funcionaron como los biosensores para detectar los posibles cambios conformacionales en dichas proteínas LEA. La confiabilidad de estos experimentos requirió de incluir varios controles; como aquéllos que nos permitieran conocer si los fluoróforos se afectaban por los tratamientos en los que se podían esperar cambios conformacionales; así como, determinar las concentraciones de proteína a utilizar que no promovieran interacciones inter-proteína que generarían señales de FRET y que, por tanto, interferirían con las señales de FRET provocadas realmente por interacciones intra-proteína. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron establecer las condiciones en las cuales es posible, a su vez, determinar las señales de

FRET atribuibles a cambios intra-proteína, no debidos a un efecto de los tratamientos sobre las proteínas fluorescentes.

El trabajo en esta tesis demuestra que los biosensores aquí obtenidos son capaces de detectar cambios en señales de FRET ante diferentes condiciones ambientales, prevalentes bajo deficiencia de agua, lo que indica la generación de cambios conformacionales en las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5, resultados que son consistentes con los datos reportados con anterioridad (Cuevas-Velazquez et al., 2016).

El análisis de estos resultados sugiere que la proteína AtLEA4-2 es más sensible a algunos de estos tratamientos, como ocurrió con manitol o PEG, en donde el cociente de FRET presenta mayores cambios para la proteína recombinante AtLEA4-2 que para la proteína AtLEA4-5. Este efecto también es notorio en el caso del tratamiento con TFE, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos por DC para estas proteínas (Cuevas-Velazquez et al., 2016). Una posible explicación a este comportamiento es la diferencia que existe entre estas proteínas relacionada con la región carboxi-terminal, la cual está presente en la AtLEA4-5 pero no así en la AtLEA4-2. Hemos demostrado que esta región contiene un alto grado de desorden estructural que le podría conferir a la AtLEA4-5 una mayor flexibilidad o una menor capacidad de estabilizar una cierta estructura bajo determinadas circunstancias. A esto habría que sumarle el hecho de que la AtLEA4-5 tiene una mayor longitud que la AtLEA4-2, lo que podría exacerbar su posible mayor flexibilidad estructural.

Los datos obtenidos también indican que el FRET parece ser un método más sensible para determinar cambios conformacionales que el DC, ya que concentraciones tan bajas como 2% de TFE inducen cambios en el cociente de FRET para ambas proteínas, condición que no produce cambios en los perfiles de DC; lo mismo sucedió en el tratamiento con glicerol, en donde concentraciones menores al 10% ya permiten detectar cambios en el cociente de FRET para ambas proteínas y no así por DC. Estas observaciones correlacionan mejor con las condiciones que pueden llegar a presentarse en una célula vegetal ante déficit hídrico, en donde se pueden determinar potenciales osmóticos de alrededor de -10 hasta -30 bares en órganos de hojas, y que se producen en concentraciones de glicerol entre el 5% y 10%. Sin embargo, cabe recordar que la condición en la que las proteínas LEA son más abundantes es en las semillas secas, las

cuales pueden llegar a alcanzar valores de potenciales osmóticos hasta de -1000 bares. El efecto causado por el glicerol en este estudio es comparable al ejercido por manitol en un cierto rango de concentración; sin embargo, se detectaron más diferencias en los cocientes de FRET entre las proteínas ensayadas en el tratamiento con manitol que en los obtenidos por la adición de glicerol. De ahí que no sea simple concluir si estos compuestos sólo generan una disminución del agua disponible, o si el efecto de micro-amontonamiento es diferente entre ambos osmolitos

Otra observación que llamó la atención en este análisis es que los tratamientos con PEG causan un aumento en los cocientes de FRET conforme se incrementa su concentración, un comportamiento contrario al observado para los demás tratamientos. Esto sugiere que el amontonamiento macro-molecular generado por el PEG promueve cambios conformacionales muy diferentes en las proteínas LEA bajo estudio a los causados por la disminución en el agua disponible, ya que aquí el efecto de la disminución en el potencial osmótico causa un aumento en los cocientes de PEG indicativo de un acercamiento de los fluoróforos. Sería entonces interesante probar otro tipo de amontonadores macro-moleculares para determinar si el efecto es similar al causado por el PEG.

Finalmente, en el caso de los tratamientos con KCl se detectó un cambio significativo desde la concentración más baja utilizada que fue de 10 mM; sin embargo, concentraciones mayores no causaron un efecto superior. Las concentraciones utilizadas no modifican considerablemente el potencial osmótico de la solución, los valores de éste están muy por debajo de los generados por manitol, glicerol o PEG; el más bajo fue de sólo -5 bares. Es posible que la disminución que se detectó en el cociente de FRET se haya debido a interacciones electrostáticas entre estos iones y algunos de los residuos de aminoácidos en las proteínas LEA analizadas, lo cual pudo haber modificado su ángulo de posicionamiento y ésto ser la causa de un cambio en la señal de FRET.

En su conjunto los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que es posible utilizar nuestros biosensores para determinar las posibles modificaciones conformacionales de las proteínas LEA ante cambios en el ambiente celular *in vivo*. Así mismo, el uso de estos biosensores *in vivo* podrá determinar si se pueden aplicar para conocer el estado osmótico o de amontonamiento de una célula determinada bajo diferentes condiciones de estrés.

CAPITULO 5: TRANSPORTADOR DE ARABINOSA ARAF

Análisis por FRET del efecto del ambiente sobre la conformación de ArafpFLIPi38

El uso de la proteína AraF como un indicador del funcionamiento de FRET en el sistema de fluoróforos a probar cumplió su objetivo, puesto que en nuestros experimentos se comportó como se esperaba con los diferentes pares de fluoróforos utilizados, mostrando valores similares para los cocientes de FRET a los reportados ante la presencia de arabinosa (Fig. 27 y Fig. 42), corroborando así que los procedimientos que se siguieron para realizar las diferentes mediciones fueron los adecuados. En el contexto de la pregunta de si cambios en el ambiente promueven cambios conformacionales en proteínas desordenadas como las proteínas LEA, se pensó en abordar también la pregunta de si estos cambios inducen modificaciones conformacionales en proteínas con un mayor orden estructural como la misma proteína AraF. Un análisis *in silico* de AraF con el algoritmo PONDR (Predictor of Naturally Disordered Regions, por sus siglas en inglés) predice que existen regiones en esta proteína con propensión a desorden entre los residuos 130 a 140 y 305 a 320 (Fig. 43A); sin embargo, de acuerdo al algoritmo AGADIR, la gran mayoría de AraF más bien presenta propensión a mantener orden estructural formando alfa-hélices (Fig. 43B). El algoritmo PONDR utiliza la información de secuencias ordenadas y desordenadas de proteínas estudiadas por RMN, DC y cristalografía de rayos-x para entrenar al programa con atributos como hidropatía y carga neta en ventanas de 8 a 40 residuos. PONDR muestra valores entre 0 y 1, donde 0 representa una mayor probabilidad de una región con orden mientras que 1 representa una mayor probabilidad a ser una región con desorden. El algoritmo AGADIR muestra la propensión de obtener alfa hélice en función de la tendencia intrínseca de cada residuo e interacciones de corto alcance.

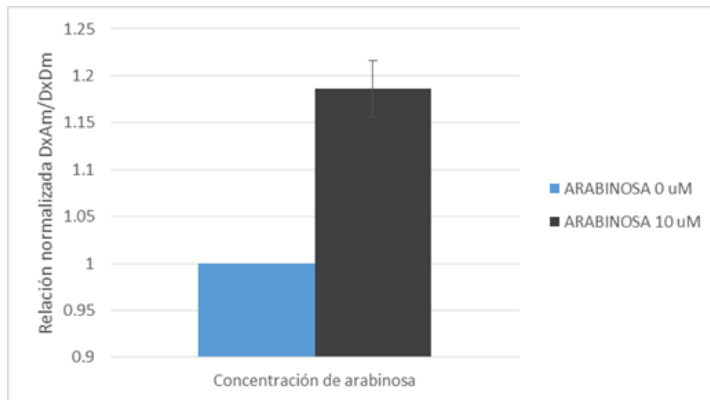


Figura 42. Cociente normalizado de FRET de la proteína recombinante AraF_{FLIPi38} en respuesta a la presencia de arabinosa.

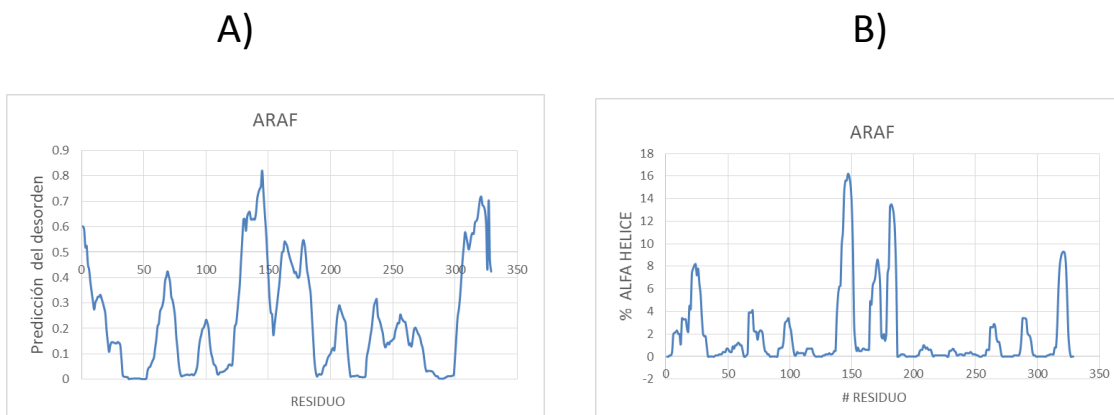


Figura 43. Predicción del desorden (A) y orden (B) estructural para la proteína AraF obtenidos mediante los algoritmos PONDRA y AGADIR, respectivamente.

Cabe hacer notar que al analizar la estructura cristalográfica de AraF (Quioco et al., 1984), ésta muestra dos lóbulos compuestos de alfa-hélices y láminas beta unidos por una bisagra flexible o desordenada (Fig. 44).

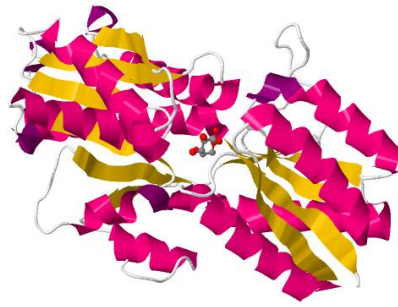


Figura 44. Estructura cristalográfica del transportador de arabinosa: AraF (Tomada de RCSB PDB, PDB ID: 1ABE; Quioco FA, et. al ,1984)

Al analizar los resultados obtenidos tras las adiciones mencionadas, éstos mostraron que la proteína recombinante AraFpFLIPi38 presenta los valores más altos en los cocientes de FRET ante los distintos tipos de tratamientos probados (Fig. 45 a Fig. 48). Aunque para los tratamientos con glicerol el efecto sobre los cocientes de FRET fue contrario; es decir éstos disminuyen conforme aumenta la concentración de glicerol, sugiriendo un cambio conformacional distinto al ejercido por el resto de los tratamientos (Fig. 49).

Estos datos indican que, contrario a lo esperado para una proteína considerada ordenada, la conformación de esta proteína presenta una respuesta mayor al amontonamiento macro y micro-molecular y a la cantidad del agua disponible en el medio. Una posible explicación a estas observaciones es la estructura misma de AraF, la cual, como se describe arriba, presenta una conformación de lóbulo-bisagra-lóbulo; de tal forma que la presencia de una región desordenada entre ambos lóbulos ordenados podría ser la responsable de esta aparente mayor flexibilidad conformacional. Puesto que estos experimentos se realizaron bajo condiciones *in vitro*, fuera de un contexto celular, no es posible afirmar que estos cambios conformacionales realmente ocurren en la célula. Sin embargo, abren la posibilidad a considerar que las condiciones del periplasma, compartimento en donde se localiza esta proteína, en cuanto a amontonamiento molecular o la disponibilidad de agua sean un factor modulador de la función de AraF. También llama la atención la notable respuesta que mostraron los cocientes de FRET ante los tratamientos con KCl, lo cual lleva a la inevitable hipótesis de que las concentraciones de KCl en el periplasma es un factor importante a considerar como modulador de la

actividad de AraF, posiblemente, relacionada con la eficiencia en el reconocimiento y translocación de arabinosa hacia el citoplasma.

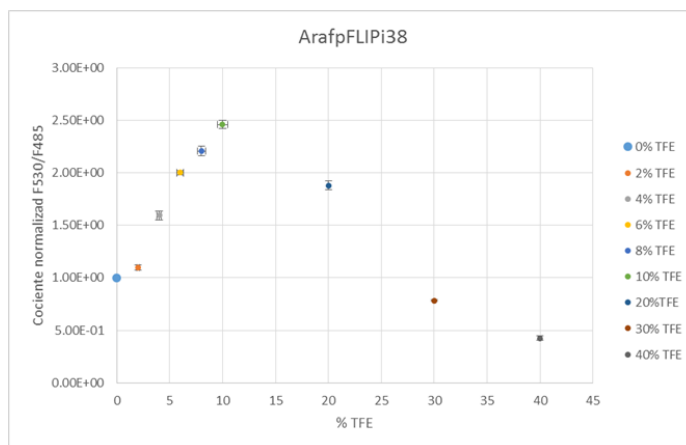


Figura 45. Cociente normalizado de FRET en respuesta a los tratamientos de la proteína recombinante ArafpFLIPi38 con diferentes concentraciones de TFE.

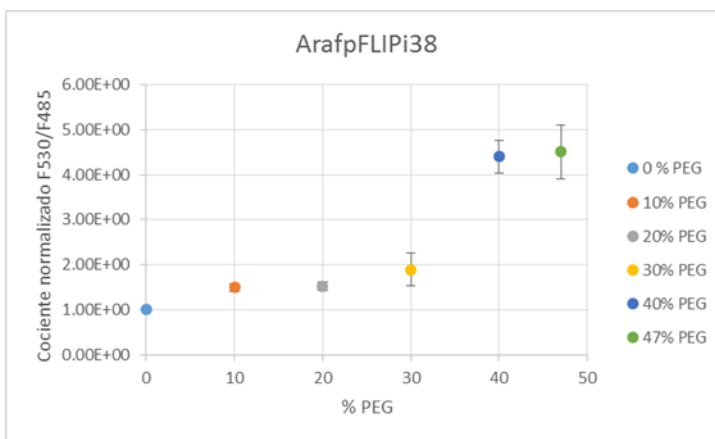


Figura 46. Cociente normalizado de FRET en respuesta a los tratamientos de la proteína recombinante ArafpFLIPi38 con diferentes concentraciones de PEG 5000

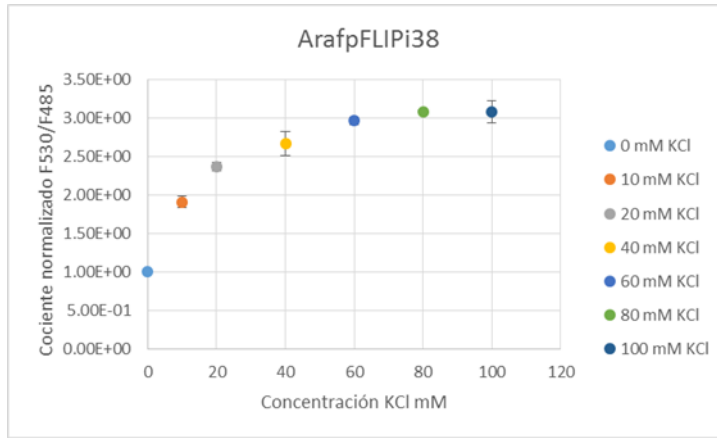


Figura 47. Cociente normalizado de FRET en respuesta a los tratamientos de la proteína recombinante ArafpFLIPi38 con diferentes concentraciones de KCl.

