

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización funcional de dos sitios de degradación
proteolítica tipo PEST de la dehidrina de nopal (OpsDHN1).**

Tesis que presenta

Adriana Leticia Salazar Retana

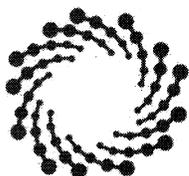
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo 2017



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización funcional de dos sitios de degradación proteolítica tipo PEST de la dehidrina de nopal (OpsDHN1)**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Adriana Leticia Salazar Retana** y aprobada el **dos de mayo del dos mil diecisiete** 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 la tesis

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

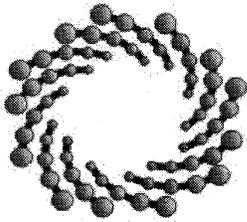
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial



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 (331853) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 161 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 2 días del mes de mayo del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Adriana Leticia Salazar Retana

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización funcional de dos sitios de degradación proteolítica tipo PEST de la dehidrina de nopal (OpsDHNI).

que se desarrolló bajo la dirección de

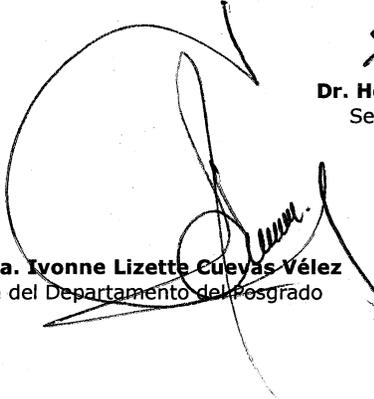
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

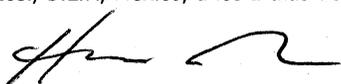
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:20 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 2 días del mes de mayo de 2017.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios

Por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de mi vida.

A mis padres

Por el gran ejemplo que siempre han sido, nunca necesité buscar motivación para salir adelante en otro lugar que no fuera mi propio hogar, he llegado a esta etapa gracias a ustedes, reconozco su infinito esfuerzo por educarme y formarme, por los valores que siempre me han inculcado.

A mi abue Carmen

Su cariño prevalece siempre en mi corazón.

Esta tesis se las dedico con mucho cariño a ustedes, como un símbolo de gratitud por el amor incondicional q siempre me han manifestado. Los amo

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por la confianza, apoyo en todo momento y dedicación.

Al Dr. Samuel Lara González y a la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por sus aportaciones y por su tiempo para la revisión de la tesis.

A Israel Maruri por todo el tiempo que dedico a mi trabajo, por toda su paciencia, por compartir conmigo sus conocimientos, así como su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 7, por su compañerismo, ya que de todos he aprendido algo.

A la M.C Alicia Becerra Flora por el apoyo técnico y haber hecho amena mi estancia.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	5
III. RESULTADOS	10
3.1 Identificación de secuencias tipo PEST en la proteína OpsDHN1 de <i>Opuntia streptacantha</i> .	10
3.2 La fusión de la proteína OpsDHN1 a la proteína reportera GUS facilita su degradación proteolítica.	10
3.3 Cada secuencia PEST por separado fue capaz de degradar al reportero GUS.	11
3.4 La región que incluye las dos secuencias PEST (PEST1-PEST2) de los últimos 126 residuos de la OpsDHN1 abatió la actividad de GUS.	12
3.5 Análisis transcripcional de las construcciones generadas de la OpsDHN1 con GUS.	13
3.6 Las secuencias PEST de la OpsDHN1 son una etiqueta para la degradación proteolítica vía proteosoma 26S	13
3.7 Identificación de potenciales secuencias PEST en DHNs	14
IV. DISCUSIÓN	15
V. REFERENCIAS	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Segmentos de la proteína OpsDHN1 de <i>Opuntia streptacantha</i> .	30
Figura 2. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en la fusión GUS::DHN1-ORF.	31
Figura 3. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en las fusiones GUS::PEST1 y GUS::PEST2.	32
Figura 4. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en la fusión GUS::PEST1+2.	33
Figura 5. Patrones de expresión del gen <i>GUS</i> en las versiones derivadas GUS::OpsDHN1.	34
Figura 6. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> tratadas con el inhibidor del proteosoma 26S MG132.	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar las fusiones traduccionales.	36
Tabla 2. Distribución de secuencias PEST en las subclases de DHNs ortólogas.	37
Tabla 3. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo SKn.	38
Tabla 4. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo YnSKn.	40
Tabla 5. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo Kn.	41
Tabla 6. Localización de los segmentos de DHNs y de PEST en dehidrinas del tipo YnKn.	42

RESUMEN

Caracterización funcional de dos sitios de degradación proteolítica de la dehidrina de nopal (OpsDHN1)

Las dehidrinas (DHNs) son proteínas desordenadas y altamente hidrofílicas que se acumulan en respuesta a factores de estrés abiótico en plantas. A pesar de su importancia en la respuesta al estrés, aún se conoce poco sobre estas proteínas, por lo que su mecanismo de acción y su regulación post-traduccional, son temas importantes para elucidar su función biológica. En este estudio se caracterizaron dos sitios de degradación proteolítica tipo PEST localizados en la región central y C-terminal de la DHN SK₃ de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1). Las secuencias PEST son regiones enriquecidas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), las cuales son señales para la degradación de proteínas a través de la vía ubiquitina-proteosoma 26S. Para evaluar la funcionalidad de las secuencias PEST de la proteína OpsDHN1 como etiquetas de degradación proteolítica, se generó una fusión traduccional entre el gen reportero *GUS* y el marco de lectura abierto de la *OpsDHN1*, esta construcción se evaluó en un ensayo de expresión transitorio en hojas de *Nicotiana benthamiana* y en un sistema de expresión estable generando líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. En ambos sistemas, la construcción mostró un decremento de la señal de GUS. Así mismo, evaluamos si cada secuencia PEST podría conducir a la degradación de la proteína reportera, para ello fusionamos una región que contenía cada secuencia PEST a GUS, donde observamos que cada secuencia PEST por separado, al igual que la versión completa son capaces de disminuir la actividad de GUS. De manera interesante, la actividad de la proteína reportera GUS se abatió cuando le fusionamos los últimos 126 residuos de la OpsDHN1 que incluyen las dos secuencias PEST. Por otro lado, cuando aplicamos el inhibidor del proteosoma MG132, éste disminuyó el proceso de degradación de la proteína GUS. Por último, realizamos un análisis bioinformático, en donde identificamos que las secuencias PEST son elementos comunes en las DHNs. Este estudio constituye el primer reporte de secuencias PEST involucradas en la degradación de DHNs, lo que es de gran importancia para la comprensión de cómo son reguladas este tipo de proteínas en las plantas.

Palabras clave: Dehidrinas, proteínas desordenadas, estrés abiótico, secuencias PEST, degradación de proteínas.

ABSTRACT

Functional characterization of two sites of proteolytic degradation of the cactus dehydrin (OpsDHN1)

Dehydrins (DHNs) are disordered and highly hydrophilic proteins, which accumulates in plants in response to abiotic stresses. Despite their importance in the stress response, little is known about these proteins, therefore its mechanism of action and post-translational regulation are important processes to elucidate its biological function. In this study, we characterized two proteolytic PEST degradation sites located in the central region and C-terminal of *Opuntia streptacantha* SK₃ DHN (OpsDHN1). PEST sequences are enriched in amino acid like proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T), which are signals for protein degradation by 26S proteasome-ubiquitin pathway. To evaluate the functionality of these PEST sequences as proteolytic degradation tags, we generated a translational fusion between the *GUS* reporter gene and the open reading frame of OpsDHN1, this construct was examined by transient and stable expression systems using *Nicotiana benthamiana* agro-infiltrated leaves and *Arabidopsis thaliana* transgenic lines. In both systems, the construction showed a strong decrease of GUS signal. Also, we evaluated whether each PEST sequence could lead to degradation of the reporter protein. To do this, we fused a region containing a single PEST sequence to GUS, we observed that individually, each separate PEST sequence was able to decrease the activity of GUS, in the same way as the full version. Interestingly, the GUS reporter protein activity was abated when we fused the last 126 residues that include two PEST sequences of OpsDHN1. Moreover, the treatment with proteasome inhibitor MG132 decreased the degradation processes of the GUS protein. Finally, we performed a bioinformatic analysis, where we identified that PEST sequences are common elements in the DHNs. This study is the first to report that PEST sequences are involved in the DHNs degradation, which gives important insights for understanding how these type proteins are regulated in plants.

Keywords: Dehydrin, disordered proteins, abiotic stresses, PEST sequences, protein degradation

I. INTRODUCCIÓN

Durante periodos de deshidratación, se ha reportado que las plantas producen ciertas proteínas para contrarrestar el estrés, conocidas como dehidrinas (DHNs). Las DHNs son proteínas no estructuradas, altamente hidrofílicas, que se acumulan en la etapa tardía de la embriogénesis, justo antes de la desecación de las semillas (Battaglia et al., 2008; Close 1997; Dure et al., 1989). Las DHNs pertenecen al grupo 2 de las proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant); las cuales se encontraron por primera vez en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Dure et al., 1981). Desde entonces, se han identificado más genes que codifican para DHNs en diversas especies de plantas, y se ha reportado que no sólo se expresan en las semillas, si no también pueden encontrarse expresadas activamente en tejidos de las plantas en condiciones de estrés relacionados con el déficit hídrico, como bajas temperaturas, salinidad y sequía, lo que sugiere que estas proteínas juegan un papel importante en la respuesta a estos tipos de estrés en plantas (Tunnacliffe & Wise 2007; Battaglia et al. 2008).

