



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA NOD22 Y LA AtAc22.1;
DOS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE BAJO PESO MOLECULAR DE PLANTAS.”**

T E S I S

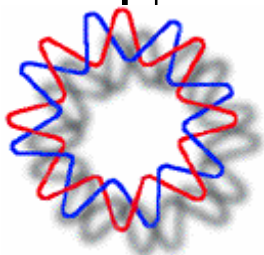
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:
BIÓLOGO. JONATHAN ISRAEL RODRÍGUEZ LÓPEZ.

DIRECTOR DE TESIS: DRA: CLAUDIA DIAZ CAMINO.

CUERNAVACA, MORELOS

2010.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

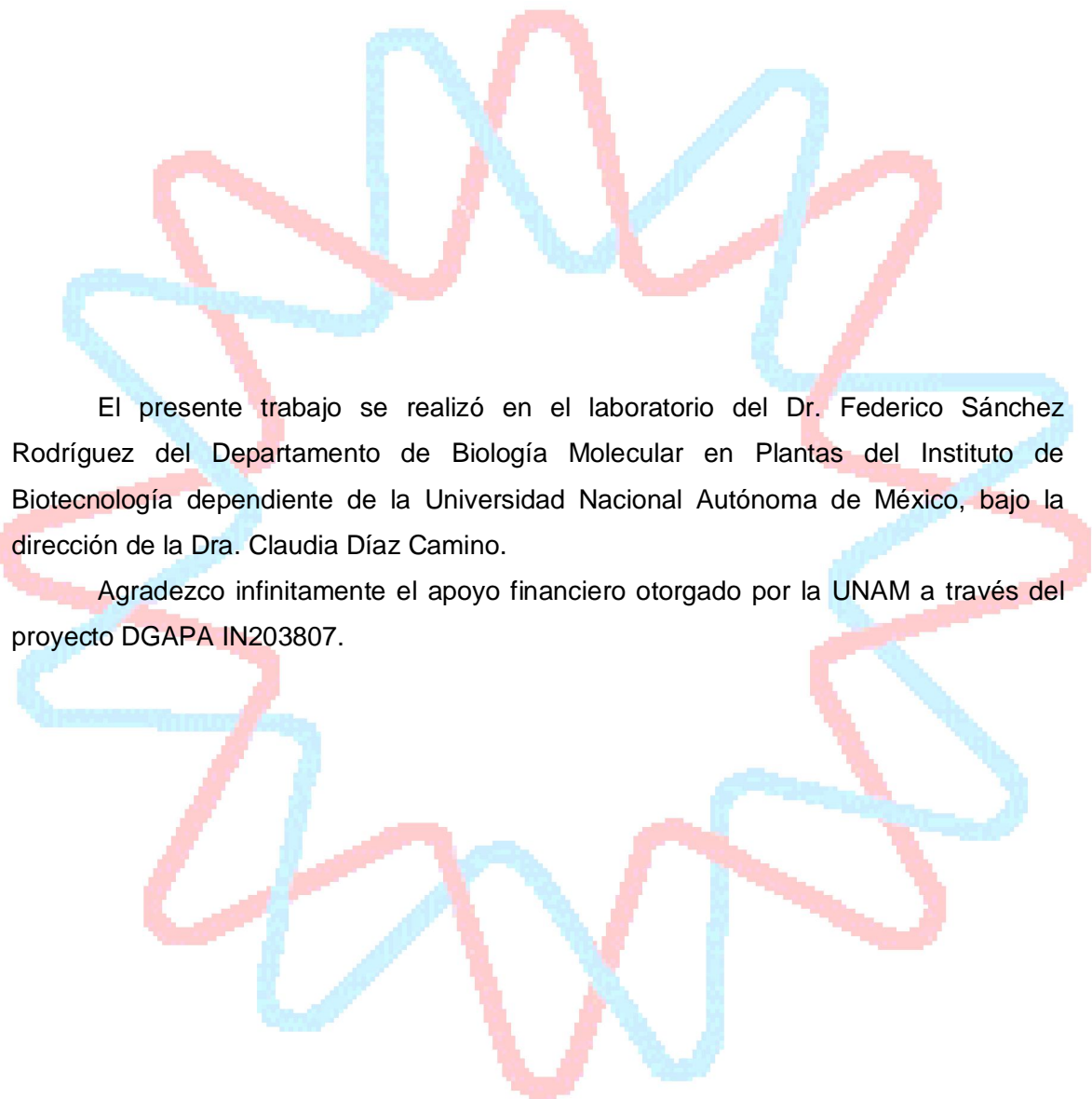


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez Rodríguez del Departamento de Biología Molecular en Plantas del Instituto de Biotecnología dependiente de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Claudia Díaz Camino.