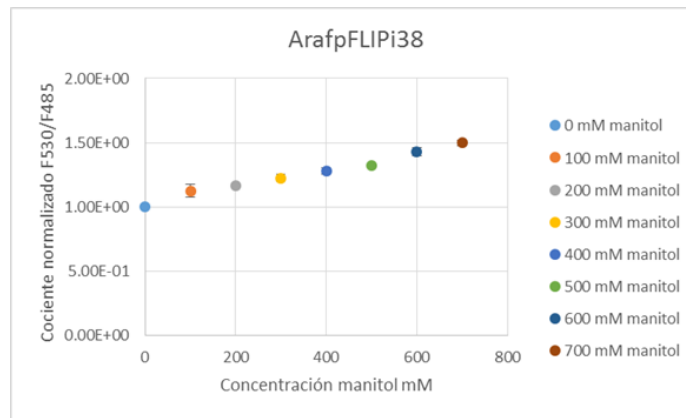


Figura 48. Cociente normalizado de FRET en respuesta a los tratamientos de la proteína recombinante ArafpFLIPi38 con diferentes concentraciones de manitol.

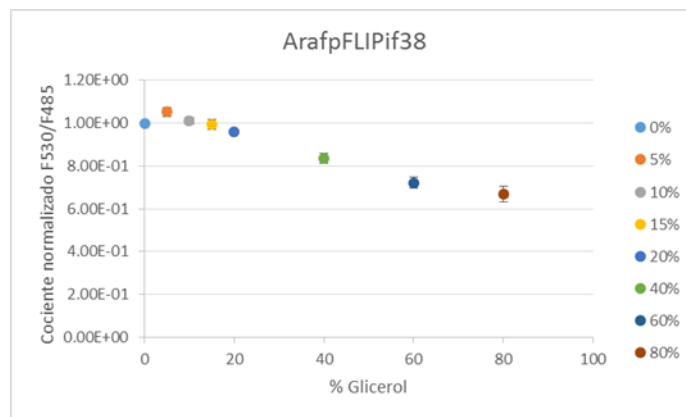


Figura 49. Cociente normalizado de FRET en respuesta a los tratamientos de la proteína recombinante ArafpFLIPi38 con diferentes concentraciones de glicerol.

CAPITULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- Se estableció *in vitro* el sistema experimental de FRET con sus respectivos controles.
- Se logró detectar cambios conformacionales *in vitro* en las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 ante TFE, glicerol, KCl y PEG.
- Las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5 mostraron un comportamiento similar ante los cambios en los cocientes de FRET, sin embargo AtLEA4-2pFLIPi38 obtuvo mayores valores en el cociente de FRET que AtLEA4-5pFLIPi38.

PERSPECTIVAS

- Realizar los análisis de FRET para la proteína AtLEA4-HpFLIPi38 en los distintos tratamientos. Esta presenta solamente el extremo amino-terminal por lo que se espera un comportamiento similar a AtLEA4-2.
- Analizar por FRET solo el extremo carboxilo terminal de la proteína AtLEA4-5 el cual presenta un mayor grado de desorden.
- Realizar esta técnica *in vivo* en bacterias y en raíces de *A. thaliana* para detectar cambios conformacionales en las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5.
- Optimizar el sistema de FRET usando fluoróforos químicos que pueden unirse covalentemente a residuos de cisteína y así evitar el uso de proteínas fluorescentes de gran tamaño.

REFERENCIAS

1. Altenbach K, Duncan RR, Valkonen M (2009). In vivo FLIM-FRET measurements of recombinant proteins expressed in filamentous fungi. *ELSEVIER: British Mycological Society*. **23**, 67-71.
2. Amero, C (2014). Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear de Proteínas. Ciudad de México: Prado.
3. Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*. **148**, 6–24.
4. Battaglia M, Covarrubias AA (2013). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in Legumes. *Front Plant Sci*. **4**, 1-11.
5. Bray EA. (2007). Plant response to water deficit stress. *Encyclopedia of Life Sciences*.1-7.
6. Buchanan BB, Gruissem W, Jones LL (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Biologists*. 1158-1159.
7. Caramelo JJ, Iusem ND (2009). When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology. *ELSEVIER*. **99**, 1-6.
8. Chen Y, Mills JD, Periasamy A (2003). Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Internationally Society of Differentiation*.**71**, 528-541.
9. Cuevas-Velazquez CL, Saab-Rincón G, Reyes JL, Covarrubias AA (2016). The unstructured N-terminal region of Arabidopsis group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA) is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *J Biol Chem*. **291**, 10893-10903.
10. Cuevas-Velazquez CL, Rendón-Luna DF, Covarrubias AA (2014). Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins *Front Plant Sci*. **5**, 583.
11. Dure L (1993b). Structural motifs in LEA proteins. In: TJ Close, EA Bray, eds, Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, MD.91-103.
12. E. coli genotypes. (2017). OpenWetWare . Retrieved 19:04, April 18, 2017 from http://www.openwetware.org/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=977214.
13. Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *ELSEVIER Science*. **2**, 48-54.
14. Fink AL (2005). Natively unfolded proteins. *Cur Op Struct Biol*. **15**, 35–41.
15. Fujii, H, Verslues PE, Zhu JK (2007). Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **19**, 485–494.
16. Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*. **275**, 5668–5674.
17. Hsiao TC (1973). Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol*. **24**, 519-570.
18. Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **47**, 377-403.

19. Jenks MA, Hasegawa PM (2005). Plant Abiotic Stress. *Blackwell Publishing*.1-266.
20. Jones AM, Danielson JAH, Manoj Kumar SN, Lanquar V, Grossmann G, Frommer WB (2014). Abscisic acid dynamics in roots detected with genetically encoded FRET sensors. *eLife Sci*. 1-30.
21. Kaper T, Lager I, Looger LL, Chermak D, Frommer WB (2008). Fluorescence resonance energy transfer sensors for quantitative monitoring of pentose and disaccharide accumulation in bacteria. *Biotechnology for Biofuels*. **1**, 11.
22. Kelly SM, Jess TM, Price NC (2005). How to study proteins by circular dichroism. *ELSEVIER: Bioquimica et Biophysica Acta*.**1751**, 119-13.
23. Lakowicz JR (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Baltimore:Springer.
24. Leung J, Giraudat J (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199-222.
25. Liu Z, Huang Y (2014). Advantages of proteins being disordered. *Wiley-Blackwell. The Protein Society*. **23**,539-550.
26. Long Y, Stahl Y, Weidtkamp-Peters S, Postma M, Zhou W, Goedhart J, Sanchez-Perez MI, Gadella Jr. TWJ, Simon R, Scheres B, Blilou I (2017). In vivo FRET–FLIM reveals cell-type-specific protein interactions in Arabidopsis roots. *Nature*. 1-6.
27. McMeekin, TL (1952). Milk proteins. *J. Food Protect.* **15**, 57–63.
28. Meyer K, Leube MP, Grill E (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science*. **264**, 1452-1455.
29. Okumoto S, Jones A, Frommer WB (2012). Quantitative imaging with fluorescent biosensors. *Ann Rev Plant Biol.* **63**, 663-706.
30. Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garciarubio A, Covarrubias AA (2010). Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **154**, 373-390.
31. Olvera-Carrillo Y, Reyes JL, Covarrubias AA (2011). Late Embryogenesis Abundant Proteins: Versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant Signal Behav.* **6**, 586-589.
32. Pandey S, Assmann SM (2004). The Arabidopsis Putative G Protein–Coupled Receptor GCR1 Interacts with the G Protein α Subunit GPA1 and Regulates Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell.* **16**, 1616–1632.
33. Pandley S, Nelson DC, Assmann SM (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell.* **136**, 136-148.
34. Park Sang-Youl, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow F, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ., Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu K, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009). Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science*. **324**, 1068–1071.
35. Verveer PJ, Bastiaens IH (2003). FRET Analysis of Signaling Events in Cells. *ELSEVIER Science*. **2**, 305-309.

36. Quiocho, FA, Vyas NK (1984). Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein. *Nature*. **310**, 381-386.
37. Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA (2007). Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection. *Plant Cell Environ*. **31**, 1781-1790.
38. Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant Cell Environ*. **28**, 709–718.
39. Rivera-Nájera L, Saab-Rincón G, Battaglia M, Amero C, Pulido N, García-Hernández EM, Solórzano R, Reyes JL, Covarrubias AA (2014). A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. *J Biol Chem*. **289**, 31995-32009.
40. Sekar RB, Periasamy A (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*. **160**, 629-633.
41. Shih MD, Hoekstra FA, Hsing YC (2008). Late embryogenesis abundant proteins. *ELSEVIER*. **48**, 212-255.
42. Sun X, Rikkerink EH, Jones WT, Uversky VD (2013). Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *Plant Cell*. **25**, 38-55.
43. Taiz L, Zeiger E (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 346-359.
44. Tompa P (2010). Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins. *Chapman and Hall Book*. 21-27.
45. Uversky VN (2011). Intrinsically Disordered Proteins from A to Z. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **43**, 1090-1103.
46. Van der Lee R, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker, Keith Dunker A, Fuxreiter M, Gough J, Gsponer J, Jones DT, Kim PM, Kriwacki RW, Oldfield CJ, Pappu RV, Tompa P, Uversky VN, Wright PE, Babu MM (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *American Chemical Society*. **114**, 6589-6631.
47. Vinkenborg JL, Evers TH, Reulen SW, Meijer EW, Merckx M (2007). Enhanced sensitivity of FRET-based protease sensors by redesign of the GFP dimerization interface *ChemBioChem* **8**, 1119-1121.
48. Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. **1544**, 196–206.
49. Wouters FS (2013). Forster Resonance Energy Transfer and Fluorescence Lifetime Imaging. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. 245-291.
50. Wright PE, Dyson HJ (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure–function paradigm. *J Mol Biol*. **293**, 321–31.
51. Yamaguchi K, Shinozaki K (2009). DREB Regulons in Abiotic Stress Responsive Gene Expression in Plants (T. Y. & G. S., Eds.). In *Molecular Breeding of Forage*

and Turf: The Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (pp. 15-27). NY, USA: Springer Science.

ANEXOS

ANEXO A. Condiciones de reacción para los PCR de colonia en cepa DH5 α

Tabla A.1. Inserto AtLEA4-5 en pEnter

Reactivo	Volumen por vial (20 μ l)	Volumen total 3 viales (μ l)	Condición de la reacción
Agua	14.8	44.4	94°C-10 min
Buffer 10X	2	6	35 ciclos
MgCl ₂ 50 mM	.8	2.4	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	1.2	56°C-30 s
TRC4-5F 5 μ M	.8	2.4	72°C-30 s
TRC4-5R 5 μ M	.8	2.4	72°C-5 min
Taq Pol (1U/ μ l)	.4	1.2	FIN PROGRAMA

Tabla A.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39 y pFLIPi43, Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi39 y pFLIPi43

Reactivo	Volumen por vial (20 μ l)	Volumen total 82 viales (μ l)	Condición de la reacción
Agua	14.8	1214	94°C-10 min
Buffer 10X	2	164	35 ciclos
MgCl ₂ 50 mM	.8	65.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	32.8	67°C-30 s
FLI1-F 5 μ M	.8	65.6	72°C-90 s
FLI1-R 5 μ M	.8	65.6	72°C-5 min
Taq Pol (1U/ μ l)	.4	32.8	FIN PROGRAMA

Tabla A.3. Inseto AtLEA4-2 en pFLIPi37, pFLIPi38 y pFLIPi42

Reactivo	Volumen por vial (20 µl)	Volumen total 47 viales (µl)	Condición de la reacción
Agua	15.6	733.2	94°C-10 min
Buffer 10X	2	94	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	37.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	18.8	67°C-30 s
FLI1-F 10 µM	.4	18.8	72°C-120 s
FLI1-R 10 µM	.4	18.8	72°C-5 min
Taq Pol (1U/µl)	.4	18.8	FIN PROGRAMA

Tabla A.4. Inseto AtLEA4-5 en pFLIPi37, pFLIPi38 y pFLIPi42

Reactivo	Volumen por vial (20 µl)	Volumen total 37 viales (µl)	Condición de la reacción
Agua	15.6	577.2	94°C-10 min
Buffer 10X	2	74	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	29.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	14.8	67°C-30 s
FLI1-F 10 µM	.4	14.8	72°C-45 s
FLI1-R 10 µM	.4	14.8	72°C-5 min
Taq Pol (1U/µl)	.4	14.8	FIN PROGRAMA

Tabla A.5. Inserto Araf en pFLIPi37, pFLIPi38, pFLIPi39, pFLIPi42 y pFLIPi43

Reactivo	Volumen por vial (20 µl)	Volumen total 57 viales (µl)	Condición de la reacción
Agua	14.8	843.6	94°C-10 min
Buffer 10X	2	114	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	45.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	22.8	67°C-30 s
FLI1-F 5 µM	.8	45.6	72°C-60 s
FLI1-R 5 µM	.8	45.6	72°C-5 min
Taq Pol (1U/µl)	.4	22.8	FIN PROGRAMA

ANEXO B. Condiciones de reacción para los PCR de colonia en cepa Rosetta BL21

Tabla B.1. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39 y pFLIPi43, Inserto AtLea4-5 en pFLIPi39 y pFLIPi43

Reactivo	Volumen por vial (20 µl)	Volumen total 47 viales (µl)	Condición de la reacción
Agua	15.2	714	94°C-10 min
Buffer 10X	2	94	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	37.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	18.8	67°C-30 s
FLI1-F 5 µM	.8	37.6	72°C-60 s
FLI1-R 10 µM	.4	18.8	72°C-5 min
Taq Pol (1U/µl)	.4	18.8	FIN PROGRAMA

Tabla B.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi37, pFLIPi38 y pFLIPi42, Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi37, pFLIPi38 y pFLIPi42

Reactivo	Volumen por vial (20 µl)	Volumen total 42 viales (µl)	Condición de la reacción
Agua	15.2	638.4	94°C-10 min
Buffer 10X	2	84	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	33.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	16.8	67°C-30 s
FLI1-F 5 µM	.8	33.6	72°C-90 s
FLI1-R 10 µM	.4	16.8	72°C-5 min

Tabla B.3. Inserto Araf en pFLIPi37, pFLIPi38, pFLIPi39, pFLIPi42 y pFLIPi43

Reactivo	Volumen por vial (20 μl)	Volumen total 32 viales (μl)	Condición de la reacción
Agua	15.6	499.2	94°C-10 min
Buffer 10X	2	64	35 ciclos
MgCl₂ 50 mM	.8	25.6	94°C-30 s
dNTP's 10 mM	.4	12.8	67°C-30 s
FLI1-F 10 μM	.4	12.8	72°C-60 s
FLI1-R 10 μM	.4	12.8	72°C-5 min
Taq Pol (1U/μl)	.4	12.8	FIN PROGRAMA

ANEXO C. Geles de agarosa con los ORF para AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en las construcciones recombinantes en cepa DH5 α



Figura C.1. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi37

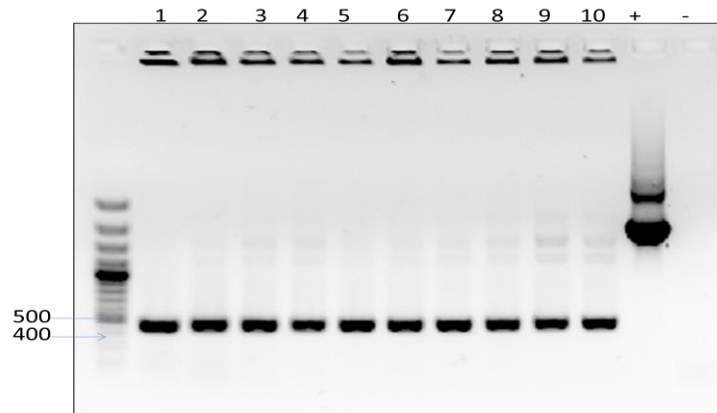


Figura C.1. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi37: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi37.