La localización de las DHNs se ha reportado en varios compartimentos celulares, incluyendo citoplasma, membrana plasmática, núcleo y mitocondria (Close 1996, 1997; Ingram & Bartels 1996; Borovskii et al., 2002; Hernández-Sánchez et al., 2014; 2015). Las DHNs se clasifican con base a sus motivos conservados, por definición estas proteínas deben de contener al menos una copia de un motivo conocido como segmento-K (EKKGIME/DKIKEKLPG). Se ha propuesto que este motivo puede formar α hélices anfipáticas, las cuales pueden promover interacciones hidrofóbicas para estabilizar a macromoléculas bajo un déficit hídrico (Allagulova et al., 2003; Koag et al., 2003). Las DHNs también pueden poseer otros motivos conservados tales como el segmento-Y (T/VDEYGNP), localizado frecuentemente cerca de la región N-terminal. Esta secuencia comparte una alta similitud con el sitio de unión a nucleótidos de proteínas tipo chaperonas de plantas y bacterias (Close 1997; Allagulova et al., 2003; Kosová et al., 2010). Otra secuencia es el segmento-S, el cual consiste de 5-7 residuos de serinas consecutivos. La

fosforilación de este segmento participa en su translocación al núcleo (Close 1997; Alsheikh et al., 2005; Battaglia et al., 2008) Por último, el segmento- Φ es el menos conservado, es rico en glicinas, aminoácidos polares y está distribuido principalmente entre los segmentos-K (Close 1996, 1997; Allagulova et al., 2003). De acuerdo a la aparición, número y distribución de estos segmentos las DHNs se dividen en cinco clases: Kn, SKn, YnSKn, YnKn, y KnS (Tabla 2-6) (Hara 2010). Debido a que las DHNs son proteínas altamente cargadas, otra manera de clasificarlas es por su carga neta; por lo que las dehidrinas con un punto isoeléctrico (pI) bajo son denominadas dehidrinas ácidas (KnS, SKn y YnKn), las cuales se expresan preferentemente en respuesta a bajas temperaturas; el resto estarían agrupadas como dehidrinas básicas o neutras, y se expresan mayoritariamente en respuesta a desecación y salinidad (Allagulova et al., 2003; Eriksson & Harryson., 2011).

Por otro lado, algunas DHNs poseen segmentos repetidos de histidinas (H-X3-H, HH y Hn), los cuales se propone que participan en la unión a metales y al ADN. Además, las DHNs que poseen estos motivos ricos en histidina son preferencialmente localizadas en el núcleo de las células de las plantas (Hara et al., 2005; Hara 2010; Hernández-Sánchez et al., 2015). Previamente, nuestro grupo reportó que la región rica en histidinas (His6) de la DHN de nopal OpsDHN1 es crucial para su localización nuclear (Hernández-Sánchez et al., 2015).

Otra característica de las DHNs es que presentan un índice de hidrofiliidad mayor a 1, y son generalmente enriquecidas con glicina (>6%), serina, alanina, prolina, ácido glutámico, lisina y glutamina, pero presentan un bajo contenido o carencia de residuos hidrofóbicos (triptófano, tirosina, fenilalanina, cisteína, isoleucina, leucina, y asparagina), por esta característica las DHNs no forman estructuras estables (Dure 1993b; Garay-arroyo et al., 2000). Esta composición de aminoácidos es similar a la encontrada en proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) (Tompa 2002). Las IDPs pueden adoptar distintas conformaciones cuando interaccionan con sus blancos o por cambios en el ambiente; esta capacidad les proporciona funciones

biológicas distintas (Uversky 2002a,b; Sun et al., 2013; Tompa 2002). El descubrimiento de las IDPs implicó refutar el concepto clásico basado en estructura-función, ya que algunas proteínas que tienen regiones no estructuradas están involucradas en varios procesos celulares importantes, tales como la respuesta al estrés, la regulación transcripcional, la traducción, la señalización y el ciclo celular (Oldfield & Dunker 2014; Gsponer et al., 2008; Hinch & Thalhammer 2012; Uversky 2002; Uversky 2015b). Las IDPs al tener una estructura flexible, además de interactuar con varios ligandos, pueden favorecer la accesibilidad de sitios para modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo fosforilaciones, ubiquitinaciones, etc, las cuales permiten la regulación de sus distintas funciones biológicas, así como también la estabilidad de estas proteínas (Uversky 2015a).

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se identificó una DHN del tipo SK₃ de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1), la cual al ser sobreexpresada confirió tolerancia a estrés por frío en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Ochoa-Alfaro et al., 2012). Posteriormente, por dicroísmo circular demostramos que la OpsDHN1 es una proteína intrínsecamente desordenada (IDPs), la cual es capaz de homodimerizar tanto en citoplasma como en el núcleo de células de *Nicotiana benthamiana* (Hernández-Sánchez et al., 2014, 2015). En un análisis *in silico* de la OpsDHN1 de nopal, nosotros identificamos dos sitios de degradación proteolítica tipo PEST, localizados en la región central y en el extremo C-terminal de la proteína, con valores positivos de 3.8 y 8 respectivamente (Rechsteiner & Rogers 1996). Las secuencias PEST son regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), las cuales son uno de los principales motivos para la degradación de proteínas vía proteosoma-26S; estas secuencias PEST al no ser estructuradas, favorecen el desorden de las proteínas, ya que tal composición de aminoácidos coincide con la de las regiones desordenadas (Rechsteiner & Rogers 1996; Tompa et al., 2007; Singh et al., 2006; Sun et al., 2013).

En esta tesis, se caracterizaron las secuencias PEST putativas de la OpsDHN1 *in planta*. Para ello, realizamos diferentes fusiones traduccionales derivadas del marco

de lectura abierto de la *OpsDHN1* con el gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*). Estas construcciones se evaluaron mediante un sistema de expresión transitorio en hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* y en líneas transgénicas de *A. thaliana*. Los análisis histoquímicos y fluorométricos de las fusiones derivadas, mostraron que las secuencias PEST de la proteína OpsDHN1, conducen a la degradación de la proteína reportera GUS. Al aplicar el inhibidor del proteasoma (MG132), se disminuye este proceso de degradación del reportero GUS, lo que sugiere que la vía de degradación se lleva a cabo por el proteosoma 26S. Finalmente presentamos un análisis bioinformático en el cual las secuencias PEST podrían ser elementos comunes en las DHNs. Estos resultados constituyen el primer reporte sobre secuencias PEST en DHNs, lo cual aporta información muy valiosa sobre su regulación post-traducciona l de estas proteínas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en una mezcla de vermiculita y sustrato (1:1), luego las plántulas se dejaron durante 3-4 semanas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron esterilizadas con cloro al 20% (v/v) por 5 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y fueron germinadas en placas de medio MS (Murashige y Skoog 1962), pH 5.7, suplementado con sacarosa al 0.5% y agar al 1%. Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con una temperatura de 22 ± 2 °C.

2.2 Construcción de plásmidos

Para generar la construcción control de GUS, el marco de lectura abierto del gen reportero *GUS* se amplificó por PCR usando la Taq DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion high-fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, este fragmento de PCR se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), y se sub-clonó en el vector de expresión pMDC32 por recombinación sitio específico usando la enzima LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen).

Para la construcción de las fusiones traduccionales, el marco de lectura abierto del gen *GUS* fue amplificado sin el codón de paro, y se amplificaron cuatro versiones derivadas del ORF de la OpsDHN1, por PCR High-fidelity: una se realizó amplificando el marco de lectura abierto de la OpsDHN1 (GUS::OpsDHN1-ORF), la segunda del nucleótido número 370 al nucleótido 598 (GUS::PEST1), la tercera del 562-747 pb (GUS::PEST2) y la última del 370-747 pb (GUS::PEST1+PEST2). Con el fin de fusionar el extremo 3' del gen GUS a los extremos 5' de las versiones derivadas de la OpsDHN1, se introdujeron sitios de restricción *Kpn1* en las

secuencias de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados para generar las diferentes construcciones se enlistan en la Tabla 1.

Después de la amplificación por PCR, los productos fueron digeridos con la enzima *Kpn1* (Invitrogen), generando extremos cohesivos, los cuales posteriormente fueron ligados usando la DNA ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos ligados fueron clonados en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y sub-clonadas en el vector de expresión pMDC32 usando la tecnología Gateway.

Las construcciones generadas fueron usadas para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*.

2.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, que contiene el vector apropiado, como previamente fue descrito por Belda-Palazón et al., (2012). Las células de *A. tumefaciens* fueron cultivadas hasta una OD₆₀₀ de 2.0, se recuperaron y se suspendieron en un volumen similar de buffer de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.6, 200 mM de acetosiringona). Las cepas se incubaron en agitación continua a 28°C durante 3 h. Cada cepa de *A. tumefaciens* que contenían las fusiones traduccionales correspondientes, se prepararon para la infiltración en el espacio abaxial de hojas de *N. benthamiana* usando una jeringa sin aguja; al menos dos hojas transformadas de tres plantas de la misma edad se utilizaron para la tinción histoquímica de GUS y ensayos fluorométricos a los 3 días post-infiltración. Los experimentos se repitieron al menos tres veces para cada construcción con resultados similares.

Para la generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* se empleó el método de "floral dip" para ello, se cortaron las silicuas formadas y las flores, dejando únicamente los botones florales, los cuales fueron sumergidos en la solución de transformación con la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* que contienen los vectores correspondientes con las fusiones traduccionales (Zhang 2006). Las plantas

transformadas se seleccionaron en medio MS suplementado con higromicina (50 mg/mL). Para este estudio se utilizaron plantas de la generación F2, de 10 días de edad.

2.4 Análisis de la actividad de la β -glucuronidasa (GUS)

La expresión del gen reportero *GUS* fue analizado mediante dos tipos de ensayos. El ensayo histoquímico, se utilizó para medir la expresión del reportero de manera cualitativa. Los ensayos fluorométricos se usaron para cuantificar la actividad de la β -glucuronidasa en las diferentes líneas transgénicas.

Plántulas de *A. thaliana* y hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana*, se incubaron con el buffer de tinción de GUS (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indol-b-D-glucuronidasa (X-Gluc) en 100 mM de fosfato de sodio a pH 7.0) a 37°C por 12 h (Jefferson et al. 1987). Posteriormente, la clorofila fue removida como describen Malamy y Benfey (1997).

Las imágenes se generaron usando un microscopio MOTIC modelo BA-300 acoplado a una cámara de 5.0 megapíxeles y procesaron mediante el software MOTIC versión 2.0. Al menos tres experimentos independientes se realizaron con resultados similares.

Para los ensayos fluorométricos la actividad de GUS fue evaluada usando el tejido de las hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* y las plántulas transgénicas de *A. thaliana*, las cuales se congelaron y homogenizaron en 0.5 mL de buffer de extracción [50 mM fosfato de sodio pH 7.0, 10 mM ditioneitol, 0.1% Triton X-100, 0.1% lauril sarcosina, 10 mM EDTA]. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min; se recuperó la fase acuosa y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976); se utilizó albumina de suero bovino para la curva estándar. Para el ensayo enzimático, 10 μ L del extracto proteico se adicionaron a 100 μ L del buffer de extracción 1mM MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) como sustrato, y se incubaron 1h a 37° C. La reacción se paró

adicionando 175 μ L de carbonato de sodio 0.2 M. La fluorescencia generada se cuantificó usando GENios fluorometer (Tecan, Lyon, France), con un rango de excitación de 365nm y un filtro de emisión de 460 nm. La actividad enzimática de GUS fue medida por triplicado y expresada como pmol 4-MU/ mg protein/h.