Agradezco infinitamente el apoyo financiero otorgado por la UNAM a través del proyecto DGAPA IN203807.

La decepción es la rabia de los débiles.

House. MD.

....la vida está en el camino, no en la llegada. El último puerto es la muerte.

Jorge Molist.

La imaginación es más importante que el conocimiento.

Albert Einstein.

La característica principal de un genio es saber sin haber aprendido.

Ambrose Bierre.

Es de gran alivio conocer las propias limitaciones.

Albert Einstein.

No todo el conocimiento humano es fruto de lo científico.

Jorge Molist.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo es la conclusión de los esfuerzos realizados en mi tesis de licenciatura que me permitieron durante más de dos años adquirir más conocimiento, no solo como investigador el cual deseo fervientemente llegar a ser algún día, sino tener la experiencia de ser mejor persona en lo que yo juzgo ser mejor, espero no omitir a nadie la hora de dar las gracias:

Primero y como siempre será a mis padres que con su amor, apoyo, esfuerzo, paciencia y una infinidad de consejos, porque siempre me han tenido confianza y jamás me dejaron sólo.

Al Dr. Federico Sánchez por darme la oportunidad de pertenecer a un grupo de investigación y por su tolerancia y sus grandes enseñanzas que día con día aprendí.

A la Dra. Claudia Díaz Camino por que en esta ocasión le toco trabajar conmigo, porque siempre me apoyo y respeto mis ideas, con las cuales ella contribuyo y enriqueció demasiado.

A Gabriel Guillén más que un maestro un amigo, gracias al cual aprendí la mayoría de las cosas que he desarrollado en mi trabajo de licenciatura y maestría y también por todas esas parrandas en las que nos des estresábamos con toda la banda.

A todas las personas del laboratorio a Juan Olivares, Margarita Rodríguez y Georgina Estrada por siempre tener la paciencia por ayudarme a resolver mis dudas y por sus alentadores comentarios.

A mis amigos como: Israel e Iván Solano y a Rubén “el greñas” que aunque están lejos siempre han sido y serán mis mejores amigos.

Particularmente gracias a Ale Zayas y Lucio que gracias a ellos pudimos hicimos el trabajo bio-informático, ya que sin su ayuda no habría podido hacerlo solo.

A todos los amigos que han evolucionado conmigo en cada borrachera, en cada confesión, ahí va la lista: Fátima, Omar “el jarana”, Alexxa, Pablo “el gordo”, Liliana “la culerita”, Jesús, Bertha, Gerardo (pacheco), Eder, Ared, Cinthia, Nancy Sofia, Nidia, Amed, los genómicos Luis Pedro, Rodrigo y Daniela, a gran amigo que llevo desde argentina el Germaaaaaaaaaaan.

Contenido

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 7 |
| Características Generales de las sHsps..... | 8 |
| Identificación y características funcionales de la familia de las sHsps..... | 9 |
| Sustratos de sHsps..... | 13 |
| Estructura y oligomerización de las sHsps..... | 15 |
| Las sHsps durante el desarrollo..... | 17 |
| Las α -cristalinas y sHsps en enfermedades..... | 18 |
| Las sHsps en plantas..... | 19 |
| Antecedentes..... | 23 |
| Hipótesis..... | 26 |
| Objetivos Generales..... | 26 |
| Objetivos Específicos..... | 26 |
| Materiales y métodos..... | 27 |
| Resultados..... | 36 |
| Discusión..... | 52 |
| Conclusiones..... | 60 |
| Perspectivas..... | 61 |
| Literatura citada..... | 62 |
| Abreviaciones..... | 72 |
| Figuras suplementarias..... | 73 |

Introducción.

La traducción a proteínas constituye la una etapa crucial en el mecanismo de flujo expresión de la información genética. Es en este proceso donde tiene lugar la síntesis de la proteína específica que ha de cumplir una función determinada en la célula o el organismo, con lo cual la información contenida en los genes quedará totalmente expresada.

