

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA,  
A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Interacción Dehidrina-Dehidrina: el caso de la OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha*”**

Tesis que presenta

**Itzell Eurídice Hernández Sánchez**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de Tesis: Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

**Sinodales: Dr. Samuel Lara González**

**Dr. Roberto Sánchez Olea**

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2013



### Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **Interacción Dehidrina-Dehidrina: el caso de la dehidrina SK<sub>3</sub> de *Opuntia streptacantha*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Itzell Eurídice Hernández Sánchez y aprobada el **5 de Julio de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
(Director de tesis)

---

Dr. Samuel Lara González  
(Miembro del Comité Tutorial)

---

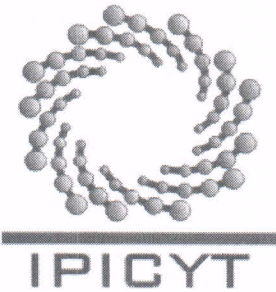
Dr. Roberto Sánchez Olea  
(Miembro del Comité Tutorial)



### **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (423770)



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 111 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Itzell Eurídice Hernández Sánchez**

sobre la Tesis intitulada:

***Interacción Dehidrina-Dehidrina: el caso de la dehidrina OpsDHN1 de Opuntia streptacantha***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de julio de 2013.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatoria**

**A mis padres**

## **Agradecimientos**

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su apoyo, consejos y paciencia sobre todo paciencia.

A todos mis compañeros del laboratorio 7.

A la M en C Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico.

A CONACYT por el apoyo otorgado.

## CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. RESULTADOS	3
2.1 Construcción de una versión de la OpsDHN1-SK <sub>21-199</sub> y su interacción con la versión completa de la OpsDHN1-SK <sub>31-248</sub> .	3
2.2 Una versión más corta de la proteína OpsDHN1-S <sub>1-97</sub> disminuye drásticamente la interacción con la OpsDHN1 en el sistema split ubiquitin de levadura.	4
2.3 Construcción de una versión de la OpsDHN1 sin la región rica en histidinas	6
2.4 Ensayos de interacción <i>in planta</i> mediante el sistema BiFC	7
III. DISCUSIÓN	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V. REFERENCIAS	23
VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO	27

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas generadas	13
Tabla 2. Oligonucleótidos para las construcciones del sistema split ubiquitin	16



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la OpsDHN1 de *O. streptacantha* y versiones generadas para el sistema split ubiquitin de levadura. 4
- Figura 2. Ensayo de dos híbridos con las versiones generadas de la proteína OpsDHN1. 7
- Figura 3. Vectores generados para el sistema BiFC 8

## RESUMEN

### Interacción Dehidrina-Dehidrina: el caso de la OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha*

Factores de estrés tales como la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas provocan un déficit hídrico en las plantas, limitando la productividad de los cultivos a nivel mundial. Para hacer frente a dichas condiciones las plantas han desarrollado mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que dirigen el ajuste osmótico induciendo sistemas de reparación, chaperonas y proteínas LEA. Las dehidrinas (DHNs) están involucradas en la resistencia al estrés abiótico en plantas, sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual ejercen sus funciones es desconocido. Recientemente, nosotros reportamos la caracterización bioinformática, molecular y funcional de una DHN ácida del tipo SK<sub>3</sub> (OpsDHN1) de nopal (*Opuntia streptacantha*). Demostramos que el gen *OpsDHN1* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico en *O. Streptacantha* y que la sobreexpresión de dicho gen confiere tolerancia a estrés por frío en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente, nuestro grupo encontró que la proteína OpsDHN1 puede interactuar consigo misma en el sistema split ubiquitin en levadura. En este trabajo se caracterizó la interacción OpsDHN1-OpsDHN1 utilizando el sistema dos híbridos split ubiquitin en levadura. Para ello construimos diversas versiones que excluyen regiones definidas de la proteína OpsDHN1 y analizamos si son importantes para la dimerización. Nuestros resultados muestran que la región entre los aminoácidos 97-248 de la OpsDHN1, que incluye los tres segmentos K y el sitio de unión a metales, son claves para la interacción OpsDHN1-OpsDHN1. Estos hallazgos contribuyen al entendimiento del mecanismo molecular de estas proteínas, en donde dicha interacción podría jugar un papel importante en su actividad como chaperona.

**Palabras clave:** Dehidrina, dímero, OpsDHN1, split ubiquitin, segmento K.

## ABSTRACT

### Dehydrin-Dehydrin interaction: the case of OpsDHN1 from *Opuntia streptacantha*

Stress factors such as drought, salinity, and low temperatures cause water deficit in plants, limiting worldwide crop production. Plants have evolved physiological, biochemical, and molecular mechanisms that induce osmotic adjustment, such as chaperones and LEA proteins. Dehydrins (DHNs) are involved in the resistance to abiotic stress in plants; however, the exact mechanism by which DHNS exerts their functions is unknown. Recently, we reported the bioinformatics, molecular, and functional characterization of an acidic SK<sub>3</sub> DHN isolated from *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1). We show that the *OpsDHN1* gene is involved in the response to abiotic stress and gene overexpression confers tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*. Subsequently, our research group found that OpsDHN1 protein could interact with itself in the yeast split ubiquitin system. In this study, we characterized the OpsDHN1-OpsDHN1 interaction using the two-hybrid system in yeast split ubiquitin. For this aim we generated several versions that exclude defined regions of the OpsDHN1 protein and analyze if these regions are important for dimerization. Our results show that the region between amino acids 97-248 of OpsDHN1, which includes three K-segments and the metal binding site are key to OpsDHN1-OpsDHN1 interaction. These outcomes contribute to understanding the molecular mechanism of these proteins, where this interaction may play an important role in chaperone activity.

**Keywords:** Dehydrin, dimer, OpsDHN1, split ubiquitin, K-segment

## I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEAs) son miembros de un gran grupo de proteínas hidrofílicas con alto contenido de glicina que se encuentran en plantas, algas, nematodos, hongos y bacterias (Battaglia et al. 2008). Las Dehidrinas (DHNs) pertenecen al grupo 2 de las proteínas LEAs, varias especies de plantas acumulan DHNs durante la embriogénesis y en respuestas al estrés abiótico. Las DHNs se localizan en varios compartimentos celulares, incluyendo citoplasma, membrana plasmática, núcleo y mitocondrias (Close 1997, 1996; Borovskii et al. 2002). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un segmento conservado conocido como K (Battaglia et al. 2008). El segmento K es una región consenso rica en lisina (EKKGIMDKIKEKLPG), la cual forma una posible  $\alpha$ -hélice anfipática (Close 1996, 1997; Allagulova et al. 2003; Kosová et al. 2010), se ha reportado que esta estructura permite interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas para estabilizar proteínas en ambientes de estrés hídrico (Dure 1993).