2.5 Inhibidor del proteosoma 26S

Para los ensayos de inhibición del proteosoma 26S, las plántulas transgénicas de *A. thaliana*, que contenían las construcciones, se sumergieron en medio líquido MS suplementado con 150 μ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 3h. La solución stock del MG132 (5 mg/mL) se preparó con dimetilsulfóxido (DMSO). El medio líquido MS y medio líquido con DMSO se usaron como controles. Después de los tratamientos, las plántulas fueron procesadas para la tinción histoquímica y análisis fluorométrico de GUS.

2.6 Extracción de RNA y síntesis de cDNA de plantas de *A. thaliana*

El aislamiento de RNA de plantas de *A. thaliana* de 10 días de edad se llevó a cabo usando el reactivo Concert (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de RNA se trataron con DNasa I (Invitrogen) y se cuantificaron con el lector de microplaca EPOCH 2 (Biotek Instruments, Winnoski, USA). La síntesis de cDNA fue realizada a través de la enzima ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) según las recomendaciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

2.7 RT-PCR semi-cuantitativo

Un fragmento de 141 pb del gen reportero *GUS* se usó para evaluar la expresión de las líneas transgénicas de *A. thaliana*. Los oligonucleótidos usados para el qRT-PCR se enlistan en la Tabla 1. Así mismo, se usó un fragmento de 129 pb del gen de *Ubiquitina (UBQ5)* de *A. thaliana* como un control de carga.

Se usaron 30 ciclos de amplificación de PCR para amplificar el gen *GUS* y 28 ciclos para el gen de *UBQ*, el termociclador utilizado fue de la marca Applied Biosystems modelo 2720, posteriormente 10 µL de los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Se tomaron imágenes con el software Doc-It LS Image Analysis.

2.8 Identificación de secuencias PEST en dehidrinas

Un total de 109 secuencias de proteínas fueron analizadas de 33 especies de plantas. Estas secuencias se analizaron con el programa PEST-FIND (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). El algoritmo identifica regiones de 10 o más aminoácidos, enriquecidos en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), flanqueadas mayoritariamente por aminoácidos con carga positiva: como arginina (R), histidina (H) y lisina (K). El algoritmo considera un rango que va desde -50 hasta +50, donde valores positivos mayores de +5, son potenciales sitios de degradación. Sin embargo, valores mayores de cero podrían llegar a ser blanco de degradación proteolítica.

Solo se consideraron secuencias PEST con score positivo.

III. RESULTADOS

3.1 Identificación de secuencias tipo PEST en la proteína OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha*.

Para identificar en la secuencia de aminoácidos de la proteína OpsDHN1 potenciales sitios de degradación tipo PEST, se utilizó el algoritmo PEST-FIND (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind>). De esta manera, se identificaron dos secuencias tipo PEST, localizadas en la región central y en el extremo C-terminal de la OpsDHN1 de nopal. La primera secuencia, está localizada entre los residuos 146-166 (HVEEVIYSEPSYPAPAPPPPH, con un valor positivo de 3.8) y la segunda abarca del aminoácido 237 al 248 (KDVECDQPPSST, con un valor positivo de 8) (Fig.1).

3.2 La fusión de la proteína OpsDHN1 a la proteína reportera GUS facilita su degradación proteolítica

Con el objetivo de demostrar que las secuencias PEST identificadas en la OpsDHN1, son una etiqueta de degradación proteolítica, nuestro siguiente paso fue determinar si al fusionar la proteína OpsDHN1 con la proteína reportera GUS, disminuye la actividad del reportero por su posible degradación. Para ello, se generó una fusión traduccional entre el gen reportero *GUS* y el marco de lectura abierto de la *OpsDHN1* (*GUS::DHN1-ORF*), la cual fue clonada en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y sub-clonada en el vector de expresión pMDC32, que contiene el promotor del 2X35S (Sistema Gateway; Invitrogen, Carlsbad, CA). Como control positivo de expresión también clonamos el gen *GUS* en el vector pMDC32 (Fig. 2A). La actividad de GUS se determinó con una tinción histoquímica y se cuantificó mediante un ensayo fluorométrico en un sistema de expresión transitorio usando hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* y en un sistema estable generando líneas transgénicas de *A. thaliana*.

En ambos sistemas, la tinción histoquímica tanto de hojas de *N. benthamiana* como de *A. thaliana* que llevan la construcción control GUS, mostraron una fuerte coloración azul, el cual es resultado del procesamiento del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc), comparada con las células de la planta que expresan la fusión GUS::DHN1-ORF, donde se observó un considerable decremento de la señal de GUS (Fig. 2B y D). Al cuantificar la actividad de GUS mediante el ensayo fluorométrico en hojas de *N. benthamiana* y en dos líneas transgénicas independientes de *A. thaliana*, se encontró que las plantas que expresan la fusión GUS::DHN1-ORF mostraron un decremento aproximado del 70 % en la actividad del reportero GUS, resultado de una reducción de la hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG), en comparación con la construcción GUS control en la cual, tras la hidrólisis del sustrato MUG, produce una fuerte fluorescencia (Fig. 2C y E). Estos resultados sugieren que la fusión de la proteína OpsDHN1 al reportero GUS puede conducir a su degradación proteolítica en plantas.

3.3 Cada secuencia PEST por separado fue capaz de degradar al reportero GUS

Para determinar si cada secuencia PEST (PEST1 y PEST2), de la OpsDHN1 pueden funcionar como una etiqueta para la degradación proteolítica, nosotros generamos dos construcciones en las cuales delimitamos cada secuencia PEST para fusionarlas al reportero GUS. Para ello, tomamos una región que comprende los residuos del 124 al 198, la cual incluye la primera secuencia PEST (GUS::PEST1), y otra del residuo 187 al 248 que contiene la segunda secuencia PEST (GUS::PEST2). Cada construcción fue clonada en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y sub-clonada en el vector binario de expresión pMDC32 (Fig. 3A). Estas construcciones se evaluaron en un sistema de expresión transitorio en *N. benthamiana* y en un sistema estable generando líneas transgénicas de *A. thaliana*. El análisis histoquímico reveló que las células tanto de las plantas de *N. benthamiana* como las de *A. thaliana* que albergan cada secuencia PEST (PEST1

y PEST2) fueron capaces de disminuir la expresión del reportero GUS, en comparación con las plantas GUS control (Fig. 3B y D). Al analizar los datos del ensayo fluorométrico en células de *N. benthamiana* y *A. thaliana*, tanto la construcción que contiene la secuencia PEST1 (GUS::PEST1), como la versión completa de la OpsDHN1 (GUS::DHN1-ORF), mostraron una reducción considerable del 58 al 65%, respectivamente, en comparación al control GUS; sin embargo, la construcción GUS::PEST2 fue la que mostró una menor actividad de GUS, con un decremento del 75 y 78% (Fig. 3C y E). Estos datos muestran que la fusión de una sola secuencia PEST de la proteína OpsDHN1 es suficiente para conducir a la degradación de la proteína reportera GUS. La secuencia PEST2 fue la que presentó el mayor nivel de degradación.

3.4 La región que incluye las dos secuencias PEST (PEST1-PEST2) de los últimos 126 residuos de la OpsDHN1 abatió la actividad de GUS

Considerando que ambas etiquetas PEST por separado fueron capaces de activar la degradación proteolítica, nosotros quisimos analizar si al fusionar la región que contiene las dos etiquetas favorecía la degradación de la proteína reportera GUS. Para ello, se realizó una fusión entre la proteína GUS y los últimos 126 residuos del C-terminal de la proteína OpsDHN1 (GUS::PEST1+2), los cuales incluyen las dos secuencias PEST (Fig. 4A). De manera interesante, observamos que en el análisis histoquímico la señal de GUS se abatió tanto en células de *N. benthamiana* como de *A. thaliana* que expresan esta fusión. Se observó una drástica disminución de la coloración azul, en comparación con la construcción GUS control, en donde todas las células son azules (Fig. 4B y C). En el ensayo fluorométrico en células de *N. benthamiana* no se detectó actividad de GUS, mientras que en *A. thaliana* se detectó una actividad mínima del reportero, donde obtuvimos una reducción del 98% (Fig. 4D y E). Por lo tanto, la región que incluye las dos secuencias PEST de la OpsDHN1, se requieren para la completa degradación de GUS.

3.5 Análisis transcripcional de las construcciones generadas de la OpsDHN1 con GUS

Para verificar si la disminución de la señal del reportero GUS, en las fusiones traduccionales derivadas de las versiones del marco de lectura abierto de la OpsDHN1, se deben a un procesamiento a nivel post-traducciona, y no a una regulación a nivel transcripcional. Se evaluaron los niveles de expresión de GUS mediante un análisis semi-cuantitativo de RT-PCR, a dos líneas transgénicas de cada construcción en *A. thaliana* que expresan las fusiones GUS::DHN1-ORF, GUS::PEST1, GUS::PEST2 y GUS::PEST1+2. Como se puede observar en la Figura 5, no hay cambios en los niveles del transcrito de GUS en las diversas construcciones.

3.6 Las secuencias PEST de la OpsDHN1 son una etiqueta para la degradación proteolítica vía proteasoma 26S

Para comprobar si la vía proteasoma 26S está implicada en la degradación de las fusiones generadas, nosotros incubamos las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las construcciones GUS::DHN1-ORF y GUS::PEST1+2, en medio MS 0.5X líquido suplementado con 150 µM del inhibidor del proteasoma MG132 por 3 horas. Como control se utilizó DMSO (disolvente de MG132). El ensayo histoquímico mostró que la señal de GUS incrementó considerablemente en las líneas transgénicas tratadas con el inhibidor MG132, comparado con las líneas tratadas con MS y MS suplementado con DMSO (Fig. 6A, B y C). Estos resultados concuerdan con el análisis fluorométrico donde la presencia del MG132 en las líneas GUS::DHN1-ORF incrementó 2.5 veces la actividad de GUS, respecto a las no tratadas, mientras que para las líneas con la construcción GUS::PEST1+2 incrementó 35 veces la actividad de GUS al tratarlas con el inhibidor MG132 (Fig. 6D). Esto nos sugiere que las etiquetas PEST identificadas activan la degradación proteolítica vía proteosoma 26S.