Durante este proceso, los aminoácidos son enlazados a través de una serie de enlaces peptídicos para formar una cadena polipeptídica. Esta cadena adopta una conformación energéticamente favorable durante la cual los aminoácidos hidrofóbicos son orientados hacia el interior de la proteína mientras que los residuos hidrofílicos se encuentran mayoritariamente expuestos hacia el solvente. En el año 1960, Anfinsen demostró que la información requerida para formar la estructura nativa de una proteína está contenida en la secuencia de aminoácidos. De acuerdo con la paradoja de Levinthal que enuncia que: una de las principales características de las proteínas es encontrar su estructura nativa dentro de un extenso número de conformaciones en el espacio (Liberek, *et al*, 2008).

Actualmente, se conoce que las principales fuerzas que contribuyen con la estabilización de la estructura nativa de las proteínas son proporcionadas por la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals, el efecto hidrofóbico de ciertos aminoácidos contenidos en la secuencia primaria y en algunos casos, la formación de enlaces covalentes (Pace *et al*, 1996). Estas fuerzas, además de contribuir con la estabilidad, intervienen en determinar que dicha cadena polipeptídica adopte su estructura secundaria y terciaria, dicho proceso que se le denominó "plegamiento proteico". Un cuarto nivel de complejidad está dado por la formación de las proteínas pueden adoptar una estructura cuaternaria que se conoce como: oligomerización o ensamblaje, dentro de la cual se incluyen varios monómeros del mismo polipéptido.

El plegamiento de una proteína recién sintetizada puede iniciarse desde que el extremo N-terminal sale del canal del ribosoma. Si bien las proteínas contienen la información necesaria para lograr su estructura nativa, este hecho es improbable debido a la compleja dinámica del medio celular, que las expone a un sinnúmero de interacciones inadecuadas de las que provocan su agregación. Por otro lado, factores ambientales, como son el estrés biótico o abiótico, contribuyen al proceso desestabilizante de las

proteínas, induciendo la formación de agregados o intermediarios del plegamiento que conllevan a la pérdida de su función o degradación. Para contender con estas condiciones, las células de los organismos han desarrollado diversos mecanismos de protección, uno de los cuales son la acción de chaperonas moleculares y enzimas que pueden catalizar lentamente los pasos del plegamiento, evitando las interacciones no productivas con otras proteínas o previniendo la formación de intermediarios no plegados.

Uno de los mecanismos para evitar la formación de intermediarios no plegados o de agregados proteícos es la síntesis de un grupo de proteínas denominado: Proteínas de Choque Térmico (o HSP's, por sus siglas en inglés), que conforman a una familia de proteínas que se encuentran distribuidas en todos los organismos y que se expresan en respuesta a los cambios repentinos del medio que pueden provocar que las proteínas pierdan su estructura nativa y tiendan a perder su función, estos tipos de estrés son el incremento o disminución de las temperaturas, la presencia de metales pesados, durante la sequía, tras la exposición a los rayos UV, durante el estrés oxidativo, en presencia de un estrés hídrico ó en presencia de elevadas concentraciones de iones y gases (CO₂, O₃). También se ha demostrado que estas proteínas se expresan diferencialmente durante el desarrollo, proceso durante el cual se incrementa la síntesis de proteínas esenciales para el desarrollo que podrían presentar una tendencia a no plegarse adecuadamente o formar agregados proteícos (Sun, *et al*, 2002).

Características Generales de las sHsps.

Las Hsp's están clasificadas en familias con base en la identidad de su secuencia y su peso molecular: Hsp 110, Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60, Hsp 40, Hsp 10 y la familia de las sHsp (small heat shock proteins, por sus siglas en inglés), que pesan entre 15-42 kDa y las α -cristalinas (Feder & Hofman, 1999; Wang., *et al* 2004).

Las sHsp's se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes, presentan un peso molecular de 15-42 kDa y tienden a formar oligómeros de 9 a 50 subunidades (Haslbeck, 2002; Wang, *et al* 2004). Se encuentran presentes en los diferentes compartimentos celulares en plantas y en su mayoría en el citoplasma de vertebrados, invertebrados, levaduras y bacterias (Haslbeck, 2002).