Figura C.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39

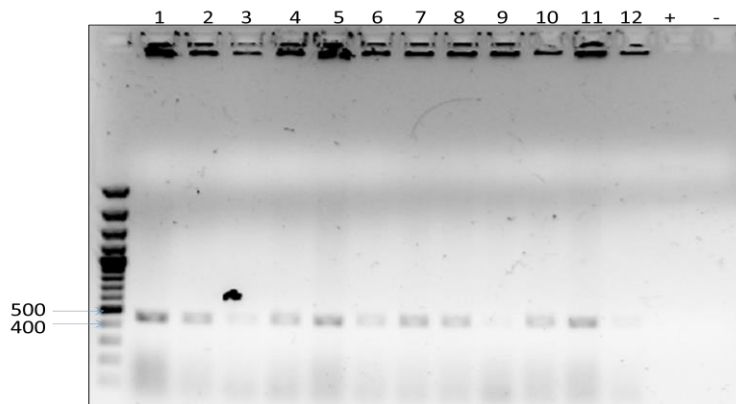


Figura C.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 12 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi39

Figura C.3. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPiF42

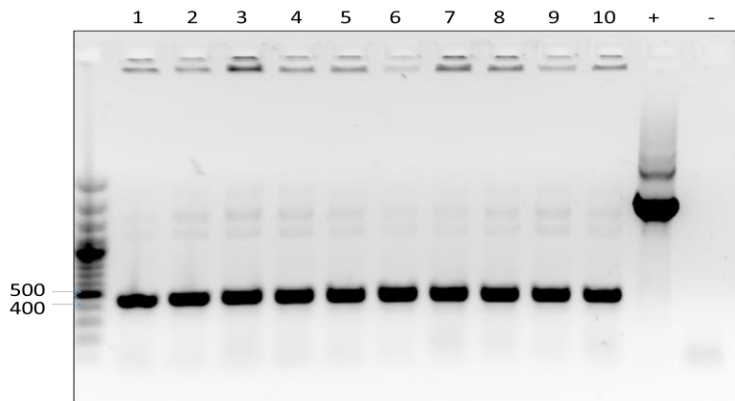


Figura C.3. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPiF42: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi42.

Figura C.4. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPiF43

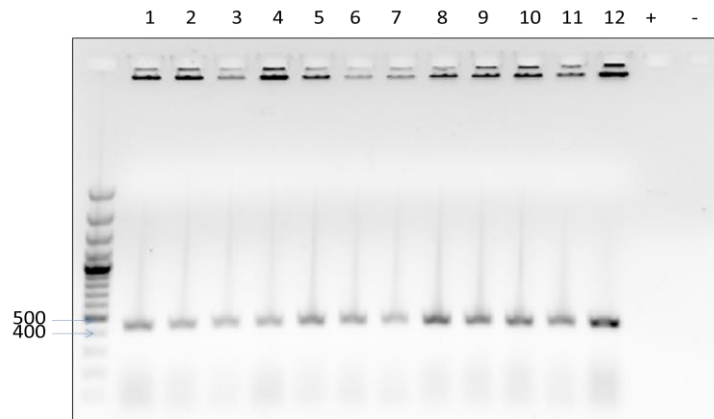


Figura C.4. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPiF43: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 12 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi43.

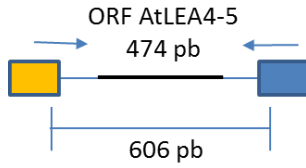


Figura C.5. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPiF37

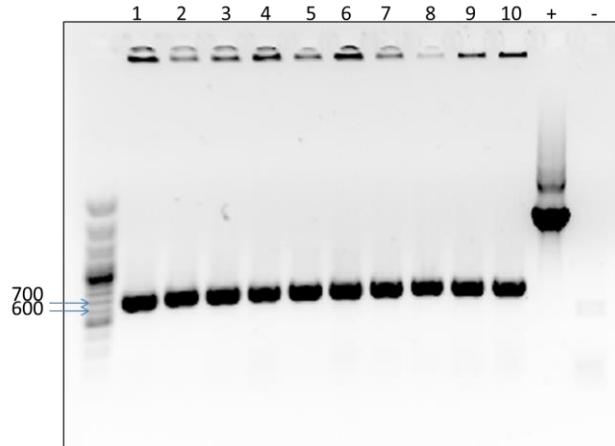


Figura C.5. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPiF37: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi37.

Figura C.6. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi39

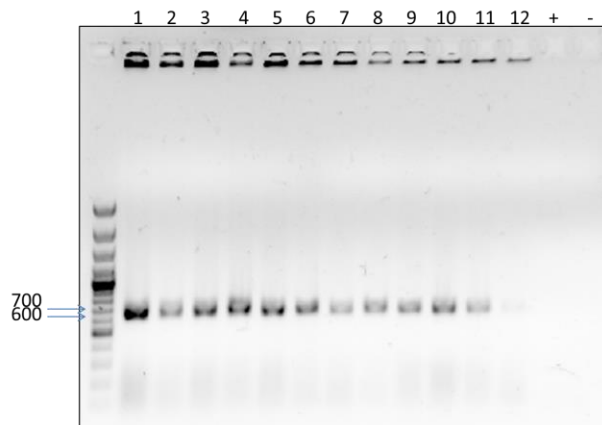


Figura C.6. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi39: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 12 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi39

Figura C.7. Inseto AtLEA4-5 en pFLIPi42

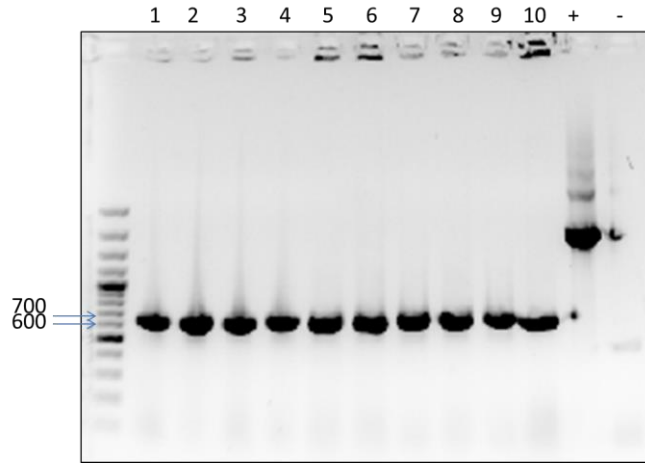


Figura C.7. Inseto AtLEA4-5 en pFLIPi42: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi42

Figura C.8. Inseto AtLEA4-5 en pFLIPi43

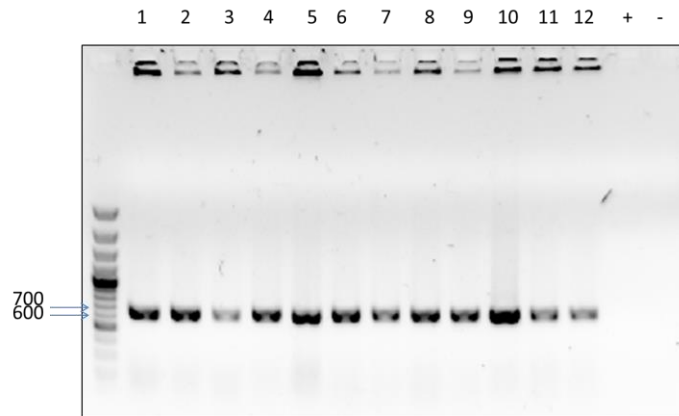


Figura C.8. Inseto AtLEA4-5 en pFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 12 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi43.

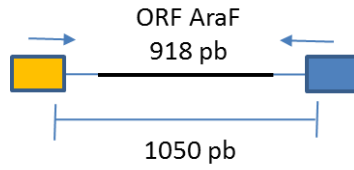


Figura C.9. Inserto AraF en pFLIPi37

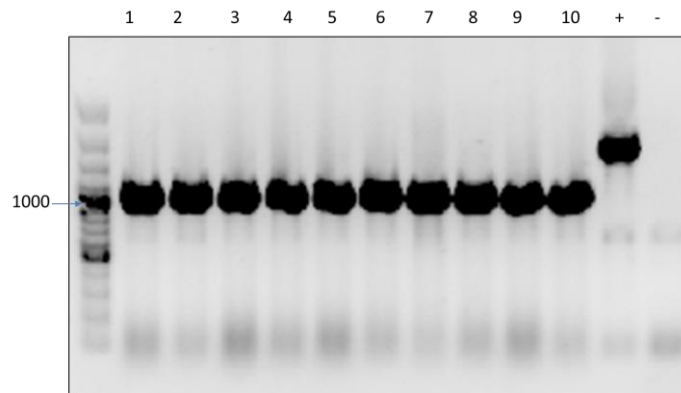


Figura C.9. Inserto AraF en pFLIPi37: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLIPi37.

Figura C.10. Inserto AraF en pFLIPi39

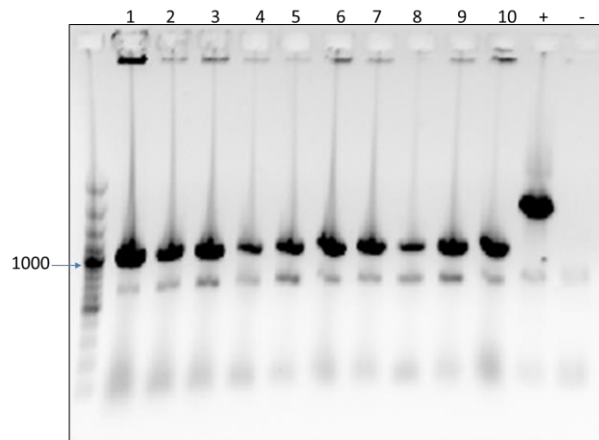


Figura C.10. Inserto AraF en pFLIPi39: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLIPi39.

Figura C.11. Inserto Araf en pFLIPi42

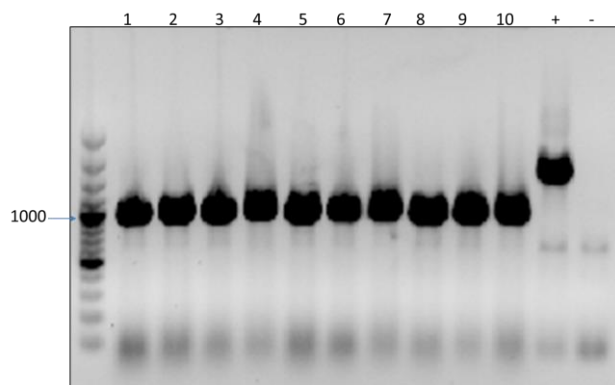


Figura C.11. Inserto Araf en pFLIPi42: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLIPi42.

Figura C.12. Inserto Araf en pFLIPi43

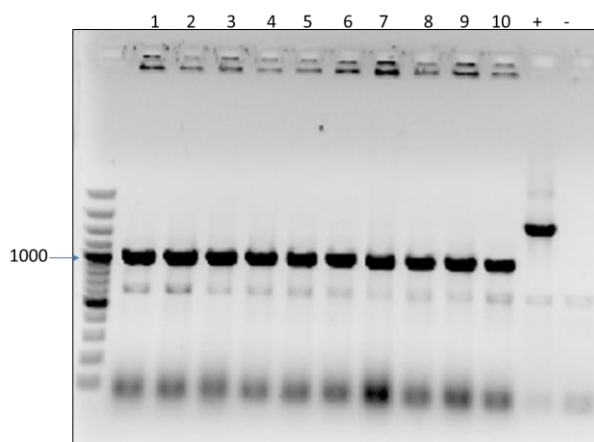


Figura C.12. Inserto Araf en pFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLIPi43.

ANEXO D. Geles de agarosa mostrando la restricción enzimática de las construcciones recombinantes mediante *EcoRV*

Figura D.1. Restricción para AtLEA4-2pFLIPiF37, AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-2pFLIPi42

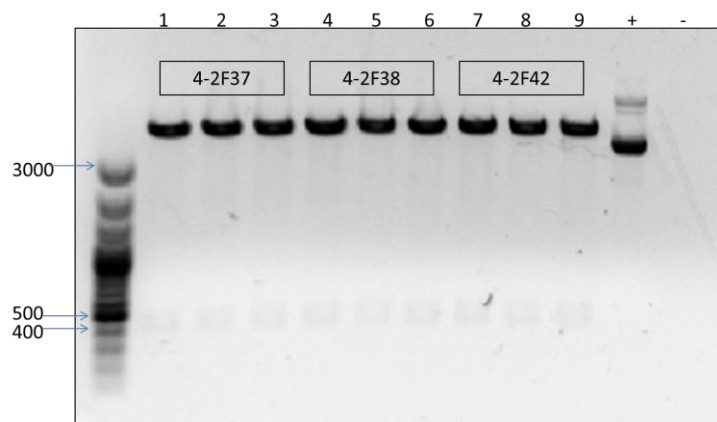


Figura D.1. Restricción para AtLEA4-2pFLIPiF37, AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-2pFLIPi42: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 9 representan las construcciones recombinantes. Todas las construcciones recombinantes dan positivo. El análisis de restricción se realizó por triplicado para cada construcción.