Otros dominios que aparecen frecuentemente en las secuencias de las DHNs son los segmentos S y Y. El segmento S está formado de 4 a 10 residuos de serina (LHRSGSSSSSSSEDD), la fosforilación de este dominio se ha relacionado con el transporte nuclear de las DHNs. El segmento Y (DEYGNP) está localizado cerca del extremo N-terminal y comparte cierta homología con una porción del sitio de unión a nucleótidos de chaperonas de plantas y bacterias (Close 1996, 1997; Allagulova et al. 2003; Shen et al. 2004). Las DHNs se dividen en las siguientes clases:  $SK_n$ ,  $Y_nSK_n$ ,  $Y_nK_n$ ,  $K_nS$ ; de acuerdo a la aparición, número y distribución de estos tres segmentos (Hara et al. 2013).

Las funciones precisas de cada subtipo de DHNs son todavía desconocidas. Sin embargo, se ha reportado en estudios *in vitro* que estas proteínas se unen a vesículas que contienen fosfolípidos ácidos a través de los segmentos K (Koag et al. 2009). Además, la actividad crioprotectora de las DHNs ha sido descrita para varias enzimas sensibles a congelación como la catalasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (Hara et al. 2001; Reyes et al. 2005). Por otra parte, se

ha reportado que las DHNs pueden actuar como chaperonas impidiendo la agregación de varias proteínas inducida por calor (Kovacs et al. 2008).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se caracterizó una DHN ácida del tipo SK<sub>3</sub> de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1). Demostramos que el gen *OpsDHN1* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico en *O. Streptacantha* y que la sobreexpresión de dicho gen confiere tolerancia a estrés por frío en plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo que sugiere que la OpsDHN1 participa en la respuesta de estrés por frío (Ochoa-Alfaro et al. 2012).

A pesar de la importancia de las DHNs en la respuesta al estrés en plantas, se desconoce el mecanismo exacto a través del cual ejercen su función. En este trabajo se analizó la interacción directa OpsDHN1-OpsDHN1, usando el sistema de dos híbridos split ubiquitin en levadura. Este sistema emplea la reconstitución de dos fracciones de la ubiquitina mediada por una interacción proteína-proteína (Möckli et al. 2007). Con la finalidad de conocer las regiones involucradas en la dimerización de la proteína OpsDHN1, se llevaron a cabo ensayos de interacción entre versiones que excluyen regiones definidas de la OpsDHN1 empleando el sistema dos híbridos split ubiquitin en levadura. Nuestros resultados sugieren que la región entre los residuos 97 a 248 es esencial para esta interacción. Finalmente, el posible mecanismo mediante el cual esta DHN puede ejercer sus funciones a través de su dimerización es discutido.

## II. RESULTADOS

### 2.1 Construcción de una versión de la OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> y su interacción con la versión completa de la OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub>.

La proteína OpsDHN1 de nopal es una DHN del tipo SK<sub>3</sub> de 248 aa que cuenta con un dominio putativo de localización nuclear y unión a metales (Fig. 1A) (Ochoa-Alfaro et al, 2012). Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que la OpsDHN1 interactúa consigo misma en el sistema split ubiquitin de levadura (Pérez-Morales 2012). Con la finalidad de analizar si una versión más corta de la DHN de nopal mantiene la interacción con la versión completa de la DHN tipo SK<sub>3</sub> (OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub>, Fig. 1B), se construyó una versión que no incluye el último dominio K de la OpsDHN1 (pDHB1-OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub>, Fig. 1C). Esta versión OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> (bait) se confrontó con la versión completa pPR3-N-OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub> (prey) en el sistema split ubiquitin en levadura. Inicialmente, nosotros evaluamos la funcionalidad de la construcción pDHB1-OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> usando los vectores control del sistema Nubl, NubG, pPR3-N (Möckli et al. 2007) (Fig. Suplementaria 1). Las colonias transformadas con ambos plásmidos fueron seleccionadas en medio semi-selectivo (SD-TL). La coloración roja es característica de ausencia de interacción debido a que el gen *ADE2* no es transcrito y un intermediario de esta vía de color rojo se acumula. Por otro lado, al haber interacción la ruta se restablece y el intermediario no se acumula, por lo cual se puede apreciar una coloración blanquecina en las colonias. Posteriormente las colonias transformantes fueron crecidas en medio totalmente selectivo (SD-LTHA) para el análisis de interacción DHN-DHN, ya que al haber una interacción, las rutas biosintéticas de la histidina y adenina son reconstituidas por lo cual es posible observar crecimiento en medio SD-LTHA suplementado con 3-AT y desarrollo de coloración en el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa. Nuestros datos indican que esta versión OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> fue capaz de mantener la interacción con la versión completa de la DHN (OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub>); sin embargo, la fuerza de la interacción disminuyó (Fig. 2), ya que cuando comparamos el crecimiento de la levadura que expresa las versiones completas de la OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub> en un

medio totalmente selectivo (SD-LTHA) con una concentración de 45 mM de 3-AT con la cepa que expresa la versión OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> y la versión OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub> se observó un decremento en el crecimiento celular. Esta disminución se puede notar en todas las diluciones de los goteos así como también en el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa. Estos resultados sugieren que el fragmento eliminado, que incluye el último segmento K de la OpsDHN1, no es indispensable para llevar a cabo la interacción DHN-DHN pero podría jugar un papel importante en la misma.

## **2.2 Una versión más corta de la proteína OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> disminuye drásticamente la interacción con la OpsDHN1 en el sistema split ubiquitin en levadura.**

El siguiente experimento que nos planteamos fue probar la interacción con una versión más corta de 97 aa, que solo incluye el segmento S de la OpsDHN1, careciendo de los tres segmentos K y de la región rica en histidinas (Fig. 1E). Esta construcción se realizó en el vector bait (pDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>), y se co-transformó con la versión completa de la OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub> (prey) en la cepa de levadura NMY51. El análisis de interacción DHN-DHN, así como también y la funcionalidad de la construcción PDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> se realizó usando los vectores control del sistema pPR3-N, NubG y Nubl (Fig. 2 y Fig. Suplementaria 2). Al analizar los resultados observamos una disminución drástica en el crecimiento de la cepa que expresa la versión corta y la versión completa de la OpsDHN1 a 45 mM de 3-AT (Fig. 2). Además, se puede observar una disminución en la coloración azul en el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa. Estos datos sugieren que la región eliminada en la versión corta de la OpsDHN1 podría ser importante para la interacción DHN-DHN de nopal.

En un ensayo paralelo, nosotros confrontamos esta versión corta OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> clonada ahora en el vector prey (pPR3-N-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>), con la OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> (bait), antes descrita que contiene dos segmentos K.



**Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de la OpsDHN1 de *O. streptacantha* y versiones generadas para el sistema split ubiquitin de levadura. A) Los motivos característicos presentes en una DHN fueron identificados en la proteína OpsDHN1 y se indican de la siguiente manera: el segmento S (recuadro), tres segmentos K (negro), una putativa señal de localización nuclear (gris) y un putativo sitio de unión de metales rico en residuos de histidina (subrayado y letra negrita). B) Versión completa de la OpsDHN1 tipo SK<sub>3</sub> (1-248 aa). C) Versión tipo SK<sub>2</sub> (1-199 aa) de la OpsDHN1, la longitud en aminoácidos se marca en A) con un triángulo blanco. D) Versión tipo SK<sub>3</sub> sin histidinas de la OpsDHN1. E) Versión corta (1-97 aa) de la OpSDHN1, la longitud en aminoácidos se marca en A) con un triángulo negro. Segmento S (gris oscuro), segmentos K (negro) y sitio putativo de unión a metales (gris claro).