En estudios previos de análisis comparativos entre las diversas secuencias de aminoácidos de las sHsp's, se reveló que estas proteínas presentan un dominio altamente conservado de alrededor de 90 aminoácidos, al cual se le denomina dominio α -cristalino (ACD, por sus siglas en inglés) debido a su alta identidad con el dominio característico de las proteínas α -cristalinas que se encuentran en el ojo de vertebrados. Datos experimentales sugieren que el dominio α -cristalino de las sHsps reconoce estructuras no nativas las cuales presentan un incremento de superficies hidrofóbicas y un bajo grado de plegamiento. Por lo anterior, se cree que las sHsps y el sustrato interaccionan por medio de regiones hidrofóbicas (Ganea, 2001).

El ACD tiene dos secuencias consenso (I y II) que se encuentran separadas por un dominio hidrofílico de longitud variable. Estas proteínas tienen en el extremo amino terminal una región hidrofóbica no conservada que es requerida para la oligomerización y para la unión al sustrato. Este tipo de proteínas también presentan una secuencia en el carboxilo terminal que contribuye a su estabilidad y a la actividad de chaperona (Haslbeck, 2002). Se ha demostrado que el dominio α -cristalino presenta un plegamiento similar al de las inmunoglobulinas, parecido a un sandwich constituido de dos capas de tres a cinco β -plegadas antiparalelas.

A diferencia de las chaperonas de alto peso molecular que hidrolizan el ATP para poder llevar a cabo su función, las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular no requieren de la hidrólisis de ATP (Ganea, 2001). Otra diferencia entre estos dos tipos de chaperonas es que las sHsps evitan la agregación y la degradación de las proteínas desnaturalizadas y únicamente las mantienen en un estado de plegamiento intermedio, tanto en la síntesis de *nov*o como en condiciones de estrés por lo que, posteriormente transfiere el sustrato a los sistemas de chaperonas de alto peso molecular, (por ejemplo, a los complejos de la HSP70/40 o la Hsp60/10 que finalizan el proceso de plegamiento) (Figura 1) (Wang, *et al*, 2004, Liberek, *et al*, 2008).

Identificación y características funcionales de la familia de las sHsps.

Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular fueron identificadas en *Drosophila melanogaster* y bovinos, entre la cuales presentaban una identidad del 55% en el dominio α -cristalino y se sintetizan bajo condiciones de estrés calórico y en diferentes

etapas de la embriogénesis. Las sHsps de la mosca de la fruta fueron denominadas DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 y DmHsp27 y se sintetizan bajo condiciones de estrés calórico y en diferentes etapas de la embriogénesis de la mosca (Ingolia & Craig, 1982). Posteriormente, se identificaron homólogos de estas proteínas en plantas, Vierling y col. (1986), identificaron que en la soya se acumulan dos polipéptidos de una masa de 27 y 22kDa y en chícharo y en maíz con masas de 21 y 24kDa respectivamente, todas localizadas en el cloroplasto. Estas proteínas están presentes constitutivamente e incrementan su acumulación después de un choque térmico. Uno de los primeros trabajos donde se reporta que las sHsps funcionan como chaperonas moleculares es el de Jakob *et al.* (1993) donde demostraron que la sHsp 25 de ratón y la sHsp 27 de humano son capaces de renaturalizar la α -glucosidasa de levadura y la citrato sintasa de corazón, respectivamente, las cuales habían sido previamente expuestas a elevadas temperaturas, comprobando que la presencia de ambas sHsps o de una sola prevenían la agregación. En chícharo se identificaron las chaperonas Hsp17.7 y Hsp 18.1 y se demostró que actúan como chaperonas moleculares. Además, se determinó que estas proteínas forman complejos de 12 subunidades, los cuales previenen la agregación de enzimas susceptibles al calor como la citrato sintasa y la lactato deshidrogenasa (Lee, *et al.*, 1995).

En un trabajo realizado por Lee & Vierling (2000) demostraron que DnaK/DnaJ/GrpE de *E. coli*, la Hsp 70 de *S. cerevisiae* y de humano pueden interactuar con la Hsp18.1 de chícharo, no físicamente, pero si secuencialmente para regresar a su estado nativo a la proteína luciferasa la cual ha sido previamente desnaturalizada por calor. De este trabajo se concluyó que la Hsp18.1 sirve como un reservorio de proteínas desnaturalizadas uniéndose a ellas y “presentándolas” a las Hsp 70 para ser plegadas nuevamente, lo cual respalda el mecanismo de acción propuesto por Carver y col. en el 2003 y por Liberek y col. en el 2008.