Figura D.2. Restricción para AtLEA4-5pFLIPi37, AtLEA4-5pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi42

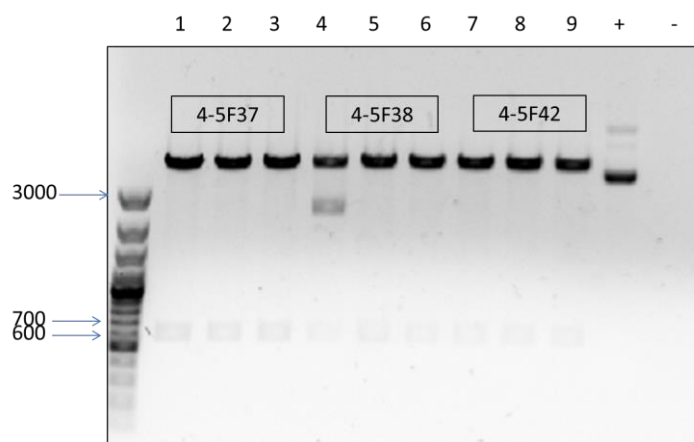


Figura D.2. Restricción para AtLEA4-5pFLIPi37, AtLEA4-5pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi42: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 9 representan las construcciones recombinantes. Todas las construcciones recombinantes dan positivo. El análisis de restricción se realizó por triplicado para cada construcción.

Figura D.3. Restricción para AtLEA4-2pFLIPi39, AtLEA4-2pFLIPi43, AtLEA4-5pFLIPi39, AtLEA4-5pFLIPi43

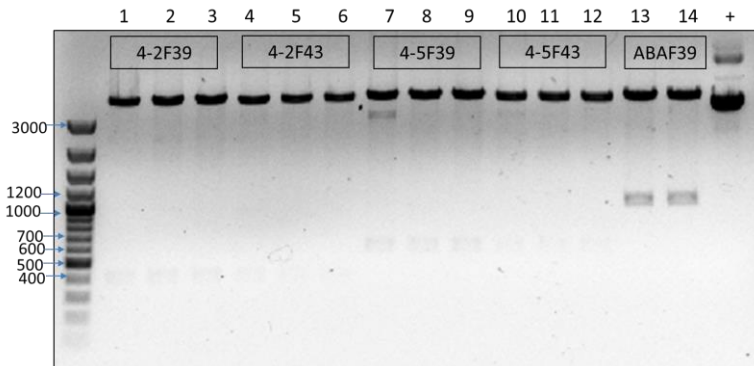


Figura D.3. Restricción para AtLEA4-2pFLIPi39, AtLEA4-2pFLIPi43, AtLEA4-5pFLIPi39, AtLEA4-5pFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). Los números 1 a 14 representan las construcciones recombinantes. Todas las construcciones recombinantes dan positivo.

Figura D.4. Restricción para ArafpFLIPi37, ArafpFLIPi38, ArafpFLIPi39, ArafpFLIPi42 y ArafpFLIPi43

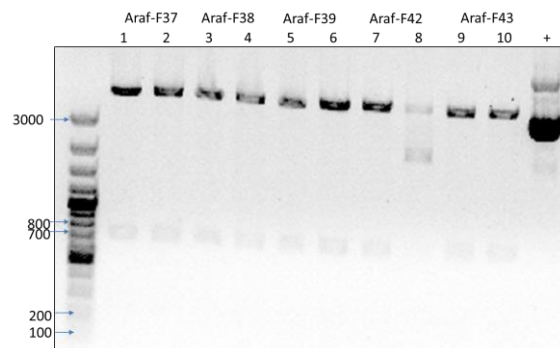


Figura D.4. Restricción para ArafpFLIPi37, ArafpFLIPi38, ArafpFLIPi39, ArafpFLIPi42 y ArafpFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). Los números 1 a 10 representan las construcciones recombinantes. Todas las construcciones recombinantes dan positivo. El análisis de restricción se realizó por duplicado para cada construcción.

ANEXO E. Cantidades obtenidas apartir de la purificación de DNA plasmídico de pFLIPi, AtLEA4-5pEnter, AtLEA4-2pEnter, AraFpEnter y construcciones recombinantes

Tabla E.1 Cuantificación de los vectores

Vector	Concentración (ng/μl)
pFLIPi37	482
pFLIPi38	565
pFLIPi39	477
pFLIPi42	494
pFLIPi43	467
AtLEA4-5pEnter	265
AtLEA4-2pEnter	210
Araf-pEnter	243
AtLEA4-5pFLIPi37	397
AtLEA4-5pFLIPi38	333
AtLEA4-5pFLIPi39	255
AtLEA4-5pFLIPi42	317
AtLEA4-5pFLIPi43	202
AtLEA4-2pFLIPi37	187
AtLEA4-2pFLIPi38	198
AtLEA4-2pFLIPi39	269
AtLEA4-2pFLIPi42	172
AtLEA4-2pFLIPi43	200
ArafpFLIPi37	311
ArafpFLIPi38	273
ArafpFLIPi39	265
ArafpFLIPi42	273
ArafpFLIPi43	226

ANEXO F. Geles de agarosa con los ORF para AtLEA4-2, AtLEA4-5 y AraF en las construcciones recombinantes en cepa Roseta



Figura F.1. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi37 y AtLEA4-5 en pFLIPi37

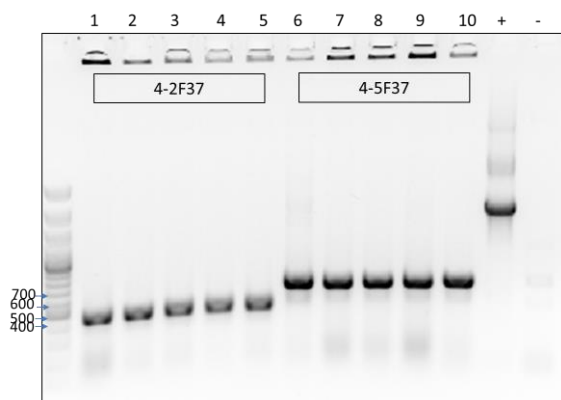


Figura F.1. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi37 y AtLEA4-5 en pFLIPi37: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi37 y AtLEA4-5pFLIPi37.

Figura F.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi38 y AtLEA4-5 en pFLIPi38

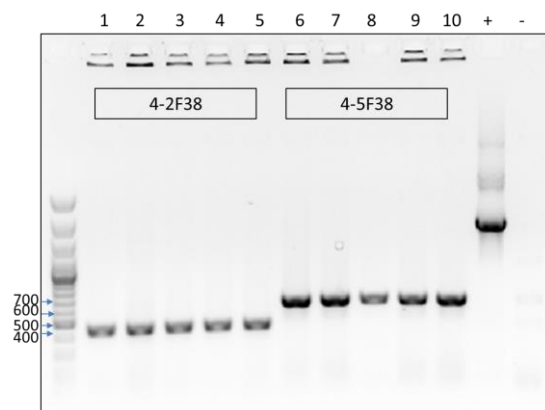


Figura F.2. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi38 y AtLEA4-5 en pFLIPi38: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi38 y AtLEA4-5pFLIPi38.

Figura F.3. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39

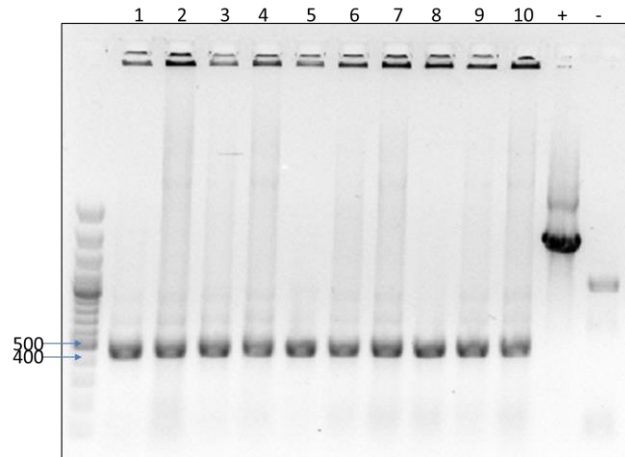


Figura F.3. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi39: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi39

Figura F.4. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi42 y AtLEA4-5 en pFLIPi42

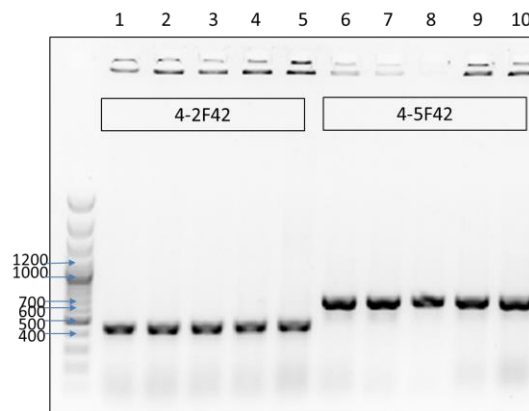


Figura F.4. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi42 y AtLEA4-5 en pFLIPi42: Los números 1 a 15 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi42 y AtLEA4-5pFLIPi42.

Figura F.5. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi43

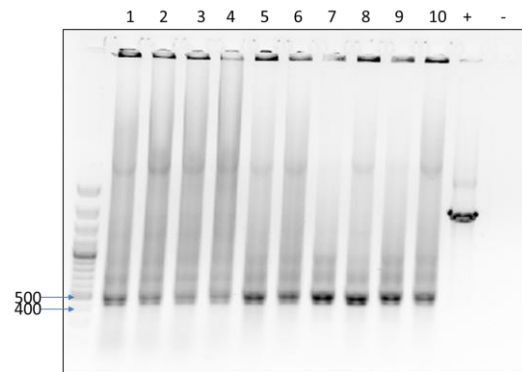


Figura F.5. Inserto AtLEA4-2 en pFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-2pFLIPi43.

Figura F.6. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi39

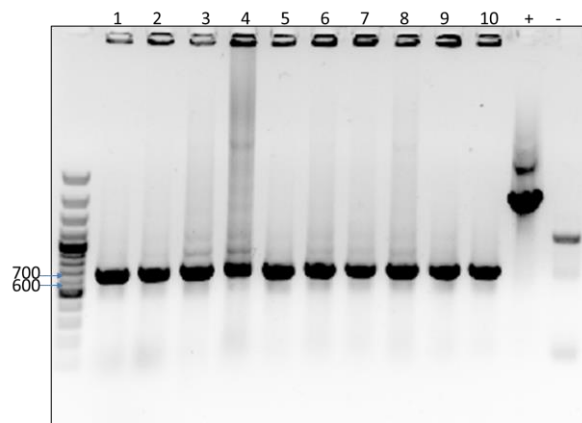


Figura F.6. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi39: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resemebradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi39.

Figura F.7. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi43

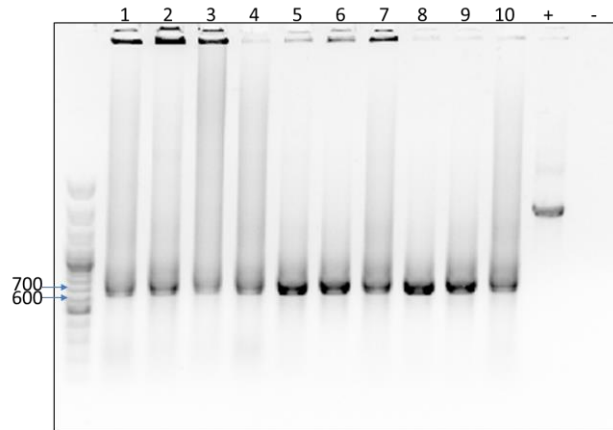


Figura F.7. Inserto AtLEA4-5 en pFLIPi43: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para AtLEA4-5pFLIPi43.

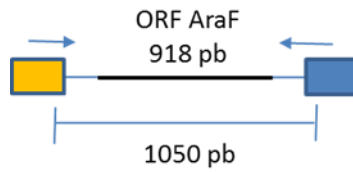


Figura F.8. Inserto Araf en pFLIPi37 y Araf en pFLIPi38

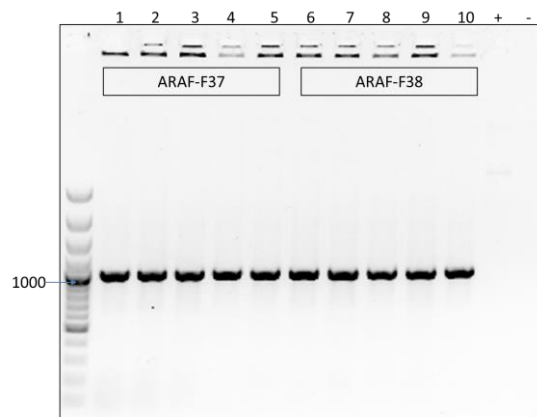


Figura F.8. Inserto Araf en pFLIPi37 y Araf en pFLIPi38: El control positivo aparece denotado con signo (+). El Control negativo aparece denotado con signo (-). Los números 1 a 10 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLIPi37 y ArafpFLIPi38.

Figura F.9 Inserto Araf en pFLiPi39, Araf en pFLiPi42 y Araf en pFLiPi43

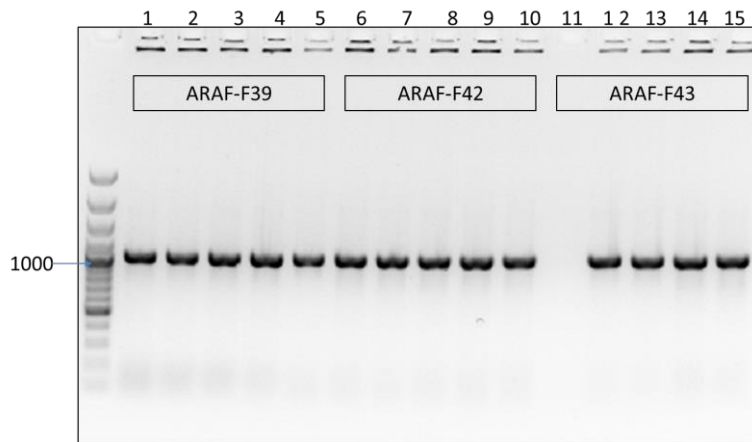


Figura F.9 Inserto Araf en pFLiPi39, Araf en pFLiPi42 y Araf en pFLiPi43: Los números 1 a 15 representan las colonias resembradas en medio LB con ampicilina. Todas las colonias dan positivo para ArafpFLiPi39 y ArafpFLiPi42. La colonia 11 dio negativa para Araf-pFLiPi43.