Nuestros datos indican que las regiones eliminadas en la versión OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> y OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub> son claves para la formación del homodímero OpsDHN1-OpsDHN1 en el sistema split ubiquitin en levadura, ya que la interacción se ve totalmente abatida, al no haber crecimiento de esta cepa en el medio SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT, y no detectar coloración azul en el ensayo de la β-galactosidasa. Además, en el medio SD-TL se observa la clásica coloración roja que indica ausencia de interacción (Fig. 2). Analizando estos dos últimos ensayos de confrontación, podríamos sugerir como se mencionó anteriormente que la región eliminada en la versión corta (OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>) es clave para la interacción, pero también es importante la región eliminada que incluye el último segmento K en la segunda versión (OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub>), ya que la interacción entre ambas construcciones se pierde por completo.

Para confirmar los hallazgos anteriores, nos planteamos analizar la interacción entre dos versiones cortas, OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>. Nuestros datos indican que al perder estas regiones en ambas versiones de las DHNs se abate por completo el crecimiento de esta cepa en el medio SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT, y tampoco se observa la coloración azul característica del ensayo de la β-galactosidasa (Fig. 2); sin embargo, al crecerla en el medio SD-TL no se observó la coloración roja observada en el ensayo anterior.

### **2.3 Construcción de una versión de la OpsDHN1 sin la región rica en histidinas**

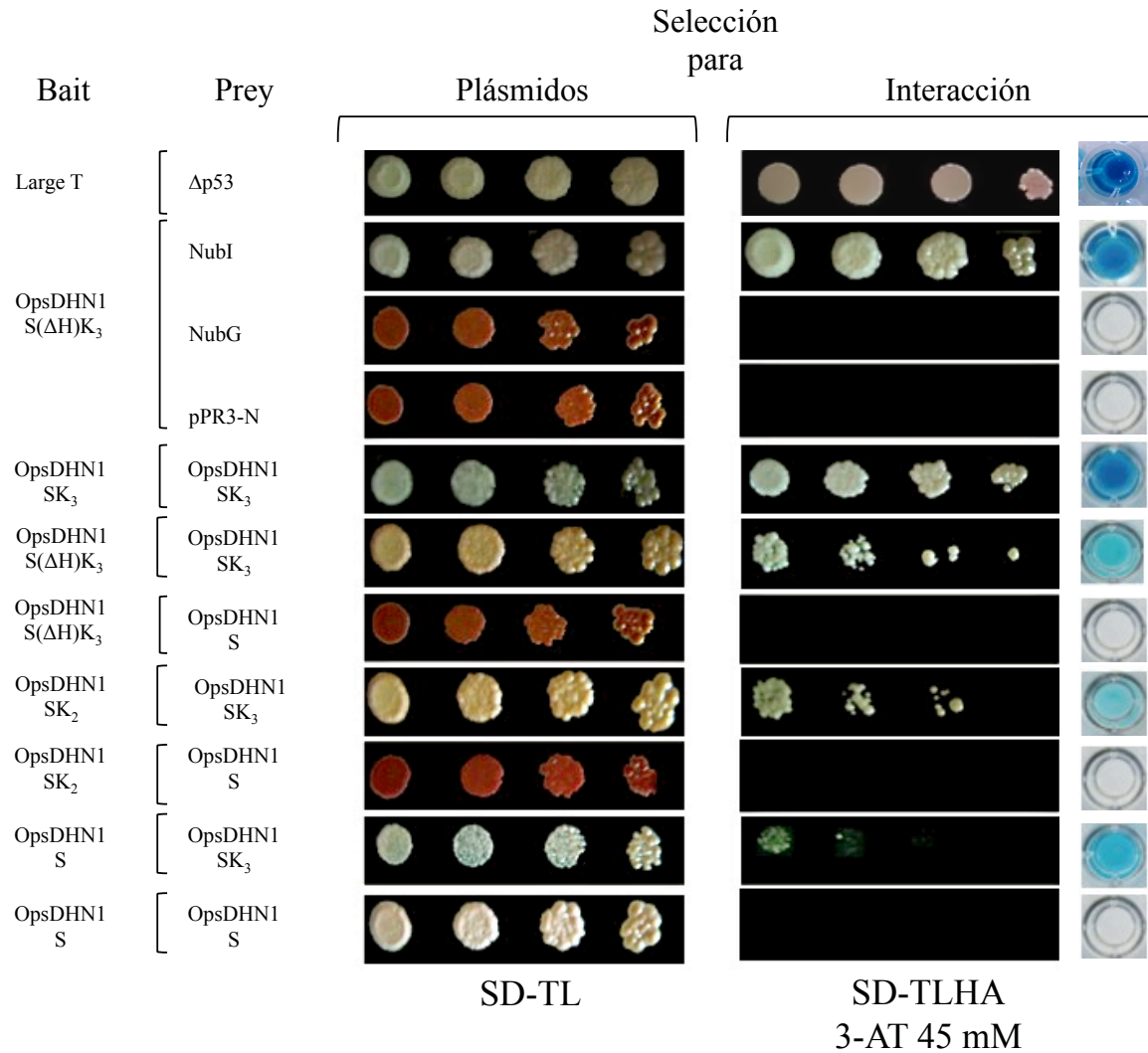
Estudios recientes han demostrado que algunas DHNs con regiones ricas en histidinas pueden interactuar entre ellas en presencia de algunos metales tales como: Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (Hara et al. 2005, 2013). Como ya se describió la OpsDHN1 tiene una región rica en histidinas que está ubicado dentro de un posible sitio de unión a metales (Fig. 1A), por lo que la interacción OpsDHN1-OpsDHN1 podría estar mediada por dicho sitio. Para comprobar esta hipótesis nosotros generamos una versión que carece del potencial sitio de unión a metales en el vector bait PDHB1-S(ΔH)K<sub>31-111:128-248</sub> (Fig. 1D). Esta versión OpsDHN1-S(ΔH)K<sub>31-111:128-248</sub> fue confrontada con la versión completa de la DHN OpsDHN1-

SK3<sub>1-248</sub> clonada en el vector prey. Los resultados indican que la versión OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3<sub>1-111:128-248</sub> fue capaz de mantener la interacción con la versión completa. Sin embargo, al comparar el crecimiento de esta cepa, con la cepa que expresa las versiones completas de la OpsDHN1 en medio SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT se observa una disminución en el crecimiento. Aunado a lo anterior, cuando esta construcción fue confrontada con la construcción pPR3-N-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> observamos una pérdida total de la interacción en medio SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT, al no presentar desarrollo de coloración azul en el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa y en medio SD-TL se detectó desarrollo de coloración roja (Fig. 2). Estos resultados sugieren que la región rica en histidinas podría jugar un papel clave en la interacción OpsDHN1-OpsDHN1, si comparamos la interacción de esta versión sin histidinas y la versión corta (OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>), con la interacción de la versión completa (OpsDHN1-SK3<sub>1-248</sub>) y versión corta, en donde aún hay un poco de crecimiento (Fig. 2).