3.7 Identificación de potenciales secuencias PEST potenciales en DHNs

Con los datos obtenidos de las etiquetas PEST identificadas en la OpsDHN1 de nopal, se investigó la prevalencia de secuencias PEST en otras DHNs de plantas. Mediante el algoritmo PEST-FIND (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) nosotros analizamos un total de 109 DHNs de diferentes tipos como: 42 de SKn, 43 de YnSKn, 14 de Kn, 5 de YnKn, y 5 de KnS de 33 especies de plantas. En general, encontramos que un 43% de las DHNs analizadas contienen al menos una secuencia potencial PEST con valor positivo (Tabla 2). En particular, las DHNs del tipo SKn presentaron el mayor porcentaje de secuencias PEST, en donde se encontró que el 74% de las proteínas de este tipo contenían secuencias PEST con valores positivos (Tabla 2 y 3). En el caso de los otros tipos de DHNs, se detectó un menor porcentaje de proteínas que contienen sitios PEST; las Kn con un 43%, YnKn con 40% y las del tipo YnSKn con el 19%. Sin embargo, no encontramos secuencias PEST en las del tipo KnS (Tablas 2, 4-6). La DHN con el mayor número de secuencias PEST distribuidas en su secuencia fue la PtrDHN-1.2-K₁₃ de *Populus trichocarpa* con 13 secuencias, la cual pertenece al tipo Kn. De forma interesante, el valor de PEST más alto (28.6) se encontró en la DHN MdDHN9-SK₃ de *Malus domestica* que pertenece al tipo SKn. Adicionalmente, analizamos la distribución de las secuencias PEST en las proteínas y encontramos que 17 proteínas contienen solo una secuencia PEST, de las cuales 4 se ubicaron en la región N-terminal, 5 en la región central y 8 hacia el dominio C-terminal. En las DHNs restantes, las cuales contienen más de una secuencia PEST, estas se distribuyen a través de su cadena polipéptidica y están preferentemente localizadas en las regiones adyacentes al segmento-K. Este análisis *in silico* de la distribución e incidencia de potenciales secuencias PEST en las DHNs, nos muestra que este mecanismo de regulación post-traducciona es común en esta clase de proteínas, por lo que esto nos exhorta a estudiar a futuro la funcionalidad de estas señales de degradación.

IV. DISCUSIÓN

Las dehidrinas (DHNs) son proteínas que se acumulan en la etapa tardía del desarrollo de la semilla, y en tejidos vegetativos en respuesta a factores de estrés que causan deshidratación celular, tales como calor, frío, sequía y salinidad (Allagulova et al., 2003; Close 1997).

Los mecanismos por los que lleva a cabo sus funciones, así como su regulación post-traducciona se desconocen. Algunas de las funciones moleculares que han sido propuestas para las DHNs, las cuales pudieran contribuir a la tolerancia de estrés en plantas, son: 1) actuar como chaperonas moleculares impidiendo la agregación de proteínas, 2) tener actividad crioprotectora de membranas y proteínas durante condiciones de estrés abiótico, 3) la de proteínas de unión a metales y ácidos nucleicos, 4) como escudos moleculares, 5) o el de retener agua, y así actuar como “buffers” para hidratar macromoléculas (Rorat 2006; Tunnacliffe & Wise 2007; Hara et al., 2005; Mouillon et al., 2006; Tompa et al., 2006). Se ha reportado que el aumento en los niveles de los mRNAs y de las proteínas de las DHNs, está estrechamente relacionados con la adquisición de la tolerancia al estrés abiótico. Por otra parte, se sabe que estos niveles disminuyen rápidamente después del estrés, como es el caso de DHNs de Picea de Serbia (*Picea obovata*; Kjellsen et al. 2013), cebada (*Hordeum vulgare*; Du et al., 2011), y betula (*Betula pubescens* Ehrh; Welling et al., 1997). La acumulación de las DHNs ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, el mecanismo de regulación post-traducciona de estas proteínas aún se desconoce.

Las actividades biológicas de muchas proteínas usualmente están reguladas a nivel celular mediante un fino balance entre la biosíntesis y la degradación de las mismas. Uno de los principales determinantes de la vida media de una proteína es la presencia de señales de degradación, las cuales pueden participar en la inestabilidad de la proteína. Las secuencias PEST, son uno de los principales motivos para la degradación de proteínas, vía proteosoma 26S (Rechsteiner & Rogers 1996), estas secuencias se han reportado en enzimas claves para la síntesis de metabolitos (Zhang et al., 2011), en proteínas que regulan el ciclo celular (Adachi

et al., 2006; Planchais et al., 2004). En factores de transcripción (Sakuma et al., 2006; Lu et al., 2010). Yamaguchi et al., (2010), reportaron que el represor transcripcional VNI2 de *A. thaliana* posee una secuencia PEST en su C-terminal (score: 4.9), y la fusión de VNI2 a GUS conduce a su degradación proteolítica en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Así mismo, Sakuma et al., (2006) reportaron la degradación proteolítica de GFP a través de la fusión del factor de transcripción DREB2A (Respuesta-deshidratación) de *A. thaliana*, el cual contiene una secuencia PEST hacia el N-terminal (score: 9).

En este trabajo nos enfocamos en demostrar la funcionalidad de dos sitios de degradación proteolítica tipo PEST presentes en la OpsDHN1, con valores positivos de 3.8 y 8, codificados en la región central y C-terminal de la proteína. Con el fin de caracterizar estas señales de degradación proteolítica, usamos un gen reportero estable para monitorear su expresión. Nuestros resultados mostraron que la fusión de la versión completa de la proteína OpsDHN1 a la proteína reportera GUS (GUS::DHN1-ORF), fue capaz de ejercer un efecto negativo en la estabilidad de la proteína reportera GUS (Fig. 2B-D). Por lo tanto, este resultado muestra que efectivamente la dehidrina OpsDHN1 de nopal contiene etiquetas de degradación, las cuales podrían ser las dos secuencias PEST antes descritas.

Posteriormente, analizamos por separado cada secuencia PEST1 y PEST2, para determinar si cada secuencia podría conducir a la degradación de la proteína reportera GUS, donde observamos que la construcción que contiene el PEST1 (GUS::PEST1), mostró un comportamiento similar en la señal del reportero a la de la versión completa de la OpsDHN1 fusionada a GUS. Sin embargo, la construcción PEST2 (GUS::PEST2), logró reducir aún más la actividad de GUS (Fig. 3B-D), esta diferencia observada podría deberse a que el PEST2 tiene un valor de 8, el cual es mayor al del PEST1 (3.2).

Adicionalmente, cuando se analizó la región que incluye las dos secuencias PEST (GUS::PEST1+2), la señal de GUS fue abatida (Fig. 4B-D); de acuerdo a estos

resultados, se puede concluir que una sola secuencia PEST es capaz de disminuir la señal del reportero, pero que la región que incluye las dos secuencias PEST se requiere para la degradación proteolítica completa de GUS.

Por otro lado, se analizaron los niveles de acumulación del transcrito de cada una de las construcciones evaluadas, con el fin de confirmar que la disminución en los niveles de señal del reportero no estaba dada por una disminución en la acumulación de sus transcritos. Como se puede observar (Fig. 5), ninguna de las versiones generadas presentó diferencias en la acumulación de sus respectivos transcritos. Estos resultados permiten concluir que las diferencias observadas en la actividad enzimática de GUS en las distintas versiones derivadas de la OpsDHN1 son debido a diferencias en la estabilidad de la proteína.

Cabe señalar que si comparamos los niveles de degradación de la versión completa de la OpsDHN1 (GUS::DHN1-ORF) con la versión que incluye los dos PEST (GUS::PEST1+2), existe una diferencia importante en la señal del reportero entre una versión y la otra, ya que la versión que incluye el PEST1+PEST2, conduce a la completa degradación del reportero GUS, en contraste a la versión de la OpsDHN1 completa, donde solo observamos un decremento considerable en la señal. Estos resultados observados podrían explicarse con el hallazgo previamente reportado por nuestro grupo de trabajo, en el cual se analizó la interacción DHN-DHN, donde la OpsDHN1 fue capaz de interactuar consigo misma (Hernández-Sánchez et al., 2014). En este trabajo, se analizaron distintas versiones de la OpsDHN1 para determinar la región involucrada en la interacción, donde se observó que la interacción de la OpsDHN1-OpsDHN1 requiere de los tres segmentos-K y del motivo rico en histidinas, donde la delección de uno de los segmentos-K, disminuyó la formación del dímero (Hernández-Sánchez et al., 2014). Es posible que la interacción DHN-DHN, o con sus proteínas blanco pudieran ocultar los sitios de degradación, por lo cual, en la versión completa de la OpsDHN1 al interactuar consigo misma, genera una correcta formación del dímero y por consiguiente observamos actividad del reportero; mientras que la nula presencia de la señal del reportero en la versión GUS::PEST1+2, se puede deber a la carencia de uno de los

segmentos-K, lo cual repercutiría en su correcta homodimerización, de esta manera, los sitios de degradación quedarían más expuestos. Otros grupos también han reportado que algunas DHNs como la VrDHN1 de *Vigna radiata*, TsDHN2 de *Thellungiella salsuginea* y COR85 de espinaca, pueden formar homodímeros (Kazouka & Oeda 1994; Lin et al., 2012; Rahman et al., 2013). La regulación de la degradación de proteínas que contienen secuencias PEST por medio de interacción proteína-proteína ya ha sido reportada (Zhang et al., 2011; Li & Coffino 1993). Uno de los primeros mecanismos elucidados en la degradación de proteínas mediante secuencias PEST es el caso de la enzima Ornitina descarboxilasa (ODC) de ratón, la enzima ODC tiene dos regiones PEST en su extremo C-terminal. Para ser catalíticamente activa, la ODC forma un homodímero en el cual las regiones PEST están ocultas. La degradación de la enzima ODC ocurre mediante la disrupción del homodímero exponiendo las secuencias PEST para su rápida degradación proteolítica (Li & Coffino 1992; Li & Coffino 1993). De forma interesante, Zhang et al., (2011), reportaron que la secuencia PEST de la enzima SAMDC1 de *A. thaliana*, participa en su degradación, mientras que la interacción de la enzima SAMDC1 con una proteína viral, oculta la secuencia PEST y evita la degradación de dicha enzima, lo que facilita la proliferación viral.