ANEXO G. Caracterización del proceso de elución de las proteínas AtLEA4-2pFLIPi38, AtLEA4-5pFLIPi38 y ArafpFLIPi38 mediante gradiente de imidazol así como el proceso de purificación del control donador cerulean

Figura G.1. Purificación de proteína AtLEA4-2pFLIPi38 con gradiente de imidazol

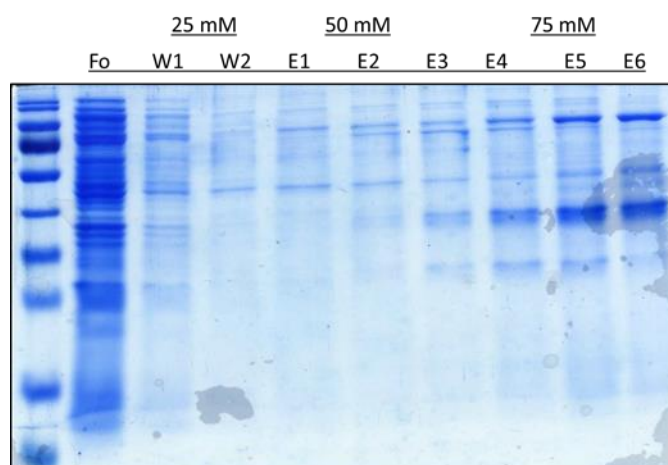


Figura G.1. Gradientes de imidazol: W1 y W2 (Fracciones de lavado 25 mM), E1-E3 (Fracciones de elución a 50 mM), E4-E6 (Fracciones de elución a 75 mM)

Figura G.2. Purificación de proteína AtLEA4-2pFLIPi38 con gradiente de imidazol

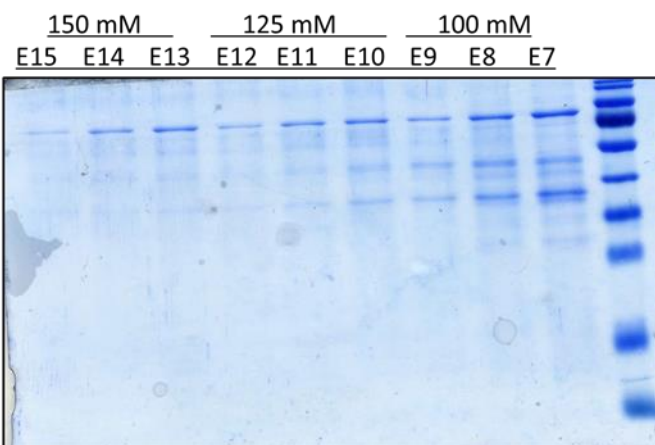


Figura G.2. Gradientes de imidazol: E7-E9 (Fracciones de elución a 100 mM), E10-E12 (Fracciones de elución a 125 mM), E13-E15 (Fracciones de elución a 150 mM)

Figura G.3. Purificación de proteína AtLEA4-2pFLIPi38 con gradiente de imidazol

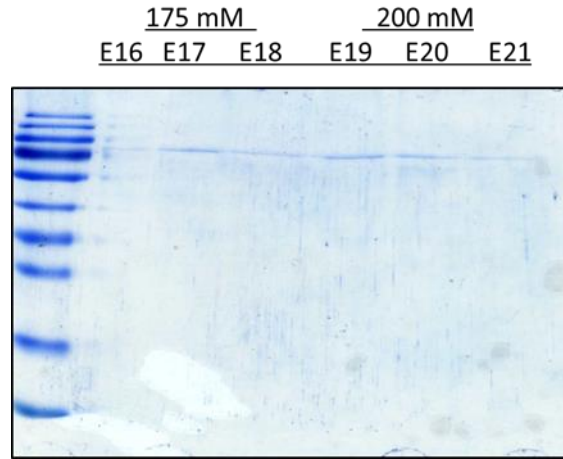


Figura G.3. Gradientes de imidazol: E16-E18 (Fracciones de elución a 175 mM), E19-E21 (Fracciones de elución a 200 mM)

Figura G.4. Purificación de proteína AtLEA4-5pFLIPi38 con gradiente de imidazol

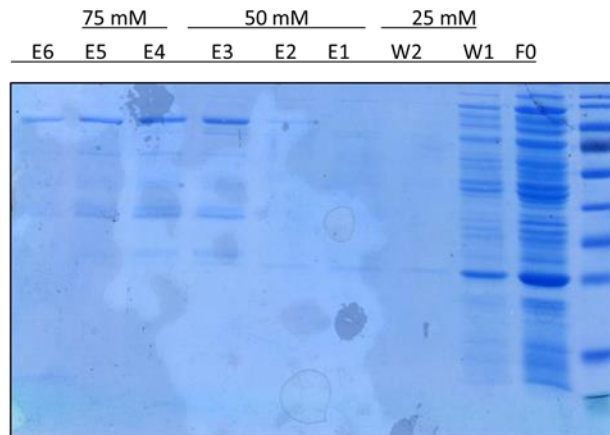


Figura G.4. Gradientes de imidazol: W1 y W2 (Fracciones de lavado a 25 mM), E1-E3 (Fracciones de elución a 50 mM), E4-E6 (Fracciones de elución a 75 mM)

Figura G.5. Purificación de proteína AtLEA4-5pFLIPi38 con gradiente de imidazol

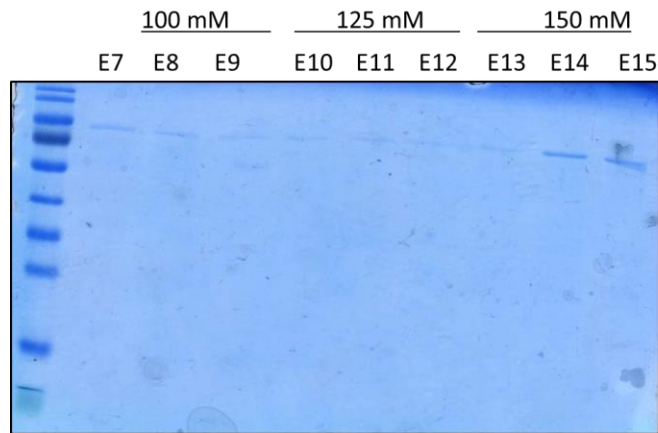


Figura G.5. Gradientes de imidazol: E7-E9 (Fracciones de elución a 100 mM), E10-E12 (Fracciones de elución a 125 mM), E13-E15 (Fracciones de elución a 150 mM)

Figura G.6. Purificación de proteína AtLEA4-5pFLIPi38 con gradiente de imidazol

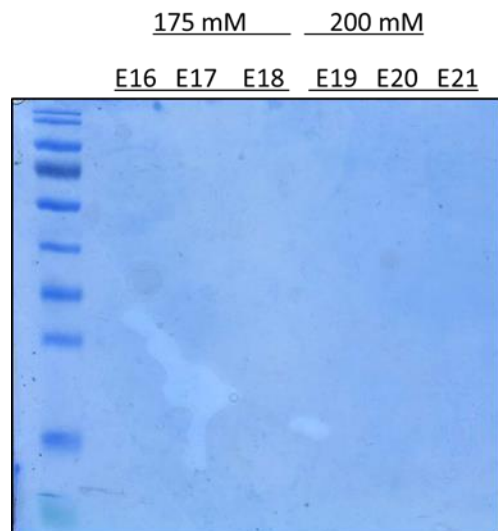


Figura G.6. Gradientes de imidazol: E16-E18 (Fracciones de elución a 175 mM), E19-E21 (Fracciones de elución a 200 mM)

Figura G.7. Purificación de proteína ArafpFLIPi38 con gradiente de imidazol

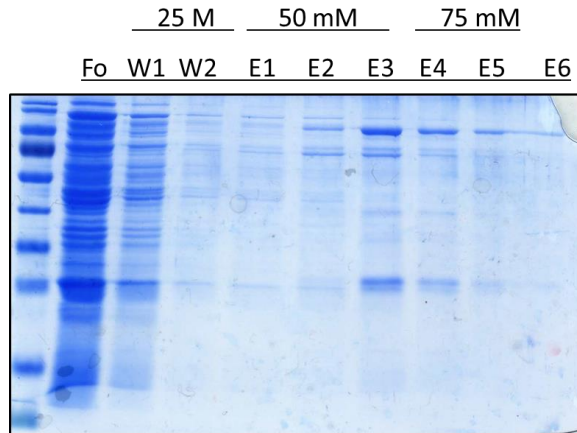


Figura G.7. Gradiente de imidazol: W1 y W2 (Fracciones de lavado a 25 mM), E1-E3(Fracciones de elución a 50 mM), E4-E6(Fracciones de elución a 75 mM)

Figura G.8. Purificación de proteína ArafpFLIPi38 con gradiente de imidazol

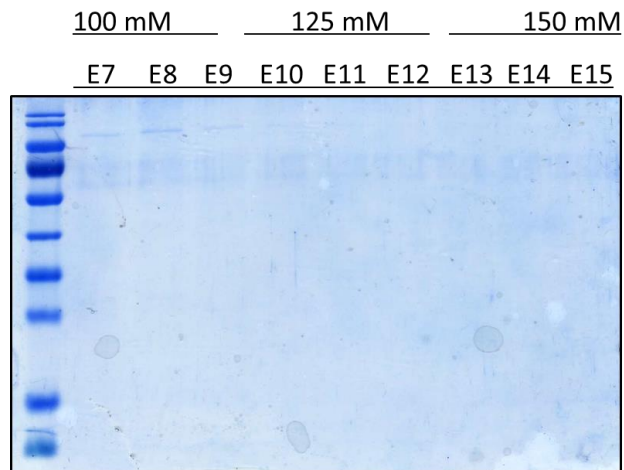


Figura G.8. Gradientes de imidazol: E7-E9 (Fracciones de elución a 100 Mm), E10-E12 (Fracciones de elución a 125 Mm), E13-E15 (Fracciones de elución a 150 Mm)

Figura G.9. Purificación de proteína ArafpFLIPi38 con gradiente de imidazol

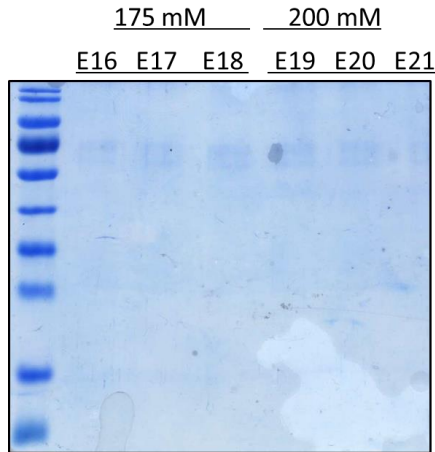


Figura G.9. Gradientes de imidazol: E16-E18 (Fracciones de elución a 175 mM), E19-E21 (Fracciones de elución a 200 mM)

Figura G.10. Proceso de purificación del control donador cerulean

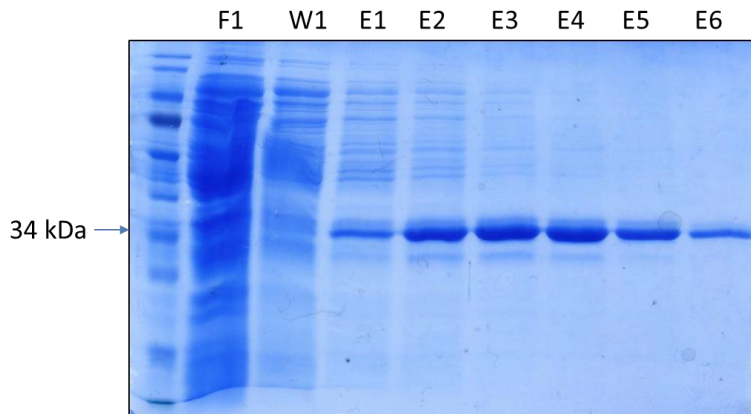


Figura G.10. Fracciones de flujo: F1, lavado 50 mM: W1 y eluciones 125 mM: E1-E6

ANEXO H. Espectros de intensidad de la fluorescencia de las proteínas recombinantes en extracto