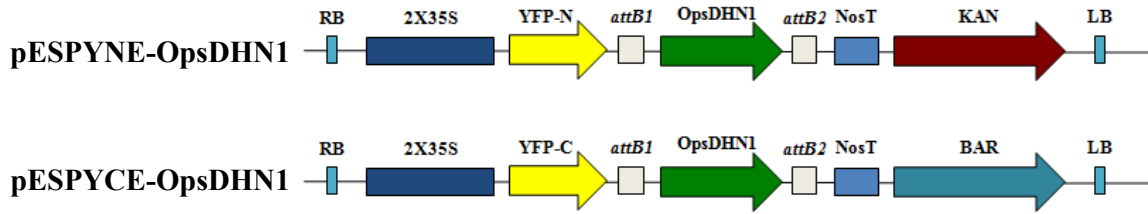
#### **2.4 Ensayos de interacción *in planta* mediante el sistema BiFC**

Para validar la interacción OpsDHN1-OpsDHN1 *in planta*, se empleará el sistema BiFC, el cual consiste en la reconstitución de la proteína fluorescente YFP mediante la interacción directa entre dos proteínas blanco fusionadas a los fragmentos N y C-terminal de la YFP (Walter et al. 2004). Para llevar a cabo este sistema se generaron dos vectores conteniendo el ORF completo del gen OpsDHN1 de nopal. El primer vector (pESPYNE) cuenta con la porción N-terminal de la proteína YFP (1-155 aa) y el segundo vector (pESPYCE) cuenta con el fragmento C-terminal (156-241 aa), en ambos plásmidos las porciones de YFP se localizan hacia el extremo 5' del ORF de la OpsDHN1. Estos vectores fueron nombrados pESPYNE-OpsDHN1 y pESPYCE-OpsDHN1, respectivamente (Fig. 3).

Las interacciones OpsDHN1-OpsDHN1 se realizaran en un sistema de expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* y en un sistema estable generando líneas transgénicas de *A. thaliana*



**Figura 2.** Ensayo de dos híbridos con las versiones generadas de la proteína OpsDHN1. La construcción pDHB1-*OpsDHN1-S(ΔH)K<sub>3</sub>*<sub>1-111:128-248</sub> fue co-transformada en la cepa NMY51 con los vectores control del sistema split ubiquitin: pPR3-N (vector vacío), NubG (negativo), Nubl (positivo), pPR3-N-*OpsDHN1-SK<sub>3</sub>*<sub>1-248</sub> y con la construcción pPR3-N-*OpsDHN1-S*<sub>1-97</sub>. De la misma manera la construcción pDHB1-*OpsDHN1SK<sub>2</sub>*<sub>1-199</sub> fue co-transformada con los vectores pPR3-N-*OpsDHN1-SK<sub>3</sub>*<sub>1-248</sub> y pPR3-N-*OpsDHN1-S*<sub>1-97</sub>. La construcción pDHB1-*OpsDHN1-S*<sub>1-97</sub> fue co-transformada con la construcción pPR3-N-*OpsDHN1-S*<sub>1-97</sub>. Como control de la interacción la retransformación de los vectores PDHB1-*OpsDHN1-SK<sub>3</sub>*-pPR3-N-*OpsDHN1-SK<sub>3</sub>* fue incluida. Las levaduras transformantes fueron seleccionadas en medio SD-TL. La interacción se evaluó en medio totalmente selectivo SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT mediante goteos, la coloración roja es característica de ausencia de interacción y puede ser observado en medio semi-selectivo SD-TL. Las interacciones positivas fueron determinadas mediante ensayos de la actividad de la β-galactosidasa (panel derecho). Las fotografías se tomaron 1 h posterior al inicio del ensayo.



**Figura 3.** Vectores generados para el sistema BiFC. Los fragmentos no fluorescentes de la YFP están fusionados en el N-terminal de ambas construcciones y se encuentran bajo el control del promotor 2X35S y el terminador NosT, cada vector cuentan con un marcador de selección en planta kanamicina o basta respectivamente. Los vectores pESPYNE y pESPYCE llevan clonados el ORF completo de la OpsDHN1 el gen fue introducido mediante recombinación sitio especifica usando los bordes *attL1* y *attL2*.

### III. DISCUSIÓN

A pesar de los avances hacia la comprensión del papel de las DHNs, los mecanismos moleculares mediante los cuales ejercen sus funciones siguen siendo desconocidos. Diversos estudios señalan que estos genes son inducidos en tejidos vegetativos bajo factores de estrés que causan la deshidratación celular, tales como la sequía, el frío y la salinidad (Allagulova et al. 2003). Experimentos de ganancia de función demuestran que la sobreexpresión de genes que codifican para DHNs en plantas incrementan la tolerancia al estrés abiótico. (Xu et al. 1996, 2008; Hara et al. 2003; Yin et al. 2006; Peng et al. 2008; Ochoa-Alfaro et al. 2012).

En los últimos años el aumento en la información referente a las DHNs coloca a estas proteínas como un grupo increíblemente versátil, exhibiendo diversas funciones como proteínas crioprotectoras, chaperonas, antioxidantes, secuestradores de iones y anticongelantes; esto debido probablemente por una parte a su característica principal de ser proteínas con largos segmentos desordenados (Hanin et al. 2011). Las regiones desordenadas de estas proteínas son segmentos muy flexibles que carecen de estructura secundaria en condiciones fisiológicas; debido a su plasticidad estructural estos segmentos están implicados en múltiples interacciones (Uversky 2002). La falta de estructura en las proteínas proporciona diversas ventajas, tales como: un aumento de la superficie de interacción, flexibilidad conformacional para interactuar con proteínas blanco, accesibilidad a sitios de modificaciones posttraduccionales y disponibilidad de interacción de motivos (Gsponer et al. 2008). Estas características concuerdan con muchas de las funciones adjudicadas al grupo de las DHNs (Allagulova et al. 2003).

Recientemente, nosotros reportamos la caracterización bioinformática, molecular y funcional de una DHN del tipo SK<sub>3</sub> (OpsDHN1) de nopal (*O. streptacantha*) (Ochoa-Alfaro et al. 2012; Jiménez-Bremont et al. 2012). En estos estudios nosotros analizamos el intrón presente en el gen *OpsDHN1*, el cual está ubicado en el segmento S, una característica que presentan la mayoría de las DHNs.

Además observamos que el gen *OpsDHN1* se induce transcripcionalmente en respuesta diversos tipos de estrés abiótico en nopal, principalmente por frío. También, generamos plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el gen *OpsDHN1* tolerantes a congelamiento.