Así mismo, la proteólisis dependiente de PEST, ha sido demostrada usando fragmentos de proteínas que contienen secuencias PEST, tal como es el caso de la cinasa dependiente de ciclina CDKB2 de *A. thaliana* que contiene una secuencia PEST (valor de 9.7) codificado en su dominio N-terminal. Al fusionar la región N-terminal de CDKB2 a GUS, ésta fusión fue degradada en plantas transgénicas de *A. thaliana* (Adachi et al., 2006). También la fusión de GUS al dominio C-terminal de la espermina sintasa de maíz (ZmSPMS1), la cual contiene una secuencia PEST (valor 3.6), conduce a la degradación de la proteína reportera GUS en monocapas de cebolla y líneas transgénicas de *A. thaliana* (Maruri-López et al., 2014). En ambos análisis, el CDKB2 de *A. thaliana* y la ZmSPMS1 de maíz, el tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG132 bloqueó el proceso de degradación de GUS. Nosotros observamos resultados similares en la recuperación de la señal de GUS

en plantas transgénicas de *A. thaliana* que contienen las construcciones GUS::DHN1-ORF y GUS::PEST1+2, después de ser incubadas con el inhibidor del proteosoma 26S MG132. Esto sugiere que el proteosoma 26S puede estar implicado en la degradación.

Diversos análisis demuestran que las DHNs son proteínas no estructuradas, por lo que son conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) (Mouillon et al., 2006). Las IDPs, han sido ampliamente identificadas en años recientes en diversos organismos, donde tienen papeles importantes en varios procesos celulares (Uversky 2002; Uversky 2013; Uversky 2015; Sun et al., 2013; Gsponer et al., 2008;), lo que desafía el paradigma función-estructura, ya que las IDPs tienen la capacidad de adoptar distintos cambios conformacionales, los cuales les permite interactuar con diversos ligandos, por lo que estas proteínas se conocen como proteínas multifuncionales (Sun et al., 2013). Debido a sus funciones importantes, la presencia de IDPs en la célula debe ser estrictamente controladas, se ha reportado que en humanos niveles abundantes de IDPs están asociados con enfermedades neurodegenerativas, cerca del 79% de las proteínas relacionadas con el cáncer, y el 66% de las proteínas con funciones en señalización celular contienen regiones desordenadas (Cheng et al., 2006; Uversky 2015a).

Gsponer et al. (2008), reportaron que cerca de un tercio del proteoma de algunos eucariotas que ellos analizaron son proteínas no estructuradas, y el 50% de estas proteínas contienen secuencias degradación tipo PEST; estas secuencias proteolíticas, junto con la interacción de proteínas blanco podrían actuar como interruptores, modulando los niveles intracelulares de las proteínas que contienen secuencias PEST.

Tomando en conjunto nuestros resultados, sugerimos que la OpsDHN1 de nopal al estar sometida a condiciones de estrés abiótico, podría llevar a cabo su función protectora como dímero o multímetro, lo que oculta sus secuencias de degradación, y puede ser sometida a proteólisis cuando la célula así lo requiera. Al estar como monómero, las secuencias de degradación quedarían expuestas, lo que da como

resultado una disminución en los niveles de proteína y por lo tanto la pérdida de su actividad protectora. La presencia de secuencias de degradación tipo PEST en DHNs, principalmente en las del tipo SKn, abre nuevos escenarios en los mecanismos de regulación post-traducciona1 de estas proteínas.

V. REFERENCIAS

- Adachi, S., Uchimiya, H. & Umeda, M., 2006. Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(12), pp.1683–1686.
- Allagulova, Ch., R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., and Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry Mosc.* 68, 945-951. doi: 10.1023/A:1026077825584.
- Alsheikh, M.K., Svensson, J.A.N.T. & Randall, S.K., 2005. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. , pp.1114–1122.
- BattagliaM, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148:6–24.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farrás, R.,
- Carrasco, P., Ferrando, A., (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* 7,e46907.
- 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
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248e254.
- Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, Dunker AK, Dunker VN., (2006). Abundance of intrinsic disorder in protein associated with cardiovascular disease. *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, 45(35), pp.10448–10460.
- Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97:795–803.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. , 1988, pp.291–296.

- Du, J.B. et al., 2011. Comparative expression analysis of dehydrins between two barley varieties, wild barley and Tibetan hulless barley associated with different stress resistance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2), pp.567–574.
- Dure L, Galau GA (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins. *Plant Physiol* 68: 187–194.
- Dure III, L.S. et al., 1989. Common amino acid sequence among the LEA proteins of higher plants. , 12, pp.475–486.
- Dure L III (1993b). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* 3:363–369.
- Garay-arroyo, A., Garcarrubio, A. & Covarrubias, A.A., 2000. Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common during Conditions of Water Deficit *. , 275(8), pp.5668–5674.
- 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
- Hara, M. (2010). The multifunctionality of dehydrins: an overview. *Plant Signal. Behav.* 5, 503-508. doi: 10.4161/psb.11085.
- Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.* 56, 2695-2703. doi: 10.1093/jxb/eri262
- Harryson, E. and P., (2011). Plant Desiccation Tolerance. *Plant Desiccation Tolerance*, pp.1–311.
- Hernández-Sánchez, I. E., Martynowicz, D. M., Rodríguez-Hernández, A. A., Pérez-Morales, M. B., Graether, S. P., and Jiménez-Bremont, J. F. (2014) A dehydrin-dehydrin interaction: the case of SK3 from *Opuntia streptacantha*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 520. doi: 10.3389/fpls.2014.00520
- Hernández-Sánchez, I.E., Maruri-lópez, I. & Ferrando, A. (2015). Nuclear localization of the dehydrin OpsDHN1 is determined by histidine-rich motif. , 6(September), pp.1–8.
- Hincha, D.K. & Thalhammer, A., 2012. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society transactions*, 40(5),

pp.1000–3.

- Ingram, J. & Bartels, D. (1996). the Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, pp.377–403.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-07
- Kjellsen, T.D. et al., 2013. Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *Tree Physiology*, 33(12), pp.1354–1366.
- Koag, M.-C. et al., 2003. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant physiology*, 131(1), pp.309–16.
- Kosová, I, P. il & Pavel, V., 2010. Role of Dehydrins in Plant Stress Response. *Handbook of Plant and Crop Stress, Third Edition*, (September), pp.239–285.
- Li, X. & Coffino, P., 1993. Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Molecular and cellular biology*, 13(4), pp.2377–2383.
- Li, X. & Coffino, P., 1992. Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine-inducible protein antizyme. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), pp.3556–3562.
- Lu, Q.S. et al., 2010. The C-terminal domain of FUSCA3 negatively regulates mRNA and protein levels, and mediates sensitivity to the hormones abscisic acid and gibberellic acid in Arabidopsis. *Plant Journal*, 64(1), pp.100–113.
- Malamy JE, Benfey PN (1997) A rapid system for assessing transgene expression in roots of *Arabidopsis*. *Plant J* 12:957-963.
- Maruri-López I., Rodríguez-Kessler M, Rodríguez-Hernández AA , Becerra-Flora A., Olivares-Grajales JE, Jiménez-Bremont JF (2014). A maize spermine synthase 1 PEST sequence fused to the GUS reporter protein facilitates proteolytic degradation. *Plant Physiology and Biochemistry* 26, 459-464
- Mouillon, J., Gustafsson, P. & Harryson, P., 2006. Structural Investigation of Disordered Stress Proteins . Comparison of Full-Length Dehydrins with Isolated

- Peptides of Their Conserved Segments 1. , 141(June), pp.638–650.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Ochoa-Alfaro, A., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velázquez, C., Gómez-Anduro, J., et al. (2012). Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta* 235, 565-578. doi: 10.1007/s00425-011-1531-8
- Oldfield, C.J. & Dunker, K.A., 2014. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem*, 83, pp.553–84.
- Planchais, S., Samland, A.K. & Murray, J.A.H., 2004. Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant Journal*, 38(4), pp.616–625.
- Rahman, L.N. et al., 2013. Interactions of *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 with membranes at cold and ambient temperatures - Surface morphology and single-molecule force measurements show phase separation, and reveal tertiary and quaternary associations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(3), pp.967–980.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. , 4(July), pp.267–271.
- Rorat, T., 2006. Plant dehydrins--tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters*, 11(4), pp.536–56.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-
- Shinozaki, K., (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*. 18, 1292e1309.
- Singh, G.P. et al., 2006. Intrinsic unstructuredness and abundance of PEST motifs in eukaryotic proteomes. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 62(2), pp.309–315.
- Sun, X. et al., 2013. Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its

- broad impact on plant biology. *The Plant cell*, 25(1), pp.38–55.
- Tompa, P., 2002. Intrinsically unstructured proteins. , 27(10), pp.527–533.
- Tompa, P. et al., 2006. Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophysical journal*, 91(6), pp.2243–9.
- Tompa, P. et al., 2007. Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 71(2), pp.903–909.
- Tunnacliffe, A. & Wise, M.J., 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. , pp.791–812.
- Uversky, V.N., 2002. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *European Journal of Biochemistry*, 12(May 2001), pp.2–12.
- Uversky, V.N., 2002. What does it mean to be natively unfolded ? , 12(May 2001), pp.2–12.
- Uversky, V.N., 2013. A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. *Protein Science*, 22(6), pp.693–724.
- Uversky, V.N., 2015a. Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(MAR), pp.1–6.
- Uversky, V.N., 2015b. The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes. *FEBS Letters*, 589(19), pp.2498–2506.
- Welling, A., Kaikuranta, P. & Rinne, P., 1997. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens* . Involvement of ABA and dehydrins. , pp.119–125.
- Yamaguchi, M. et al., 2010. VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 22(4), pp.1249–63.
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1.
- Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., Teng, K., Li, Y., Liang, L., Du, Q., Zhou, X., Guo, H., Xie, Q., 2011. BSCTV C2 attenuates the

degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. Plant Cell. 23, 273e288.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, a mi comité tutorial y al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Pies de figura

Figura 1. Segmentos de la proteína OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha*. A) Representación esquemática de los segmentos característicos de la proteína OpsDHN1. B) Secuencia de aminoácidos de la proteína OpsDHN1, donde se muestra en un cuadro azul el segmento-S, en amarillo los segmentos-K. Las potenciales secuencias PEST identificadas se resaltaron en color negro.