Figura H.1. AtLEA4-2pFLIPi37

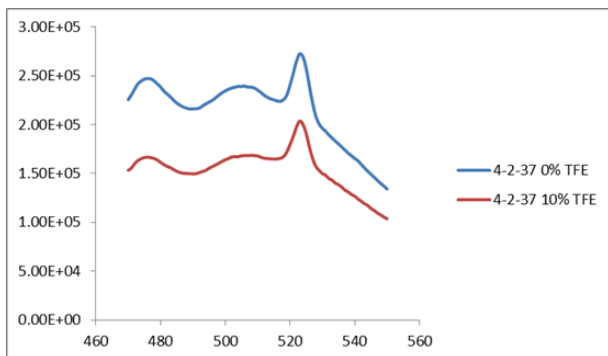


Figura H.2. AtLEA4-2pFLIPi38

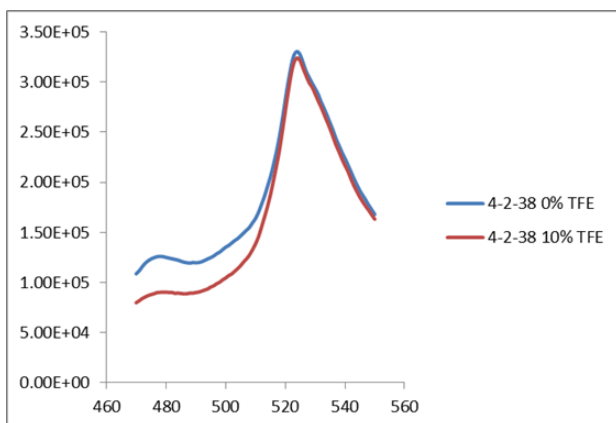


Figura H.3. AtLEA4-2pFLIPi39

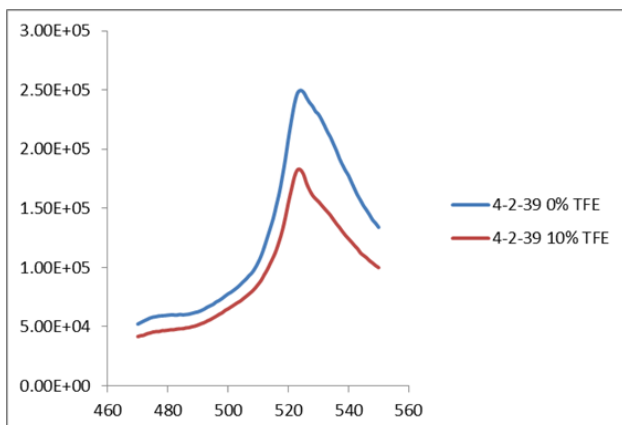


Figura H.4. AtLEA4-2pFLIPi42

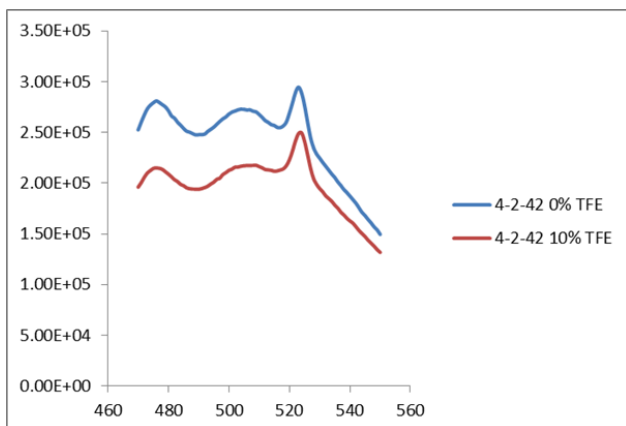


Figura H.5. AtLEA4-2pFLIPi43

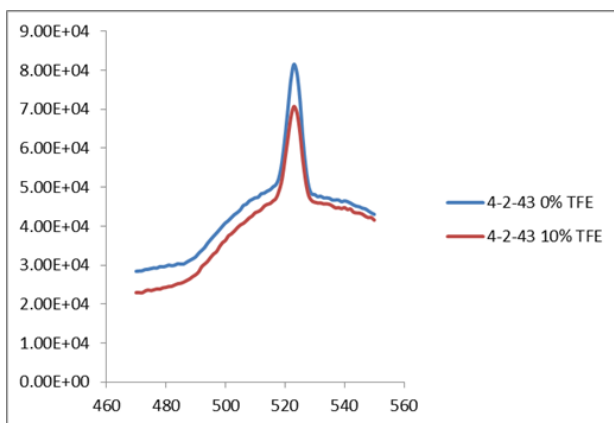


Figura H.6. AtLEA4-5pFLIPi37

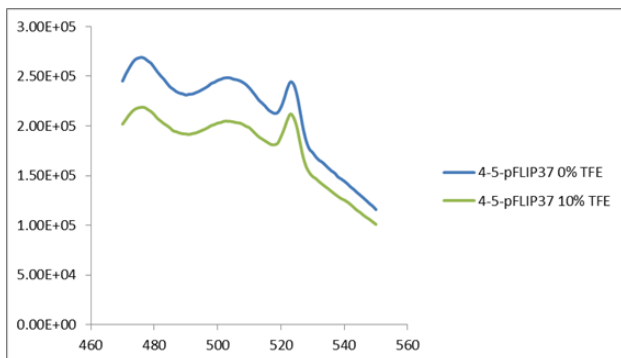


Figura H.7. AtLEA4-5pFLIPi39

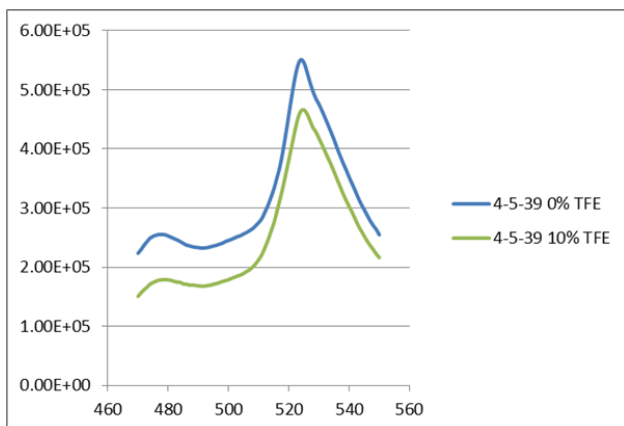


Figura H.8. AtLEA4-5pFLIPi42

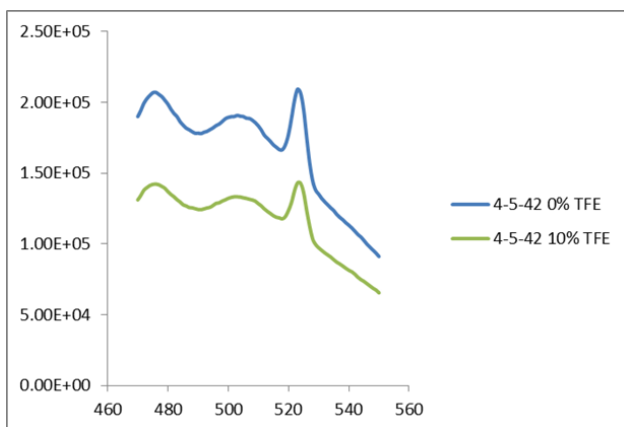
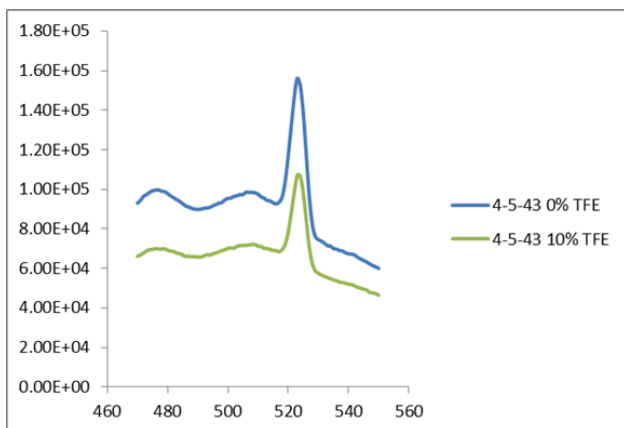


Figura H.9 AtLEA4-5pFLIPi43



ANEXO I. Mediciones de intensidad de la fluorescencia y relación FRET de las proteínas recombinantes en extracto

Tabla. I.1. AtLEA4-2pFLIPi37

% TFE	F530/F485 4-2-pFLIP37
0	8.88E-01
0	8.80E-01
0	8.84E-01
10	9.81E-01
10	9.43E-01
10	9.81E-01

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	8.84E-01
(+) 10%	9.69E-01
Δ FRET (-)/(+)	1.10E+00

Tabla. I.2. AtLEA4-2pFLIPi38

% TFE	F530/F485 4-2-pFLIP38
0	2.42E+00
0	2.40E+00
0	2.44E+00
10	3.26E+00
10	3.20E+00
10	3.23E+00

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	2.42E+00
(+) 10%	3.23E+00
Δ FRET (-)/(+)	1.34E+00

Tabla. I.3. AtLEA4-2pFLIPi39

% TFE	F530/F485 4-2-pFLIP39
0	3.82E+00
0	3.81E+00
0	3.83E+00
10	3.15E+00
10	3.19E+00
10	3.33E+00

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	3.82E+00
(+) 10%	3.22E+00
Δ FRET (-)/(+)	8.44E-01

Tabla. I.4. AtLEA4-2pFLIPi42

% TFE	F530/F485 4-2-pFLIP42
0	8.78E-01
0	8.87E-01
0	8.87E-01
10	9.93E-01
10	9.88E-01
10	9.75E-01

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	8.84E-01
(+) 10%	9.85E-01
Δ FRET (-)/(+)	1.11E+00

Tabla. I.5. AtLEA4-2pFLIPi43

% TFE	F530/F485 4-2-pFLIP43
0	1.60E+00
0	1.58E+00
0	1.60E+00
10	1.86E+00
10	1.81E+00
10	1.78E+00

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	1.59E+00
(+) 10%	1.82E+00
Δ FRET (-)/(+)	1.14E+00

Tabla. I.6. AtLEA4-5pFLIPi37

% TFE	F530/F485 4-5-pFLIP37
0	7.25E-01
0	7.25E-01
0	7.24E-01
10	7.48E-01
10	7.55E-01
10	7.57E-01

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	7.25E-01
(+) 10%	7.53E-01
Δ FRET (-)/(+)	1.04E+00

Tabla. I.7. AtLEA4-5pFLIPi39

% TFE	F530/F485 4-5-pFLIP39
0	2.00E+00
0	1.99E+00
0	1.95E+00
10	2.42E+00
10	2.43E+00
10	2.45E+00

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	1.98E+00
(+) 10%	2.43E+00
Δ FRET (-)/(+)	1.23E+00

Tabla. I.8. AtLEA4-5pFLIPi42

% TFE	F530/F485 4-5-pFLIP42
0	7.38E-01
0	7.33E-01
0	7.33E-01
10	7.63E-01
10	7.67E-01
10	7.55E-01

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	7.35E-01
(+) 10%	7.62E-01
Δ FRET (-)/(+)	1.04E+00

Tabla. I.9. AtLEA4-5pFLIPi43

% TFE	F530/F485 4-5-pFLIP43
0	7.99E-01
0	8.05E-01
0	8.09E-01
10	8.68E-01
10	8.52E-01
10	8.62E-01

TFE	DxAm/DxDm
(-) 0%	8.04E-01
(+) 10%	8.61E-01
Δ FRET (-)/(+)	1.07E+00

Tabla. I.10. Control FRET ArafpFLIPi37

% TFE	Araf-pFLIPi37 F530/F485
0	1.432580645
0	1.412250333
0	1.444411237
10	1.547636632
10	1.571588995
10	1.565609453
TFE	DxAm/DxDm
0	1.429747405
10	1.561611693
Δ FRET +/-	1.09222908

Tabla. I.11. Control FRET ArafpFLIPi38

Araf-pFLIPi38	
% TFE	F530/F485
0	6.296067849
0	6.226059655
0	6.035014006
10	6.491869919
10	6.57326284
10	6.52892562
TFE	DxAm/DxDm
0	6.185713836
10	6.531352793
Δ FRET +/-	1.055876972

Tabla. I.12. Control FRET ArafpFLIPi39

Araf-pFLIPi39	
% TFE	F530/F485
0	6.360979463
0	6.421705426
0	6.452979182
10	6.36031746
10	6.423921272
10	6.449056604
TFE	DxAm/DxDm
0	6.411888024
10	6.411098445
Δ FRET +/-	0.999876857

Tabla. I.13. Control FRET ArafpFLIPi42

Araf-pFLIPi42	
% TFE	F530/F485
0	1.420821574
0	1.435897436
0	1.433162685
10	1.632352941
10	1.589010283
10	1.592694064
TFE	DxAm/DxDm
0	1.429960565
10	1.604685763
Δ FRET +/-	1.122188822

ANEXO J. Promedios de intensidad de la fluorescencia de la proteína pura y su relación
FRET

Tabla J.1. Control FRET ArafpFLIPi38

uM arabinosa	DxAm/DxDm
(-) 0	1.85E+00
(+)10	2.19E+00
Δ FRET +/-	1.19E+00

Tabla J.2. AtLEA4-2pFLIPi38 con TFE

% TFE	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.58E+00	1.00E+00
2	1.12E+01	1.47E+00
4	1.26E+01	1.66E+00
6	1.29E+01	1.70E+00
8	1.22E+01	1.62E+00
10	1.21E+01	1.60E+00
20	9.72E+00	1.28E+00
30	6.48E+00	8.55E-01
40	8.47E-01	1.12E-01

Tabla J.3. AtLEA4-5pFLIPi38 con TFE

% TFE	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	8.46E+00	1.00E+00
2	9.80E+00	1.16E+00
4	1.11E+01	1.31E+00
6	1.14E+01	1.34E+00
8	1.11E+01	1.31E+00
10	1.07E+01	1.26E+00
20	8.57E+00	1.01E+00
30	2.89E+00	3.41E-01
40	7.18E-01	8.48E-02

Tabla J.4 ArafpFLIPi38 con TFE

% TFE	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	1.87E+00	1.00E+00
2	2.05E+00	1.10E+00
4	2.97E+00	1.59E+00
6	3.73E+00	2.00E+00
8	4.12E+00	2.21E+00
10	4.59E+00	2.46E+00
20	3.50E+00	1.88E+00
30	1.46E+00	7.83E-01
40	7.93E-01	4.25E-01

Tabla J.5. AtLEA4-2 con Glicerol

%Glicerol	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.67E+00	1.00E+00
5	6.50E+00	8.47E-01
10	5.93E+00	7.73E-01
15	5.51E+00	7.18E-01
20	4.70E+00	6.13E-01
40	3.02E+00	3.93E-01
60	2.41E+00	3.14E-01
80	2.41E+00	3.14E-01

Tabla J.6. AtLEA4-5 con Glicerol

%Glicerol	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.81E+00	1.00E+00
5	7.07E+00	9.05E-01
10	6.56E+00	8.39E-01
15	5.86E+00	7.50E-01
20	5.29E+00	6.77E-01
40	3.18E+00	4.07E-01
60	2.27E+00	2.91E-01
80	2.50E+00	3.21E-01

Tabla J.7. ArafpFLIPi38 con Glicerol

% Glicerol	DxAm/DxDm	Δ FRET
0	1.73E+00	1.00E+00
5	1.82E+00	1.05E+00
10	1.75E+00	1.01E+00
15	1.72E+00	9.93E-01
20	1.66E+00	9.59E-01
40	1.45E+00	8.37E-01
60	1.25E+00	7.22E-01
80	1.15E+00	6.68E-01

Tabla J.8 AtLEA4-2pFLIPi38 con Manitol

mM manitol	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.94E+00	1.00E+00
100	7.40E+00	9.33E-01
200	6.85E+00	8.64E-01
300	6.53E+00	8.23E-01
400	6.34E+00	7.98E-01
500	6.05E+00	7.62E-01
600	5.80E+00	7.30E-01
700	5.51E+00	6.94E-01

Tabla J.9 AtLEA4-5pFLIPi38 con Manitol

mM manitol	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.83E+00	1.00E+00
100	7.80E+00	9.96E-01
200	7.82E+00	9.99E-01
300	7.56E+00	9.66E-01
400	7.07E+00	9.04E-01
500	6.96E+00	8.89E-01
600	6.99E+00	8.93E-01
700	6.81E+00	8.71E-01

Tabla J.10 ArafpFLIPi38 con Manitol

mM Manitol	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	1.77E+00	1.00E+00
100	1.99E+00	1.12E+00
200	2.06E+00	1.16E+00
300	2.17E+00	1.22E+00
400	2.26E+00	1.28E+00
500	2.34E+00	1.32E+00
600	2.53E+00	1.43E+00
700	2.66E+00	1.50E+00

Tabla J.11 AtLEA4-2pFLIPi38 con Cloruro de Potasio

mM KCl	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.06E+00	1.00E+00
10	4.31E+00	6.10E-01
20	3.89E+00	5.51E-01
40	3.91E+00	5.53E-01
60	3.79E+00	5.37E-01
80	3.82E+00	5.41E-01
100	4.21E+00	5.96E-01

Tabla J.12 AtLEA4-5pFLIPi38 con Cloruro de Potasio

mM KCl	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.08E+00	1.00E+00
10	4.66E+00	6.59E-01
20	5.03E+00	7.11E-01
40	4.48E+00	6.34E-01
60	4.26E+00	6.03E-01
80	4.07E+00	5.76E-01
100	4.15E+00	5.86E-01

Tabla J.13 ArafpFLIPi38 con Cloruro de Potasio

mM KCl	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	1.87E+00	1.00E+00
10	3.57E+00	1.91E+00
20	4.42E+00	2.37E+00
40	4.99E+00	2.67E+00
60	5.53E+00	2.96E+00
80	5.76E+00	3.08E+00
100	5.75E+00	3.08E+00

Tabla J.14 AtLEA4-2pFLIPi38 con PEG

% PEG	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	7.39E+00	1.00E+00
10	9.13E+00	1.23E+00
20	9.35E+00	1.26E+00
30	1.29E+01	1.75E+00
40	1.34E+01	1.81E+00
47	1.67E+01	2.26E+00

Tabla J.15 AtLEA4-5pFLIPi38 con PEG

%PEG	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	8.03E+00	1.00E+00
10	6.13E+00	7.64E-01
20	7.23E+00	9.00E-01
30	6.67E+00	8.31E-01
40	1.01E+01	1.26E+00
47	1.38E+01	1.71E+00

Tabla J.16 ArafpFLIPi38 con PEG

% PEG	DxAm/DxDm	Δ FRET +/-
0	1.89E+00	1.00E+00
10	2.83E+00	1.49E+00
20	2.87E+00	1.52E+00
30	3.58E+00	1.89E+00
40	8.33E+00	4.40E+00
47	8.53E+00	4.51E+00

ANEXO K. Espectros de intensidad de la fluorescencia de la proteína pura

Figura K.1. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-2pFLIPi38 con TFE