En este estudio nos enfocamos a la caracterización detallada de posibles regiones implicadas en la interacción OpsDHN1-OpsDHN1. Como antecedente, nuestro grupo encontró que la proteína OpsDHN1 puede interactuar consigo misma en el sistema split ubiquitin en levadura (Pérez-Morales 2012). Para estudiar esta interacción, nos dimos a la tarea de realizar diversas versiones que excluyen regiones conservadas de la proteína OpsDHN1, para luego ser expresadas en el sistema split ubiquitin. Los resultados obtenidos apuntan a que los segmentos K juegan un papel importante en dicha interacción. Esta hipótesis está sustentada con las siguientes observaciones: i) la delección de una región que incluye el último segmento K en una de las DHNs (OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub>) disminuye la fuerza de interacción del dímero OpsDHN1; ii) al eliminar una región de una de las DHNs que incluye los tres segmentos K disminuye fuertemente la interacción del dímero OpsDHN1; iii) al eliminar un segmento K en una de las DHNs (OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub>) y los tres segmentos K y la región rica en histidinas en la otra unidad del dímero OpsDHN1-OpsDHN1 la interacción se abate. Estos resultados refuerzan que la dehidrina OpsDHN1 de nopal puede interactuar consigo misma, y además, proporcionan una evidencia de que los segmentos K podrían participar en dicha interacción.

Se ha sugerido que los segmentos K podrían formar una estructura tipo  $\alpha$ -hélice, en donde los aminoácidos ácidos (D y E) se encuentran en un lado de la hélice, mientras los aminoácidos hidrófobicos (I y L) se encuentran en el lado opuesto de la hélice y los aminoácidos con carga positiva (K y R) se encuentran en la interface polar no-polar, confiriéndole un carácter anfipático (Hanin 2011). Dure (1993), propone que los parches hidrofóbicos que se encuentran en las  $\alpha$ -hélice de proteínas de otro grupo de las LEAs (grupo 3) son los responsables de la dimerización de estas proteínas. Además se ha reportado que los segmentos K

participan en la actividad crioprotectora de las DHNs ERD10 y RcDhn5, debido a que cuando sus segmentos K son removidos se pierde la estructura anfipática que forman los segmentos K (Reyes et al. 2008).

A la fecha existen algunos reportes sobre la formación de dímeros o multímeros en DHNs. Kazouka y Oeda (1994), reportaron la formación de un complejo tetramérico formado por cuatro monómeros de la DHN COR85 de espinaca. En un estudio reciente Lin et al. (2012), reportaron la dimerización de la DHN VrDhn1 tipo Y<sub>2</sub>K de *Vigna radiata*. De la misma manera, Rahman et al. (2012) demostraron que la DHN TsDHN-2 del tipo Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub> de *Thellungiella salsuginea* tiene un estado potencial de dimerización cuando se encuentra asociada a superficies hidrofóbicas.

Nuestro siguiente paso fue analizar la confrontación entre las construcciones pDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> y pPR3-N-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>, las cuales carecen de los segmentos K, observamos que al carecer de estos segmentos la interacción se pierde por completo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en la confrontación entre una versión corta de la DHN (OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>) con una versión completa (OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub>) la interacción disminuye drásticamente sin perderse por completo. Lo anterior sugiere, que en la versión corta (que contiene el segmento S) pueden existir regiones que podrían mantener una interacción débil con la versión completa de la OpsDHN1. Ochoa et al. (2012) reportaron que la dehidrina OpsDHN1 contiene una posible señal de localización nuclear (KKRRKKEKK). Realini et al. (1995), observaron que el motivo de poli-lisinas KKKKKKEKKK es común en las DHNs y que este segmento funciona como un dominio de interacción específico con proteínas que contienen el mismo dominio este dato sugiere que estos segmentos podrían ser parte importante de la interacción junto con los segmentos K y/o la región de unión a metales

Con todo lo anterior, nuestro siguiente reto fue el de generar una versión de la proteína OpsDHN1 sin la región rica en histidinas. Cuando confrontamos a esta construcción pDHB1-OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K<sub>31-111:128-248</sub> con la versión completa OpsDHN1-SK<sub>31-248</sub> observamos que la interacción no disminuye de manera

significativa, a diferencia de una pérdida total de la interacción observada en la confrontación de esta versión (OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3<sub>1-111:128-248</sub>) con la construcción pPR3-N-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>.

Para explicar lo anterior, el primer caso la interacción OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3<sub>1-111:128-248</sub> con la versión completa OpsDHN1SK3<sub>1-248</sub> podría mantenerse mediante los segmentos K de ambas dehidrasas y el segmento de unión a metales rico en histidinas de la versión completa de la OpsDHN1. En el segundo caso (OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3<sub>1-111:128-248</sub> con la versión corta OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> la interacción se ve abatida debido a la ausencia de los segmentos de unión a metales ricos en histidina en ambas proteínas y a la carencia de los segmentos K en una de las DHNs. Los residuos de histidinas son poco comunes en las proteínas (< 2%) (Ueda et al. 2003). Sin embargo, las DHNs contienen una alta proporción de este aminoácido, el contenido de histidinas en la DHNs de *A. thaliana* es de 3.2 a 13.5% (Hara et al. 2005), la OpsDHN1 contiene 7.7% de histidinas (Tabla Suplementaria 1). Se sabe que los residuos de histidina pueden formar complejos con iones metálicos y que patrones de disposición como His-X3-His y His-His exhiben una gran afinidad de unión a metales. La unión a metales es una función común que se encuentra no solo en las DHNs ácidas sino que también en las DHNs neutras y básicas (Hara 2010). En concordancia con lo anterior, se reportó que la DHN CuCOR15 de *Citrus unshiu* se une a varios metales mediante una secuencia rica en histidinas similar a la de la OpsDHN1, con un patrón de disposición His-X3-His (Hara et al. 2005). Así mismo la DHN AtHIRD11 de *A. thaliana*, la cual contiene una región rica histidinas forma homo-multímeros en presencia de metales, como Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (Hara et al. 2005, 2013). Se ha reportado que algunas DHNs de *A. thaliana* como Rab18, ERD10, Xero2 y Cor47 pueden ser purificadas por columnas queladoras de metales. De la misma manera Greather (comunicación personal) sugiere que la proteína OpsDHN1 puede ser purificadas mediante columnas de Ni<sup>2+</sup>. Posiblemente el segmento de histidinas presente en la OpsDHN1 sea un blanco para la unión a metales que contribuya a la interacción DHN-DHN.



En conclusión nuestros resultados apuntan a que los segmentos Ks y el sitio de unión a metales que contiene una región rica en histidinas (His<sub>6</sub>) son claves para la interacción de la dehidrina OpsDHN1 de nopal consigo misma. Los motivos ricos en lisina son cruciales para la interacción entre las DHNs y sus blancos, debido a que estos motivos ricos en lisina y los sitio de unión a metales están separados físicamente en las DHNs, estas proteínas podrían quelar iones metálicos y mantenerlos en aislamiento en sitios específicos dentro de la célula (Soulages et al. 2003). Estos hallazgos podrían contribuir al mecanismo molecular de estas proteínas tipo chaperonas, en donde la interacción entre ellas mismas podría jugar un papel importante en la formación de estructuras en situaciones de estrés para proteger a sus proteínas “blanco”. Conocer la función de los dominios de las DHNs, podría ayudar a establecer el mecanismo por el cual ejercen sus funciones a partir de la composición de sus dominios. La generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* con las versiones generadas del gen *OpsDHN1* ayudará a establecer la función de estos dominios *in planta*.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Cepas, plásmidos y medios utilizados**

Células de *Escherichia coli* Top 10 F (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fueron transformadas con las construcciones del gen *OpsDHN1*.