Figura 2. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en la fusión GUS::DHN1-ORF. A) Representación esquemática de las construcciones GUS control y la fusión GUS::DHN1-ORF en el vector de expresión pMDC32, bajo el control del promotor 2X35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV), y el terminador de la nopalina sintasa nosT. B) Tinción histoquímica de GUS en hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* que expresan las construcciones. C) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en hojas de *N. benthamiana*. D) Tinción histoquímica de GUS en hojas de *A. thaliana* que expresan las construcciones GUS control y dos líneas independientes de la fusión de GUS::DHN1-ORF, en hojas de 10 días de edad. E) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en *A. thaliana* de la construcción control y dos líneas independientes. La actividad de GUS representa la concentración de producto de MUG hidrolizado por mg de proteína total por hora de reacción. Las barras representan la media \pm del error estándar (n=3). Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

Figura 3. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en las fusiones GUS::PEST1 y GUS::PEST2. A) Representación esquemática de la construcción GUS::PEST1 y GUS::PEST2 en el vector de expresión pMDC32, bajo el control del promotor 2X35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV), y el terminador de la nopalina sintasa nosT B) Tinción histoquímica de GUS en hojas

agro-infiltradas de *N. benthamiana* que expresan ambas fusiones. C) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en *N. benthamiana*. D) Tinción histoquímica de GUS en hojas de *A. thaliana* que expresan las construcciones GUS control y dos líneas independientes de la fusión de GUS::DHN1-ORF, en hojas de 10 días de edad. E) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en *A. thaliana* de la construcción control y dos líneas independientes. La actividad de GUS representa la concentración de producto de MUG hidrolizado por mg de proteína total por hora de reacción. Las barras representan la media \pm del error estándar (n=3). Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía, y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

Figura 4. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en la fusión GUS::PEST1+2. A) Representación esquemática de la construcción GUS::PEST1+2 en el vector de expresión pMDC32, bajo el control del promotor 2X35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV), y el terminador de la nopalina sintasa nosT. B) Tinción histoquímica de GUS en hojas agro-infiltradas de *N. benthamiana* que expresan la fusión. C) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en *N. benthamiana*. D) Tinción histoquímica de GUS en hojas de *A. thaliana* que expresan las construcciones GUS control y dos líneas independientes de la fusión GUS::PEST1+2, en hojas de 10 días de edad. E) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS en *A. thaliana* de la construcción control y dos líneas independientes. La actividad de GUS representa la concentración de producto de MUG hidrolizado por mg de proteína total por hora de reacción. Las barras representan la media \pm del error estándar (n=3). Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía, y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05). ND: No detectado

Figura 5. Patrones de expresión del gen *GUS* en las versiones derivadas

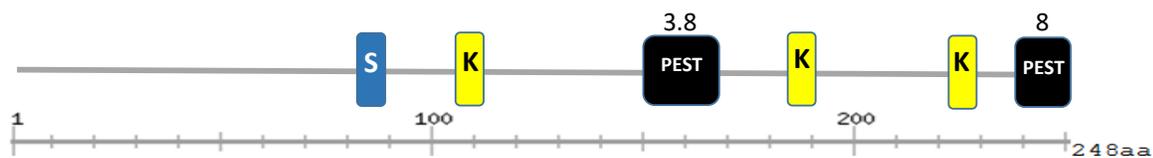
GUS::OpsDHN1. qRT-PCR de las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las construcciones GUS control, GUS::DHN1-ORF, GUS::PEST1, GUS::PEST2, GUS::PEST1+P2. Se analizaron plántulas de 15 días de edad de dos líneas independientes de cada construcción. Se utilizó 1 µg de RNA para la síntesis de cDNA. Como control de carga se empleó el gen *UBQ5* de *A. thaliana*. Para cada muestra, 10 µl del producto de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Figura 6. Ensayo histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS en líneas transgénicas de *A. thaliana* tratadas con el inhibidor del proteosoma 26S MG132.

Tinción histoquímica de GUS en hojas de *A. thaliana* de 10 días de edad, que expresan las construcciones GUS control y dos líneas independientes de la fusión GUS::DHN1-ORF y GUS::PEST1+2. A) Incubadas en medio líquido MS. B) Medio líquido MS suplementado con 150 µM de MG132, durante 3 h. C) Medio líquido MS suplementado con DMSO. D) Ensayo fluorométrico de la actividad de GUS de las construcciones con sus respectivos tratamientos, las barras de color indican cada uno de los tratamientos. La actividad de GUS representa la concentración de producto de MUG hidrolizado por mg de proteína total por hora de reacción. Las barras representan la media ± del error estándar (n=3). Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía, y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

Figura 1.

A



B

MAEEHQKGDNVNVESDRGLDFMKNKESGDEKKDQEEVIATEFHKKVEVSKEDKH DEN 60

KEGGLLHKLHRSDA **SSSSS** DEEEGDDEDKRRKKEKK **EKKGLKEKIKEKLP** GHHKEQEEE 120
 Segmento-S Segmento-K

QEDKQKDHHHHHDEEDTNIAIEKI **HVEEVIYSEPSYPAPPPPH** LEAEG **EKKGLLEKI** 180
 Valor de PEST: 3.8 Segmento-K

KDKLPG QHKKAEEAEHEVVPTATATVAEGEAQ **EKKGFLDKIKEKIP** GFHFKAPEEDK **KDVE** 240
 Segmento-K

CDQPPSST 248

Valor de PEST: 8

Figura 2.

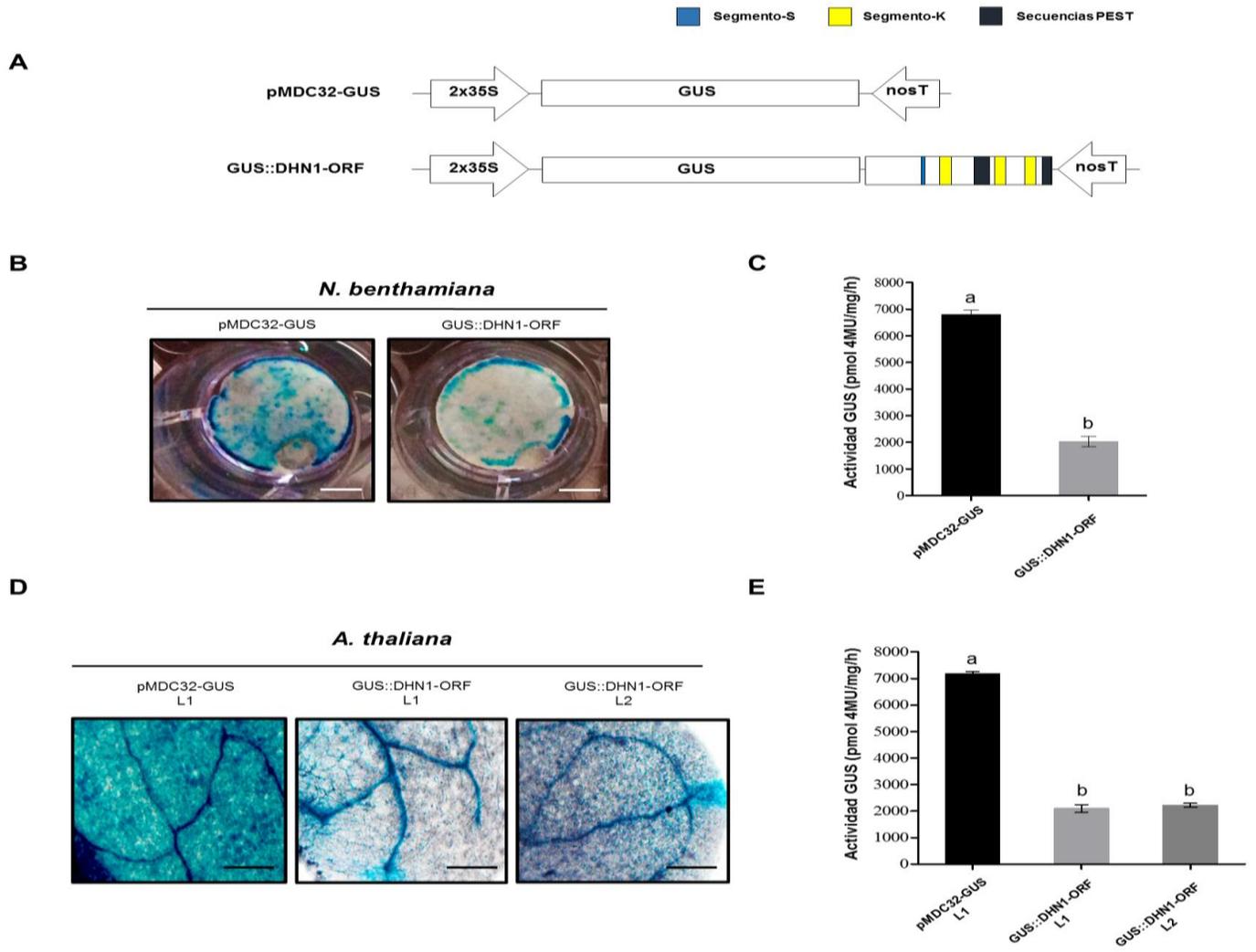
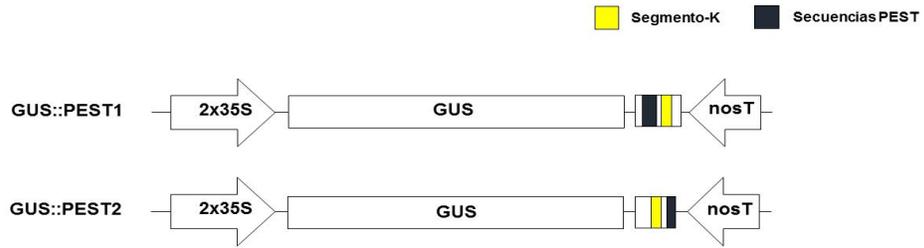


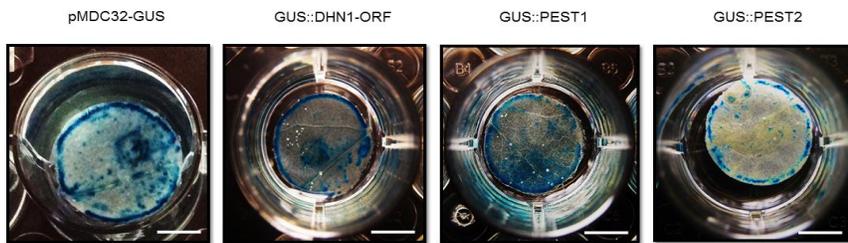
Figura 3.