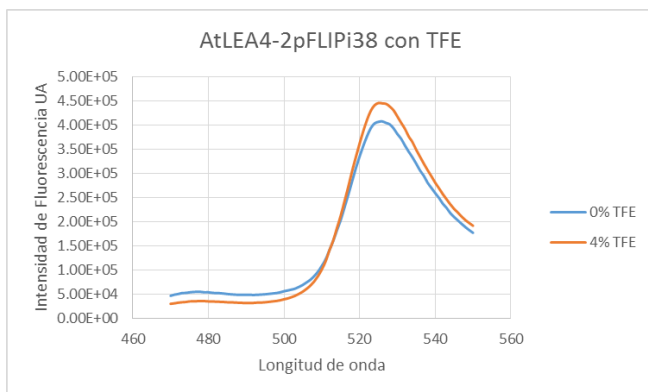


Figura K.2. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-5pFLIPi38 con TFE

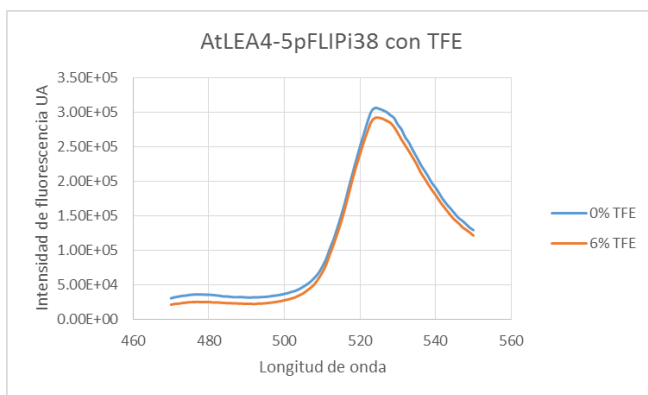


Figura K.3. Intensidad de fluorescencia ArafpFLIPi38 con TFE

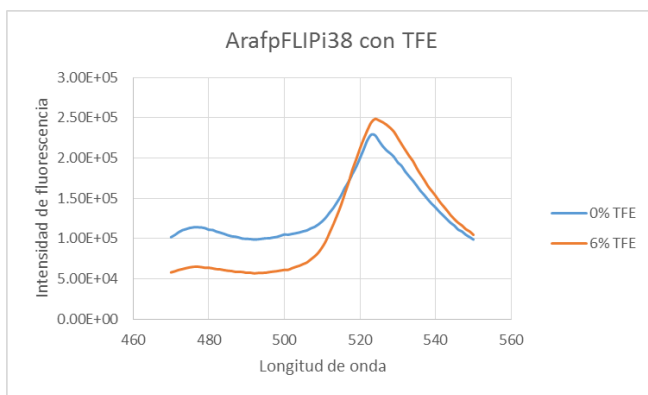


Figura K.4. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-2pFLIPi38 con Glicerol

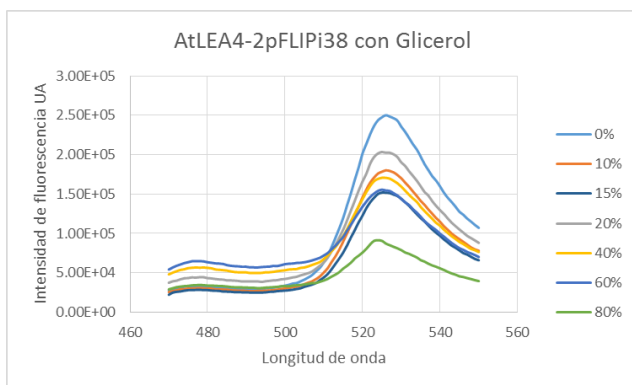


Figura K.5. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-5pFLIPi38 con Glicerol

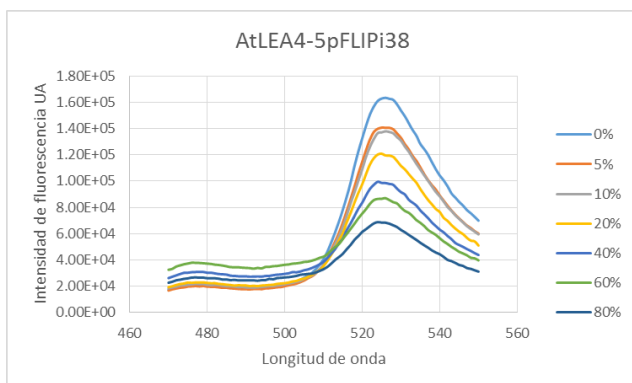


Figura K.6. Intensidad de fluorescencia ArafpFLIPi38 con Glicerol

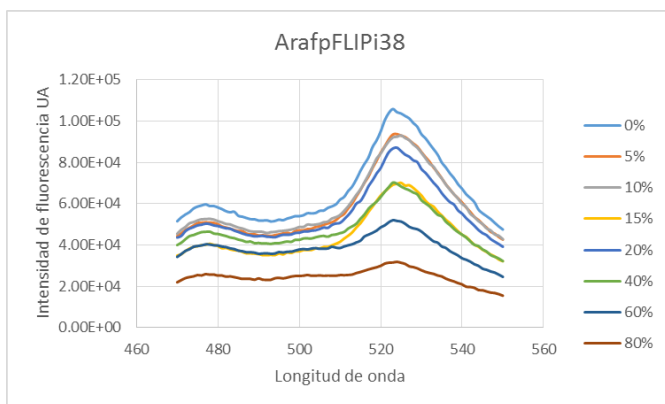


Figura K.7. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-2pFLIPi38 con Manitol

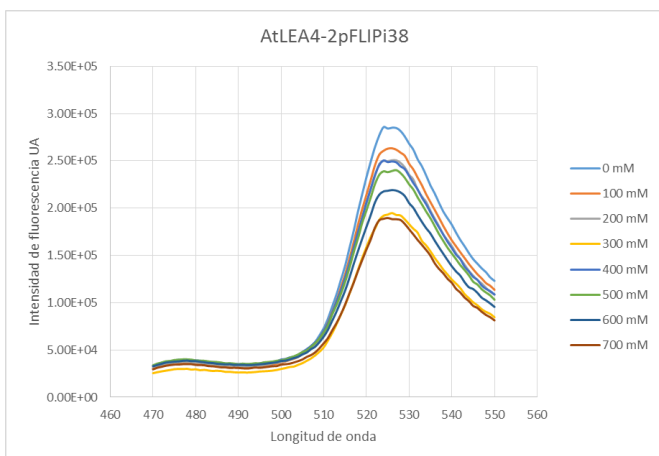


Figura K.8. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-5pFLIPi38 con Manitol

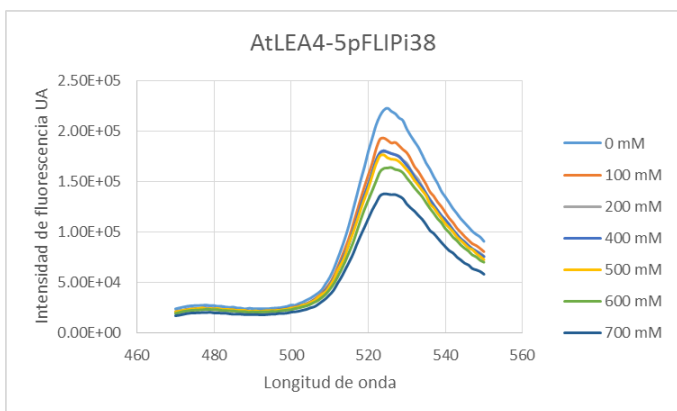


Figura K.9. Intensidad de fluorescencia ArafpFLIPi38 con Manitol

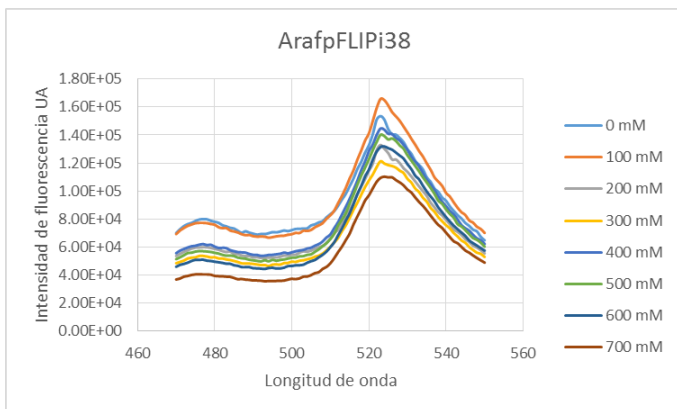


Figura K.10. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-2pFLIPi38 con KCl

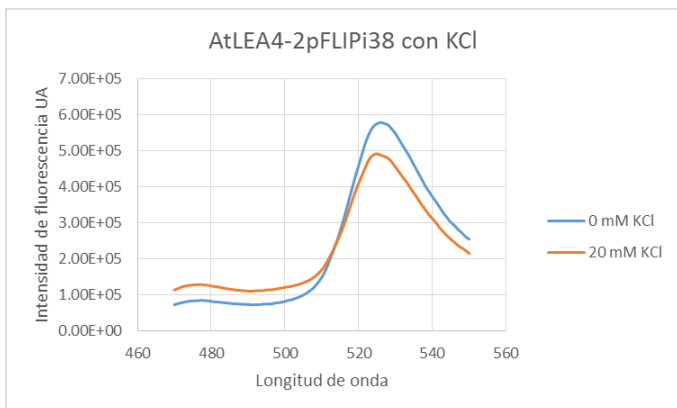


Figura K.11. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-5pFLIPi38 con KCl

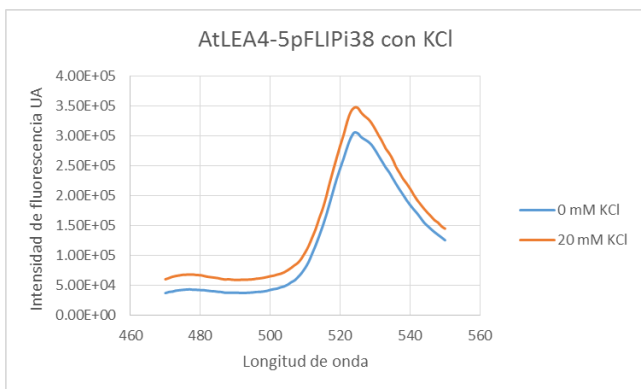


Figura K.12. Intensidad de fluorescencia ArafpFLIPi38 con KCl

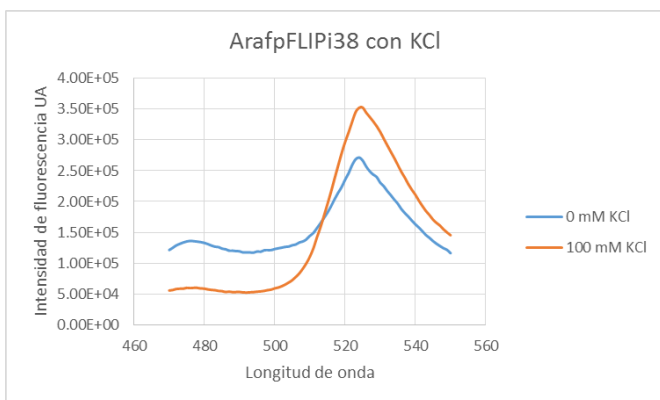


Figura K.13. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-2pFLIPi38 con PEG

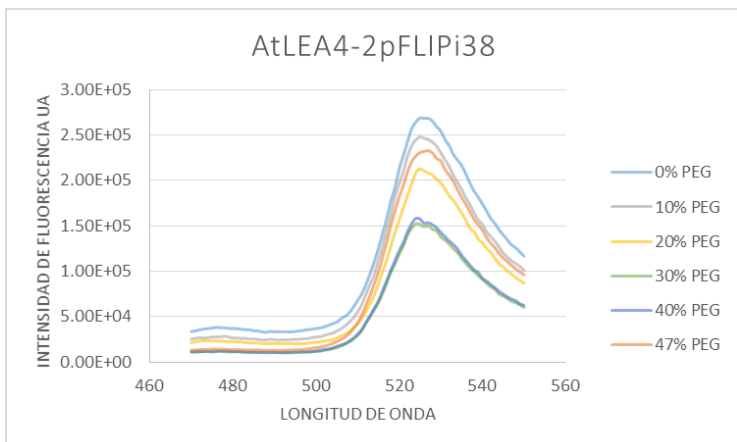


Figura K.14. Intensidad de fluorescencia AtLEA4-5pFLIPi38 con PEG

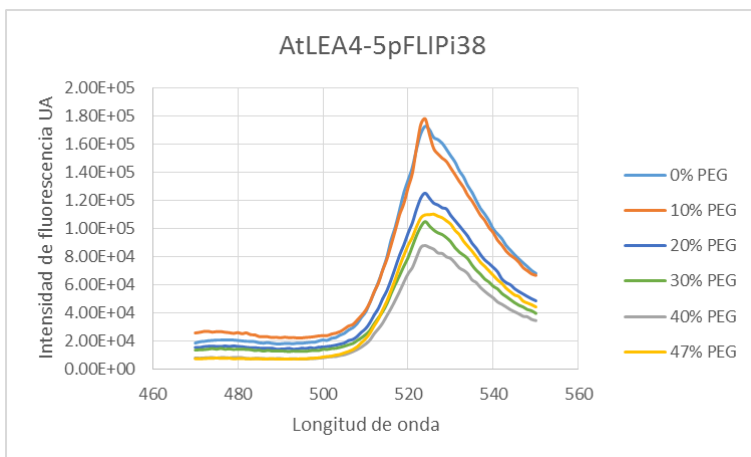
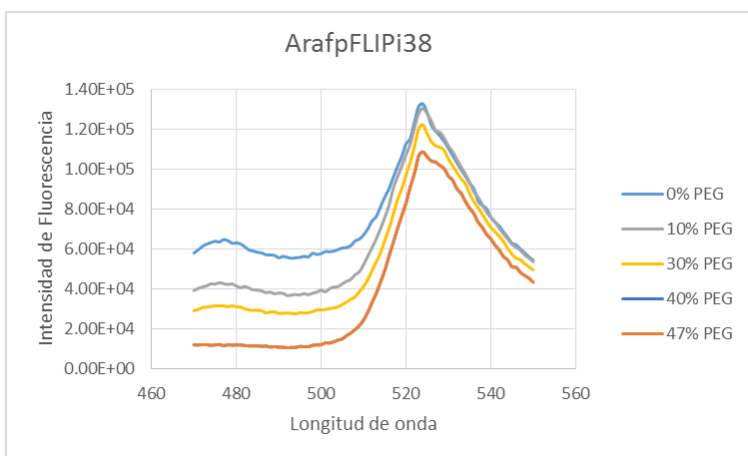