Todas las construcciones fueron expresadas en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* NMY51. Los vectores utilizados en el trabajo fueron pDHB1 (bait), pPR3-N (prey), pDHB1-large T, pDSL-Dp53, pAI-Alg5 (NubI) y pDL2-Alg5 (NubG) (Dualsystems Biotech, AG, Schlieren, Suecia) (Tabla 1).

Para la selección de las cepas co-transformadas con los plásmidos bait y prey se utilizó un medio semi-selectivo SD-LT que contiene los aminoácidos histidina (H) y adenina (A) y carece de leucina (L) y triptófano (T). Para evaluar la interacción proteína-proteína se usó el medio totalmente selectivo SD-LTHA que carece de L, T, H y A. La histidina y la adenina son usados como marcadores auxotróficos en la interacción. La ausencia de interacción no restablecerá las rutas biosintéticas de la histidina y la adenina, por tanto serán incapaces de crecer en este medio, ej. pPR3-N (vector vacío) y NubG (control negativo del sistema).

### **4.2 Construcciones para el sistema split ubiquitin**

Las construcciones generadas del gen *OpsDHN1* son detalladas en la Figura 1. Las construcciones fueron verificadas por secuenciación. La correcta funcionalidad de las construcciones en el vector bait se realizó empleando los vectores prey pAI-Alg5 (NubI) y pDL2-Alg5 (NubG) (Fig. Suplementaria 1 y 2) (DualsystemsBiotech). NubI corresponde a la porción silvestre N-terminal de la ubiquitina, mientras que NubG corresponde a la porción mutada.

**Tabla 1.** Cepas generadas

Genotipo	Construcción	Auxotrofia	Nombre de la cepa
NMY51 ( <i>MATa his3Δ200</i> <i>trp1-901 leu2-</i> <i>3,112 ade2</i> <i>LYS2::(lexAop)<sub>4</sub>-</i> <i>HIS3</i> <i>ura3::(lexAop)8-</i> <i>lacZ</i> <i>ade2::(lexAop)8-</i> <i>ADE2 GAL4</i> )	pDHB1-OpsDHN1-SK3 <sub>1-248</sub>	<i>LEU2</i>	B-OpsDHN1-SK3
	pDHB1-OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3 <sub>1-111:128-</sub> 248	<i>LEU2</i>	B-OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3
	pDHB1-OpsDHN1-SK2 <sub>1-199</sub>	<i>LEU2</i>	B-OpsDHN1-SK2
	pDHB1-OpsDHN1-S <sub>1-97</sub>	<i>LEU2</i>	B-OpsDHN1-S
	pPR3-N-OpsDHN1-SK3 <sub>1-248</sub>	<i>TRP1</i>	P-OpsDHN1-SK <sub>3</sub>
	pPR3-N-OpsDHN1-S <sub>1-97</sub>	<i>TRP1</i>	P-OpsDHN1-S

Para determinar los segmentos implicados en la interacción DHN-DHN, se generaron cuatro versiones derivadas del ORF de la *OpsDHN1* donde se eliminaron estratégicamente posibles regiones responsables de la interacción *OpsDHN-OpsDHN1*, tres de estas versiones fueron clonadas en el vector bait y una en el vector prey.

La interacción *OpsDHN1-OpsDHN1* fue observada con la confrontación de los vectores *pDHNB1-OpsDHN1-SK<sub>31-249</sub>* y *pPR3-N-OpsDHN1-SK<sub>31-249</sub>* (Pérez-Morales 2012). Estas construcciones fueron utilizadas como un control de interacción.

A continuación se describen las construcciones utilizadas en este trabajo:

- ***pDHB1-OpsDHN1-SK<sub>31-249</sub>* y *pPR3-N-OpsDHN1-SK<sub>31-249</sub>***

El ORF completo del gen *OpsDHN1* fue amplificado mediante PCR y clonado en los vectores bait y prey (Pérez-Morales 2012).

- ***pDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>***

Mediante PCR se amplificó un fragmento de las primeras 291 pb del gen de la *OpsDHN1*, el cual codifica para una proteína de 97 aa que contiene el segmento S y una posible señal de localización nuclear. Esta versión también fue clonada en el vector *pPR3-N*.

- ***pDHB1-OpsDHN1-SK<sub>21-199</sub>***

Un fragmento de 597 pb fue amplificado por PCR, este codifica para una proteína de 199 aa que contiene el segmento S y dos segmentos K.

- **pDHB1-OpsDHN1-S( $\Delta$ H)K3<sub>1-111:128-249</sub>**

En esta construcción eliminamos la región rica en histidinas, la cual se encuentra en medio de la proteína OpsDHN1. Mediante PCR la secuencia del gen *OpsDHN1* fue amplificada hasta el nucleótido 333. De la misma manera fue amplificada la secuencia de 333 nucleótidos que corresponden al extremo 3' de dicho gen. Con el fin de fusionar ambos fragmentos sitios de restricción *KpnI* fueron introducidos en la secuencia de los oligonucleótidos. Después de la amplificación por PCR, ambos productos fueron digeridos con la enzima *KpnI* (Invitrogen) generando extremos cohesivos, los cuales posteriormente fueron ligados usando la DNA ligasa T4 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta versión sin histidinas cuenta de 672 pb que codifican para una proteína de 224 aminoácidos que contiene el segmento S y los tres segmentos K.

Los oligonucleótidos utilizados para generar las diferentes versiones del gen *OpsDHN1* se enlistan en la Tabla 2.

Las versiones fueron amplificadas por PCR de alta fidelidad (Pfu, Thermo scientific, San Jose, CA, USA) y purificadas utilizando el kit Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor; posteriormente digeridos con la enzima *SfiI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) y clonados en fase con el dominio C-terminal de la ubiquitina (Cub) seguido por el factor de transcripción LexA-VP16 en el vector bait. En el caso de las construcciones prey pPR3-N los fragmentos fueron fusionados al N-terminal de la ubiquitina (Nub-G).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos para las construcciones del sistema split ubiquitin