A

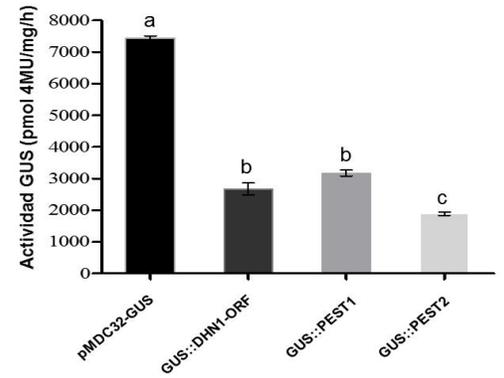


B

N. benthamiana

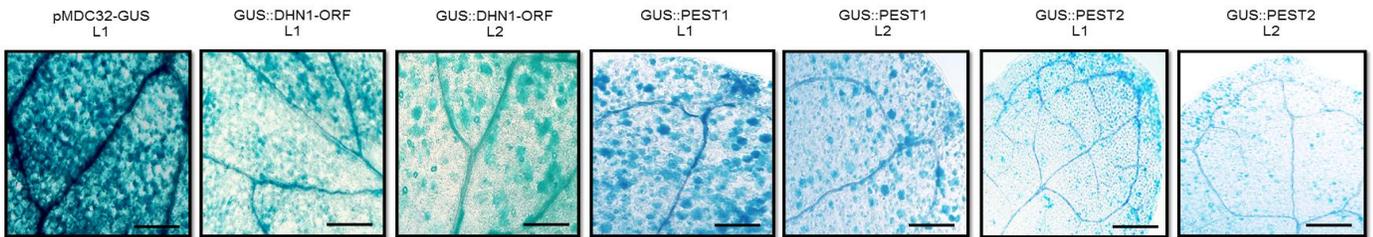


C



D

A. thaliana



E

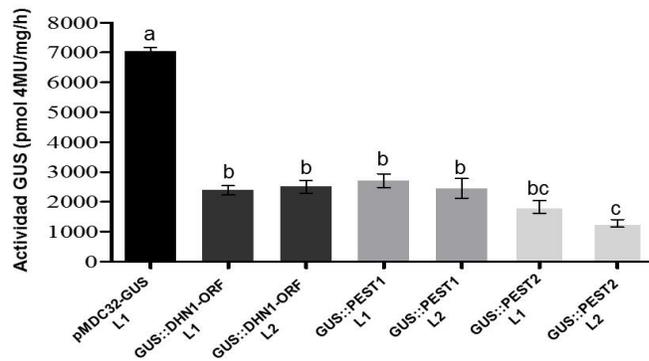


Figura 4.

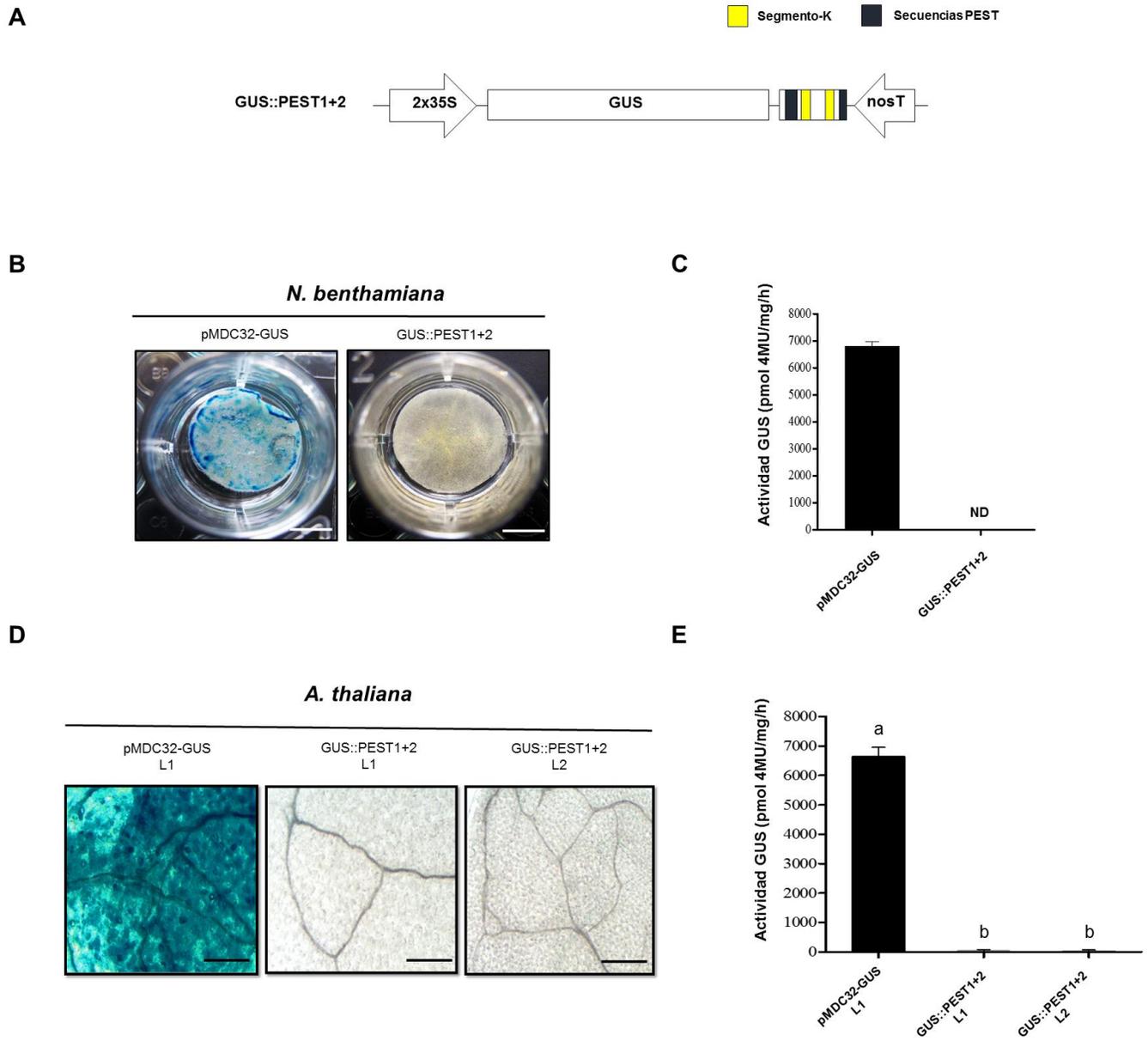
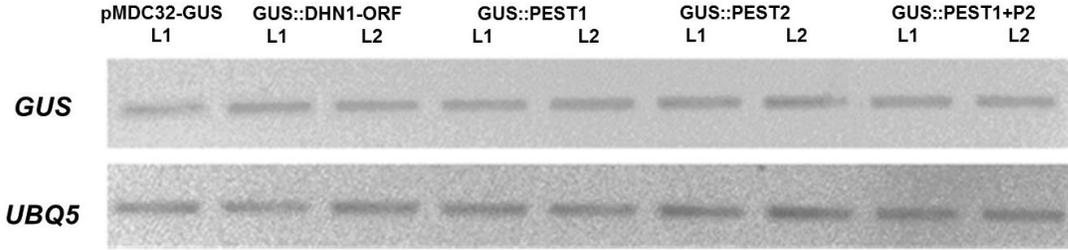


Figura 5.



Firuga 6.

A. thaliana

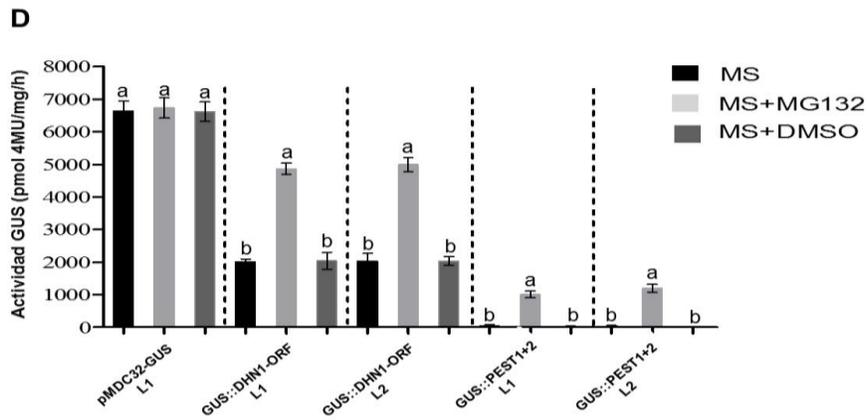
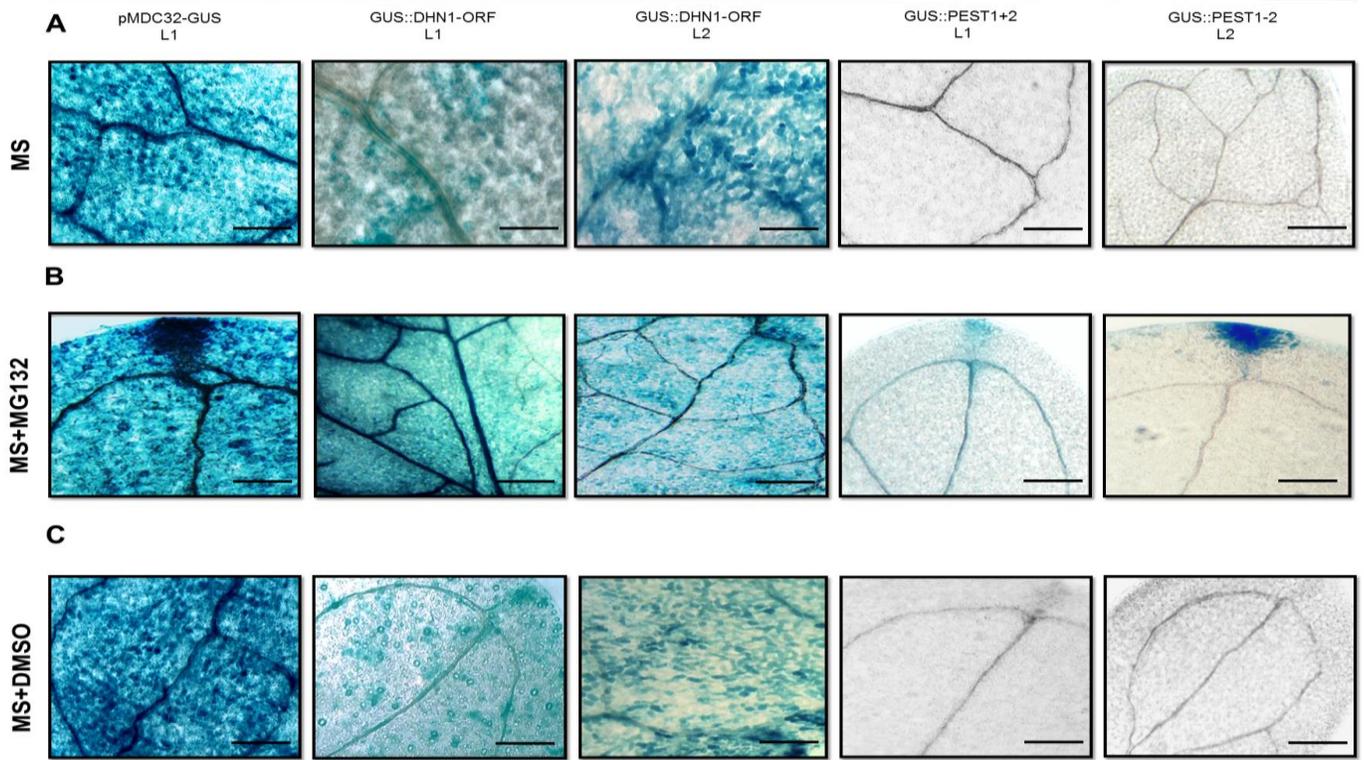


Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar las fusiones traduccionales.