Figura K.15. Intensidad de fluorescencia ArafpFLIPi38 con PEG



ANEXO L. Controles del Sistema FRET para fluoróforo aceptor ante señal de estrés

Figura L.1 Control aceptor 4-2pFLIPi38 con TFE

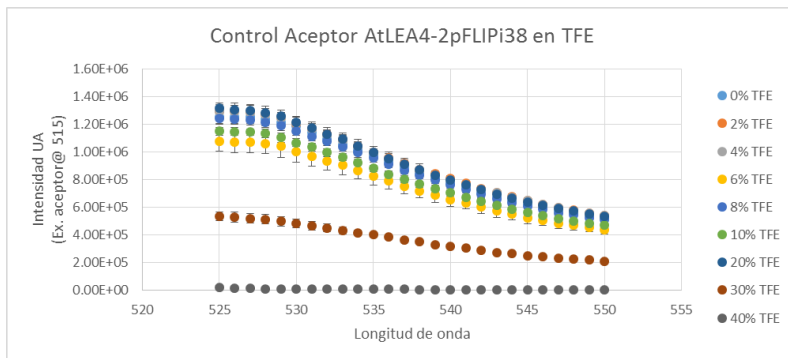


Figura L.2 Control aceptor 4-5pFLIPi38 con TFE

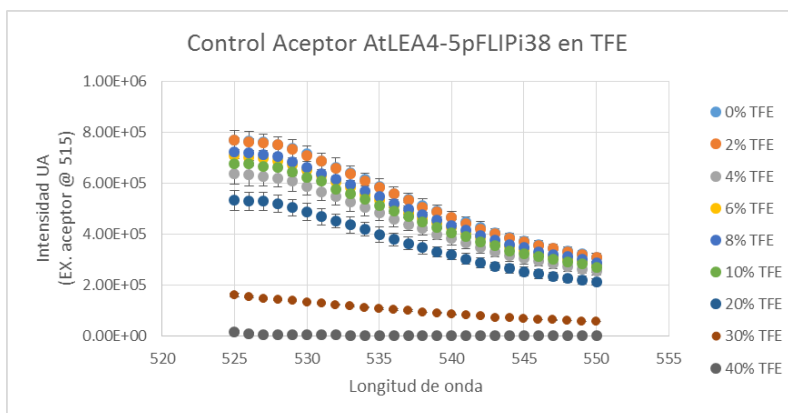


Figura L.3 Control aceptor Araf-pFLIPi38 con TFE

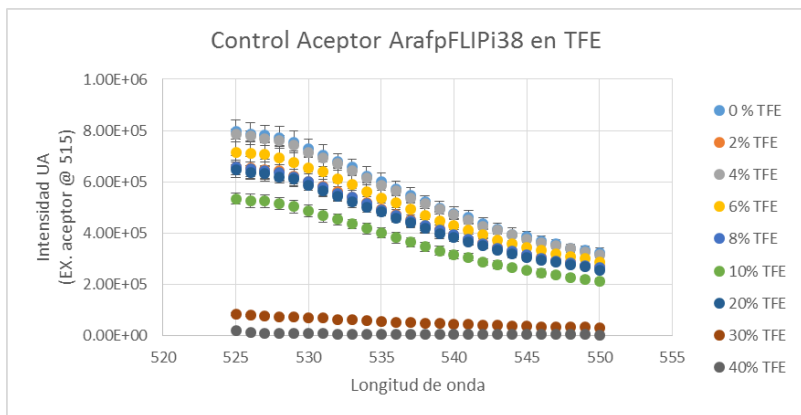


Figura L.4 Control Aceptor AtLEA4-2pFLIPi38 con Glicerol

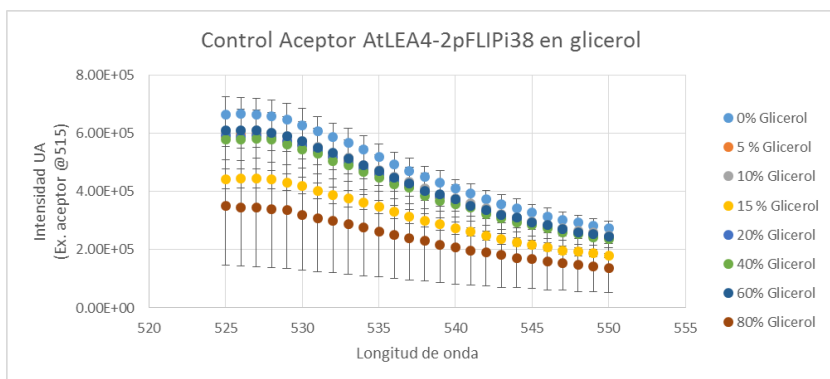


Figura L.5 Control Aceptor AtLEA4-5pFLIPi38 con Glicerol

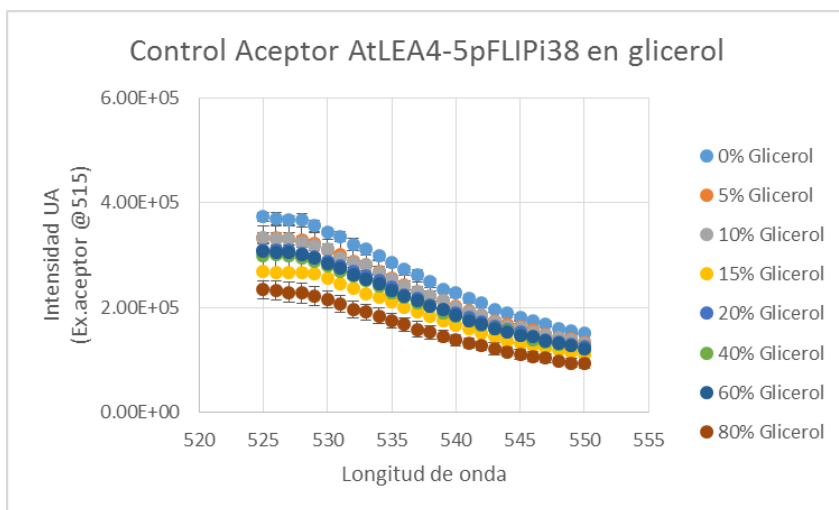


Figura L.6 Control Aceptor ArafpFLIPi38 con Glicerol

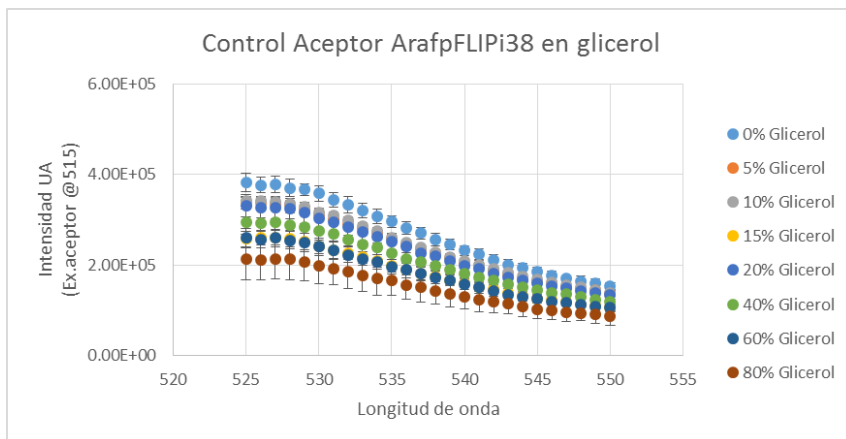


Figura L.7 Control Aceptor AtLEA4-2pFLIPi38 con Manitol

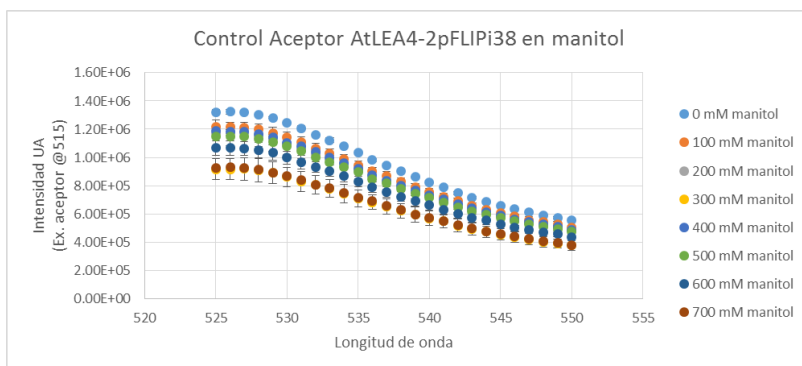


Figura L.8 Control Aceptor AtLEA4-5pFLIPi38 con Manitol

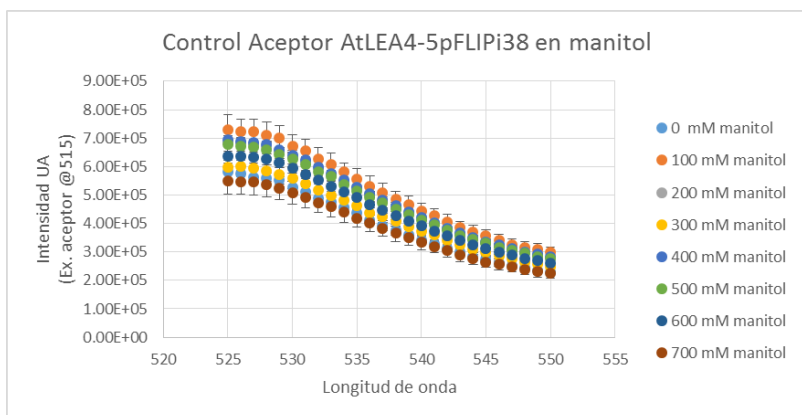


Figura L.9 Control Aceptor ArafpFLIPi38 con Manitol

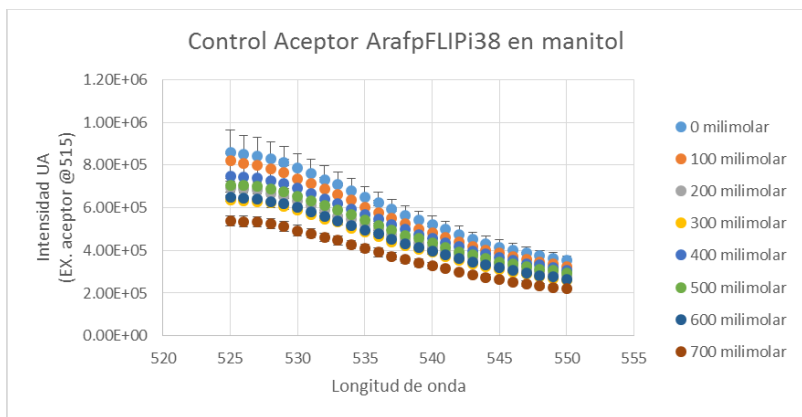


Figura L.10 Control Aceptor AtLEA4-2pFLIPi38 con KCl

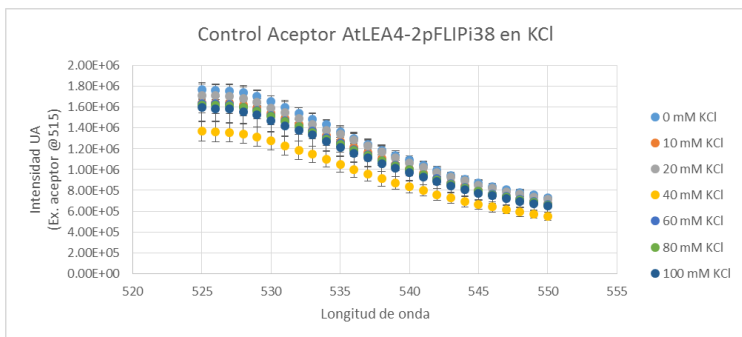


Figura L.11 Control Aceptor AtLEA4-5pFLIPi38 con KCl

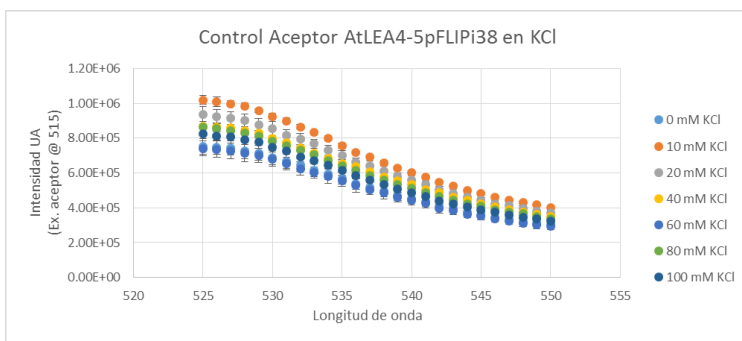


Figura L.12 Control Aceptor ArafpFLIPi38 con KCl

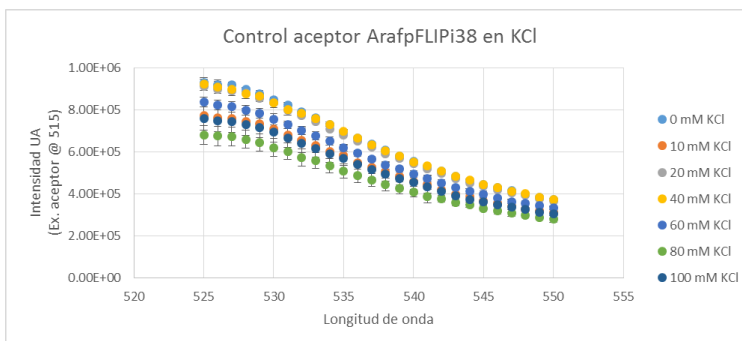


Figura L.13 Control Aceptor AtLEA4-2pFLIPi38 con PEG

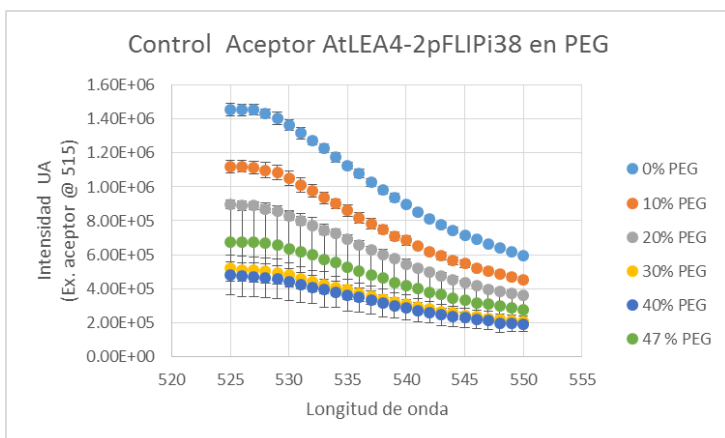


Figura L.14 Control Aceptor AtLEA4-5pFLIPi38 con PEG

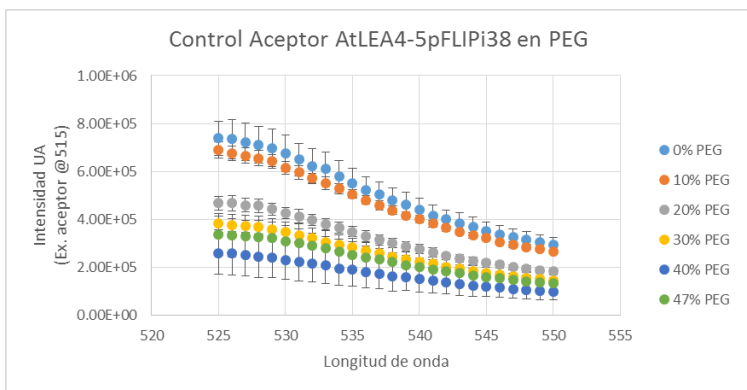


Figura L.15 Control Aceptor ArafpFLIPi38 con PEG