Vector de clonación	Construcción	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño(aa)
pDHB1	OpsDHN1-SK <sub>3</sub>	<b>1.BOpsDHN1-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>2.BOpsDHN1-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAAGTTGATGAAGGG GGTTGAT	248
<sup>o</sup> pDHB1	OpsDHN1-S	<b>1.BOpsDHN1-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>4.BOpsDHN1-S-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCAATTTCTTCTCCTTCTT CCTCC	97
pDHB1	OpsDHN1-SK2	<b>1.BOpsDHN1-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>5.BOpsDhn1SK2-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTGGGACCACCTCGTG	199
pDHB1	OpsDHN1-S(ΔH)K <sub>3</sub>	<b>1.BOpsDHN1-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>6.OpsDhn1ΔHis-R</b> GGGGTACCTGGAAGTTTCTCCTTAATCTTC <b>7.BOpsDhn1ΔHis-F</b> GGGGTACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCAC	222
pPR3-N	OpsDHN1-SK <sub>3</sub>	<b>2.BOpsDhn1-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAAGTTGATGAAGGG GGTTGAT <b>1.BOpsDhn1-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>8.POpsDhn1-SK<sub>3</sub>-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTAAGTTGATGAAGGG GGTTGAT	247
pPR3-N	OpsDHN1-S	<b>1.BOpsDhn1-SK<sub>3</sub>-F</b> ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCGGAAGAACACC AAAA <b>9.POpsDhn1-S-R</b> AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTTATTCTTCTCCTTCT TCCTCC	97

### **4.3 Transformación de *S. cerevisiae***

La cepa reportera de *S. cerevisiae* NMY51 (Dualsystems Biotech) fue co-transformada con los vectores bait y prey (Tabla 2) empleando el método de acetato de litio (Gietz y Woods 2002). Las colonias transformantes fueron seleccionadas empleando la auxotrofia correspondiente para cada uno de los vectores, por lo que se crecieron en placas con medio mínimo sin leucina y triptófano durante 3 días a 28°C.

### **4.4 Ensayo control para verificar la expresión correcta de la proteína OpsDHN1 en levadura**

La levadura NMY51 fue crecida en medio rico durante 12 h a 28°C, con agitación constante hasta que alcanzaron una OD<sub>600</sub> de 0.6-0.8. Posteriormente, 1.5 µg de cada construcción en el vector bait, pAI-Alg5 y pDL2-Alg5 (prey) fueron co-transformados en la levadura NMY51 siguiendo las instrucciones del proveedor (DUALhunter kit, DualsystemsBiotech). Simultáneamente, fueron generadas cepas transgénicas de NMY51 con los plásmidos control pDHB1-largeT (bait), pAI-Alg5 y pDL2-Alg5 (prey). Las cepas transformadas fueron evaluadas en medio SD-LT (medio semi-selectivo) y medio SD-LTHA (medio totalmente selectivo) a 28°C durante 3 días.

### **4.5 Determinación de la concentración del inhibidor 3-aminotriazol (3-AT)**

Células de levadura de la cepa B-OpsDHN1-SK<sub>3</sub> (Tabla 1) fueron transformadas con 1.5 µg del vector pPR3-N (vector sin inserto de la biblioteca que expresa NubG) y crecidas en placas que contenían diferentes concentraciones (35, 45 y 55 mM) del inhibidor 3-AT (un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3). La concentración óptima de 3-AT para eliminar falsos positivos fue de 45 mM (Pérez-Morales 2012). Las placas se incubaron durante 4 días a 28°C, al término de los cuales se evaluó el crecimiento de las levaduras.

#### **4.6 Ensayos de goteo**

Se picaron las cepas de levadura a analizar y se pusieron a crecer en medio líquido SD-LT a 28°C durante toda la noche. Las concentraciones de los cultivos fueron ajustadas a una OD<sub>600</sub> de 1.0 y se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 veces. Cinco µl de cada muestra fueron sembrados en placas con medio SD-T y SD-LTHA con o sin 45 mM del inhibidor 3-AT e incubadas a 28°C durante 2-3 días.

#### **4.7 Análisis de la actividad de β-galactosidasa**

La actividad de la enzima β-galactosidasa fue analizada cualitativamente mediante el ensayo de pastilla X-gal (Mockli y Auerbach 2004). Cepas de levadura que expresan las diferentes versiones de la *OpsDHN1* (Tabla 1) fueron seleccionadas e inoculadas en 5 ml de medio SD-LT. Los cultivos se dejaron crecer durante toda la noche hasta que alcanzaron una OD<sub>600</sub> de 1.0. Posteriormente se centrifugó un ml de cada cultivo a 3000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y se llevó a cabo la lisis celular mediante dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (3 min en nitrógeno líquido y después 3 min a 37°C). Por último, las pastillas fueron resuspendidas en 20 µl de agua destilada, transferidas a una placa de 96 pozos y mezcladas con 100 µl de buffer PBS pH7.4 que contenía 500 µg/ml de X-gal, 0.5% (w/v) de agarosa y 0.05% (v/v) de β-mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y la actividad de la enzima fue monitoreada visualizando el desarrollo de coloración azul y tomando fotografías a distintos tiempos (0, 15, 30 min, 1, 2, 4 h).

#### **4.8 Construcción de los plásmidos para el sistema BiFC**

El marco de lectura abierto del gen *OpsDHN1* fue amplificado por PCR y clonado en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), este producto fue subclonado en los vectores pEspyce y pEspyne por recombinación sitio específica usando la enzima



LR Clonasa II (Sistema Gateway; Invitrogen). Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: OpsDHN1FBiFC (5'ATGGCGGAAGAACACCAAAAAG3') y OpsDHN1RBiFC (5'TTAAGTTGATGAAGGGGGTTGATC3').

## V. REFERENCIAS

Allagulova ChR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Mosc)* 68:945-951

Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148:6-24

Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol* 2:5

Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Planta* 97:795-803

Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Planta* 100:291-296

Dure L (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* 3:363-369

Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by the liac/ss carrier dna/peg method. *Methods in Enzymology* 350:87-96

Gsponer J, Futschik ME, Teichmann SA, Babu MM (2008) Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* 322(5906):1365-68

Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav* 6(10):1503-1509

Hara M (2010) The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signal Behav* 5(5):503-508.

Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J Exp Bot* 56(420):2695-2703

Hara M, Kondo M, Kato T (2013) A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *J Exp Bot* 64(6):1615-24

Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 17:290-298

Hara M, Terashima S, Kuboi T (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. *J Plant Physiol* 158(10):1333-1339

Jiménez-Bremont JF, Maruri-López I, Ochoa-Alfaro AE, Delgado-Sánchez P, Bravo J, Rodríguez-Kessler M (2012) LEA Gene Introns: is the Intron of Dehydrin Genes a Characteristic of the Serine-Segment?. *Plant Mol Biol Rep* 31:128-140

Kazokoa T, Oeda K (1994) Purification and characterization of COR85 oligomeric complex from cold acclimated spinach. *Plant Cell Physiol* 35(4):601-611

Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009) The K-Segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol* 150:503-1514

Kosová K, Prášil I, Vítámvás P (2010) Role of dehydrins in plant stress response. In: Pessaraki M (ed) *Handbook of plant and crop stress. Books in soils, plants, and the environment*, 3rd edn. CRC, Florida, pp 239-285

Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* 147:381-390

Lin CH, Peng PH, Ko CH, Markhart AH, Lin TY (2012) Characterization of a Novel Y2K-type Dehydrin VrDhn1 from *Vigna radiata*. *Plant Cell Physiol* 53(5):930-942