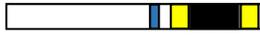
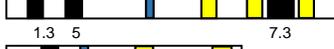
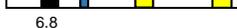
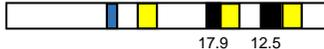
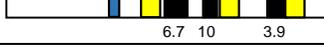
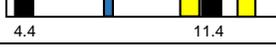
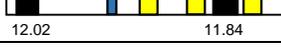
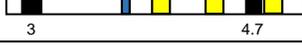
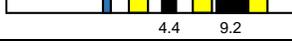
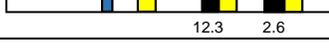
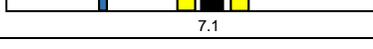
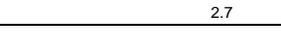
Nombre del oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>GUS</i>	5-GUS 5'-atgttacgtcctgtagaaacccaacc-3'	1812
	3-GUS 5'-ttattgtttgcctccctgctgcgg-3' (con codón de paro)	
	3-GUS 5'- <u>ggggtac</u> cttgtttgcctccctg-3'(sin codón de paro)	
<i>DHN1-ORF</i>	5-DHN1-ORF 5'- <u>ggggtacca</u> agcaaaaggatcatcatc-3'	747
	3-DHN1-ORF 5'-ttaagttgatgaagggggtgatcac-3'	
<i>PEST1</i>	5-PEST1 5'- <u>ggggtacca</u> agcaaaaggatcatcatc-3'	229
	3-PEST1 5'-aactgattggccgagggccttattgggaccacctcgt-3'	
<i>PEST2</i>	5-PEST2 5'- <u>ggtacc</u> cacaagaaggccgagg-3'	189
	3'PEST2 5'-ttaagttgatgaagggggtgatcac-3'	
<i>PEST1+PEST2</i>	5-PEST1+2 5'- <u>ggggtacca</u> agcaaaaggatcatcatc-3'	378
	3-PEST1+2 5'-ttaagttgatgaagggggtgatcac-3'	
qRT-PCR	5-GUS 5'-gaatacggcgtggatacgta-3'	141
	3-GUS 5'-attcatacctgttcaccgac-3'	
	5-UBQ 5'-ggagtgcctaacgcaacc-3'	129
	3-UBQ 5'-gctacaacagatcaagettcaac-3'	

En subrayado se muestra el sitio de restricción *Kpn1*

Tabla 2. Distribución de secuencias PEST en las subclases de DHNs ortólogas de plantas.

Tipo de DHN	Número total de proteínas	Número de proteínas con PEST	Porcentaje de proteínas con PEST (%)
SKn	42	31	74
YnSKn	43	8	19
Kn	14	6	43
YnKn	5	2	40
KnS	5	0	0
Total	109	47	43

Tabla 3. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo SKn.

Especie	Nombre y tipo de DHN	Localización de segmentos DHN y PEST
<i>Aquilegia coerulea</i>	AcoDHN1-SK ₂	
	AcoDHN2-SK ₂	
<i>Amborella trichopoda</i>	AtrDHN-SK ₃	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	COR47-SK ₃	
	ERD10-SK ₂	
	ERD14-SK ₂	
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdDHN1-SK ₃	
	BdDHN2-SK ₃	
<i>Cajanus cajan</i>	CajDHN-SK ₂	
<i>Capsicum annum</i>	CaDHN24-SK ₃	
<i>Citrus x paradisi</i>	CpDHN-SK ₃	
<i>Coffea canephora</i>	CcaDHN-SK ₃	
<i>Hordeum vulgare</i>	DHN8-SK ₃	
<i>Lycopersicum</i>	LyDHN-SK ₂	
<i>Malus domestica</i>	MdDHN8-SK ₃	
	MdDHN9-SK ₃	
<i>Musa acuminata</i>	MaDHN-SK ₂	
<i>Opuntia streptacantha</i>	OpsDHN1-SK ₃	

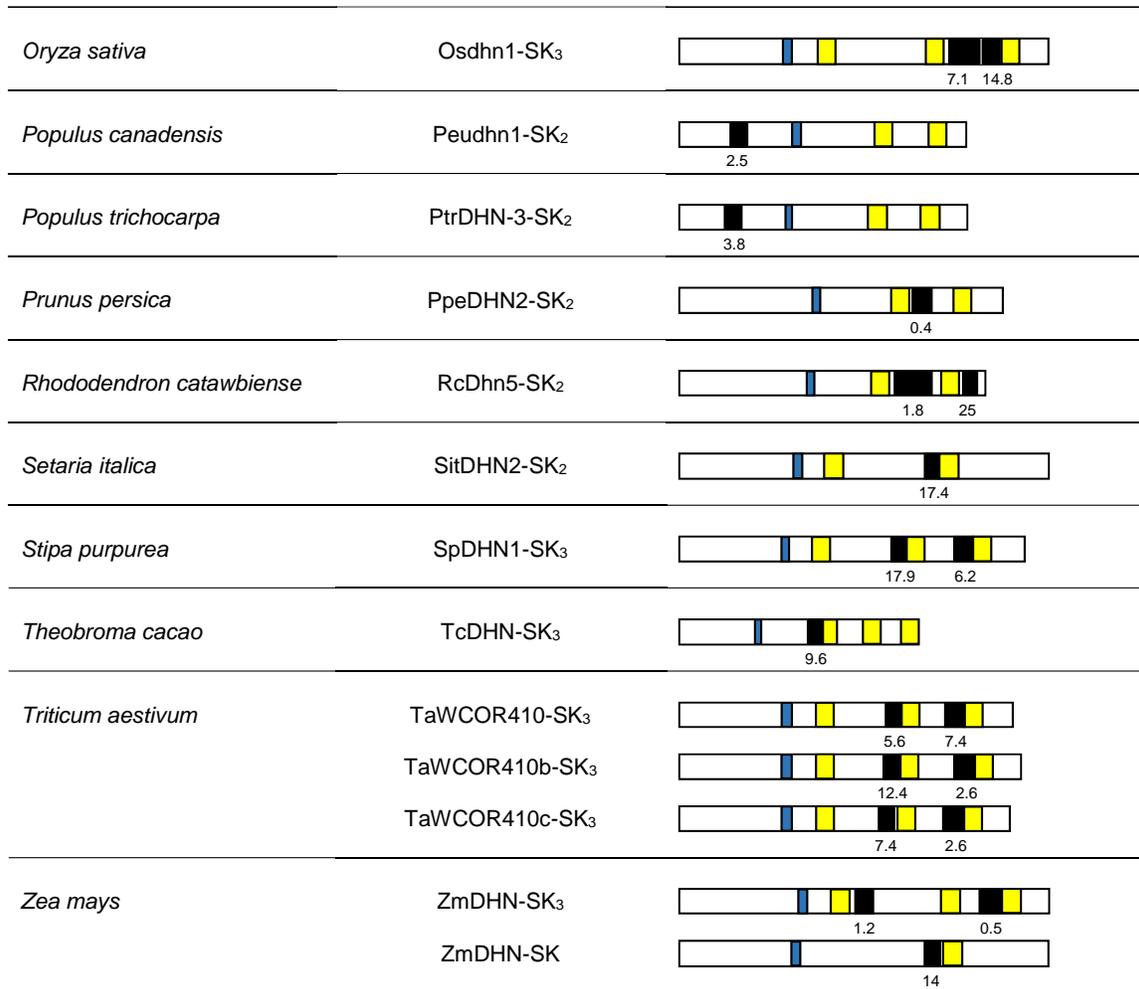


Tabla 4. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo YnSKn.

Segmento-Y
 Segmento-S
 Segmento-K
 Secuencias PEST

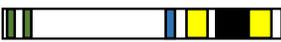
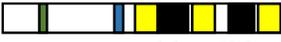
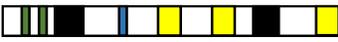
Especie	Nombre y tipo de DHN	Localización de segmentos DHN y pest
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Y ₂ SK ₂	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">14.9</p>
<i>Avicennia marina</i>	AmDHN1-YSK ₂	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">2.9</p>
<i>Malus domestica</i>	MdDHN1-YSK ₃	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">3.6</p>
	MdDHN2-Y ₂ SK ₃	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">10.2</p>
	MdDHN4-YSK ₃	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">0.6</p>
<i>Prunus pérsica</i>	PpeDHN3-Y ₂ SK ₃	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">2.9</p>
<i>Populus trichocarpa</i>	PtrDHN-2-Y ₃ SK ₂	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">4.9</p>
<i>Utricularia Gibba</i>	UgDHN-YSK	 <p style="text-align: right; margin-right: 10px;">1.6</p>

Tabla 5. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo Kn.

 Segmento-K
  Secuencias PEST

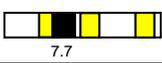
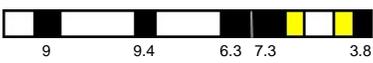
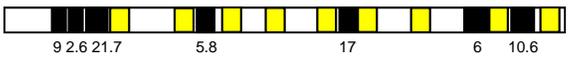
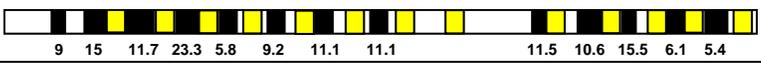
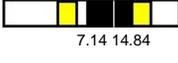
Especie	Nombre y tipo de DHN	Localización de segmentos DHN y PEST
<i>Malus domestica</i>	MdDHN7-K ₃	
<i>Physcomitrella patens</i>	PpDHNB-K ₂	
	PpDHNC-K ₂	
<i>Populus trichocarpa</i>	PtrDHN-1.1-K ₉	
	PtrDHN-1.2-K ₁₃	
<i>Oryza sativa</i>	OsLIP9-K ₂	

Tabla 6. Localización de los segmentos de DHNs y de secuencias PEST en dehidrinas del tipo YnKn.

Segmento-Y
 Segmento-K
 Secuencias PEST

Especie	Nombre y tipo de DHN	Localización de segmentos DHN y PEST
<i>Malus domestica</i>	MdDHN6-YK ₃	
<i>Physcomitrella patens</i>	PpDHN-Y ₁₁ K	