Mockli N y D.Auerbach (2004) Quantitative  $\beta$ -galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *BioTechniques* 36:872-876

Möckli N, Deplazes A, Hassa PO, Zhang Z, Peter M, Hottiger MO, Stagljar I, Auerbach D (2007) Yeast split-ubiquitin-based cytosolic screening system to detect interactions between transcriptionally active proteins. *BioTechniques* 42(6):725-730

Ochoa-Alfaro A, Rodríguez-Kessler M, Pérez-Morales M, Delgado-Sánchez P, Cuevas-Velazquez C, Gómez-Anduro G, Jiménez-Bremont J (2012) Functional characterization of an acidic SK<sub>3</sub> dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta* 235(3):565-578

Peng Y, Reyes JL, Wei H, Yang Y, Karlson D, Covarrubias AA, Krebs SL, Fessehaie A, Arora R (2008) RcDhn5, a cold acclimation responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants. *Physiol Plant* 134:583-97

Rahman LN, Chen L, Nazim S, Bamm VV, Yaish MW, Moffatt BA, Dutcher JR, Harauz G (2010) Interactions of intrinsically disordered *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 with membranes - synergistic effects of lipid composition and temperature on secondary structure. *Biochem Cell Biol* 88(5):791-807

Realini C, Rechsteiner M (1995) A proteasome activator subunit binds calcium. *J Bio Chem* 270:29664-67

Reyes JL, Campos F, Wei HUI, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA (2008) Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant Cell Environ* 31(12):1781-1790

Shen Y, Tang MJ, Hu YL, Lin ZP (2004) Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Sci* 166:1167-1175

Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC (2003) Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiology* 131:963-975.

Ueda EKM, Gout PW, Morganti L (2003) Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A* 988:1-23

Uversky VN (2002) What does it mean to be natively unfolded?. *Eur J Biochem* 269(1):2-12

Xu DP, Duan XL, Wang BY (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-257

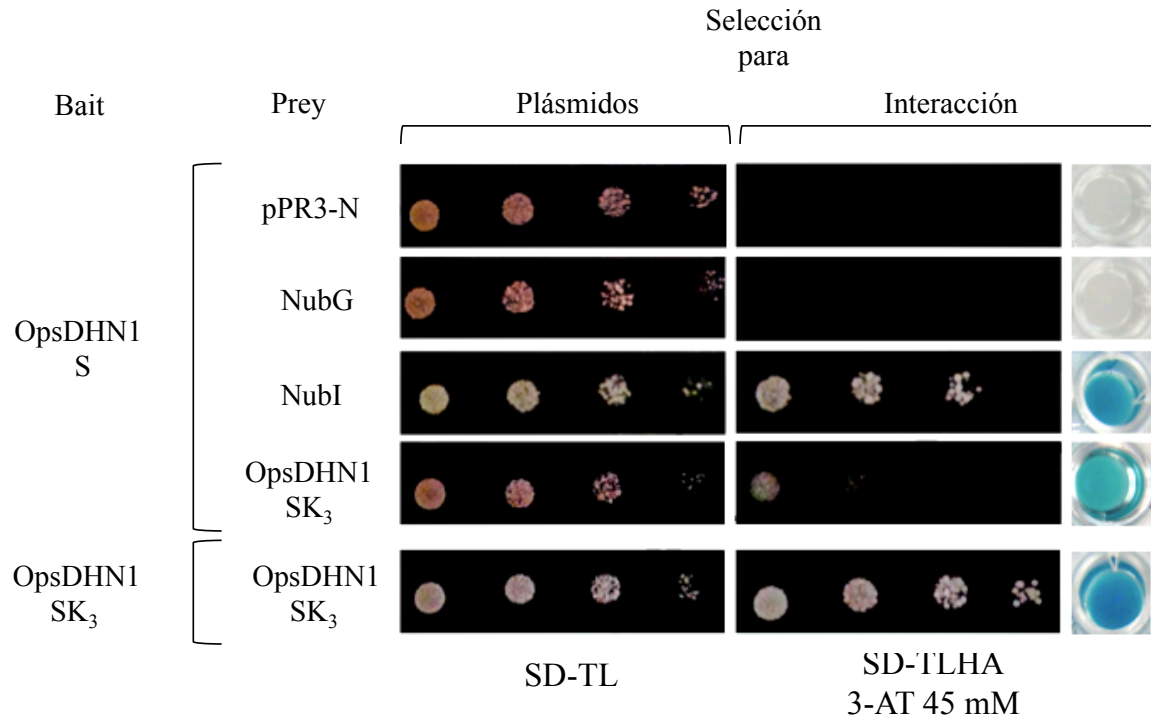
Yin Z, Rorat T, Szabala BM, Ziołkowska A, Malepszy S (2006) Expression of a *Solanum sogarandinum* SK<sub>3</sub>-type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings. *Plant Sci* 170:1164-72

## VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla Suplementaria 1.** Porcentaje de aminoácidos abundantes en DHNs de plantas.

Número de acceso	Nombre	Tamaño (aa)	Porcentaje de aminoácidos más abundantes						
			K	H	G	S	E	T	D
AT1G20450	ERD10	260	16.2	4.2	5	6.9	<b>19</b>	6.5	5.4
AT1G20440	COR47	265	14	4.9	3.8	6.8	<b>22.6</b>	8.3	5.3
At1g54410		98	<b>22.4</b>	13.3	15.3	9.2	12.2	0	12.2
At1g76180	ERD14	185	18.4	3.2	4.9	8.1	<b>21.1</b>	4.3	3.8
At2g21490		185	8.1	7.6	<b>11.4</b>	9.2	7	13	5.9
At3g50970	LTI30/XERO2	193	11.9	13.5	<b>15.5</b>	3.1	8.3	14.5	0.5
At3g50980	XERO1	128	9.4	6.2	<b>16.4</b>	11.7	6.2	8.6	3.9
At4g38410		163	<b>19.6</b>	4.3	8	6.1	17.8	3.1	6.7
At4g39130		151	7.9	7.3	9.9	7.9	6.6	<b>11.3</b>	6.6
At5g66400	RAB18	186	5.9	4.3	<b>33.9</b>	6.5	5.4	5.4	3.8
AEI52546.1	OpsDHN1	248	16.9	7.7	5.6	5.6	<b>18.1</b>	2.4	8.5





**Figura Suplementaria 2.** Ensayo de funcionalidad de la construcción pDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub>. La construcción pDHB1-OpsDHN1-S<sub>1-97</sub> fue co-transformada en la cepa NMY51 con los vectores control del sistema split ubiquitin: pPR3-N (vector vacío), NubG (negativo), NubI (positivo). Las levaduras transformantes fueron seleccionadas en medio SD-TL. La interacción se evaluó en medio SD-LTHA suplementado con 45 mM de 3-AT mediante goteos. La coloración roja es característica de ausencia de interacción y puede ser observado en medio semi-selectivo SD-TL. Las interacciones positivas fueron determinadas mediante ensayos de la actividad de la β-galactosidasa (panel derecho). Las fotografías se tomaron 1 h posterior al inicio del ensayo.