Las sHsps están relacionadas con la inhibición de la apoptosis, la organización del citoesqueleto y en las propiedades refractivas del ojo (Haslbeck, 2002). Bellyei y col. (2006) describen que la sobre-expresión de la Hsp16.2 de humano interviene en disminuir la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma y suprime la activación proteolítica de la caspasa-3 en células NIH-3T3 inducida por etopósido. Además, la Hsp16.2 presenta la característica de suprimir la formación de fibras tóxicas del péptido β -amiloide, causante de la enfermedad denominada amiloidosis, asociado a los plegamientos incorrectos de este péptido y que conducen a la formación irreversible de

agregados fibrilares insolubles llamados amiloides, los cuales interfieren con el desarrollo de las diversas funciones celulares (Fonte, *et al*, 2008).

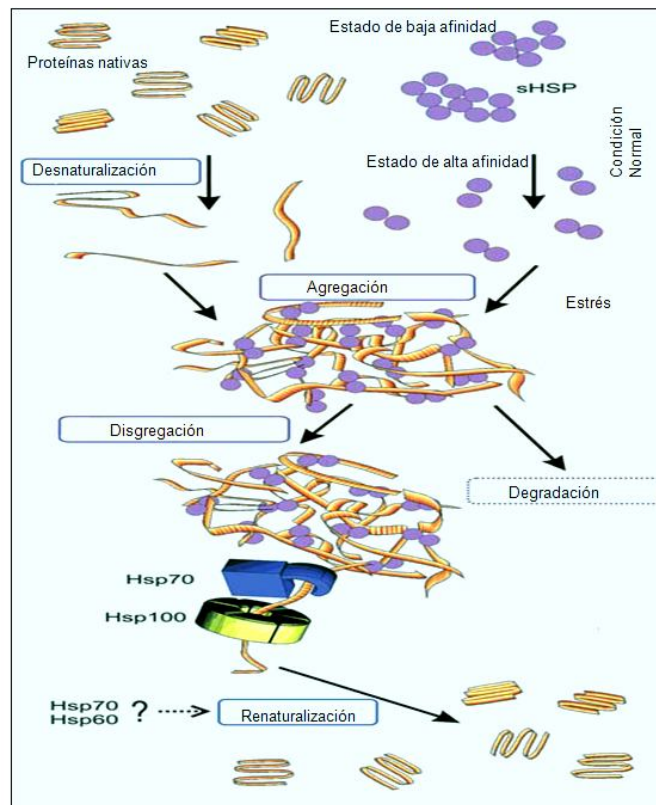


Figura 1. Mecanismo de acción de las sHsps. Las sHsps forman estructuras oligoméricas que intercambian permanentemente subunidades. Las sHsps presenta dos estados: uno inactivo de baja afinidad bajo condiciones normales (oligómeros) y en un estado de alta afinidad bajo condiciones de estrés (dímeros). Cuando esto ocurre las proteínas nativas pierden su estructura parcial o totalmente por lo que tienden a formar agregados. Las sHsps se unen a los agregados permitiendo facilitar su disgregación. La recuperación de la proteína sustrato al estado nativo lo puede realizar con la ayuda de chaperonas de alto peso molecular como son la Hsp70 y la Hsp100 que hacen que el proceso de disgregación sea mas eficiente, para posteriormente transferir y completar el plegamiento del sustrato por el sistema de chaperonas Hsp70 o Hsp60. (Tomado y modificado de Librek *et al.*, 2008)

La Hsp27 de humano es el miembro de la familia de las sHsp's más estudiado, debido a los diferentes papeles en los que se encuentra involucrada durante el proceso de apoptosis. La Hsp27 es expresada en los principales tejidos y líneas celulares y se expresión incrementa en respuesta a diferentes estímulos como son el α -factor de necrosis tumoral TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β), H₂O₂, y otras moléculas oxidantes (Lanneau, *et al*, 2008). Una de las principales funciones de la Hsp27 es la de prevenir la

apoptosis interaccionando con caspasa-3 y regular su actividad, así como, evitar la activación de pro-caspasa 9 debido a una interacción directa con el citocromo c cuando es liberado de la mitocondria hacia el citoplasma (Bruey, *et al* 2000; Lanneau, *et al*, 2008). Recientemente se ha demostrado que la Hsp27 inhibe la activación de Bax y la apoptosis por medio de un mecanismo dependiente de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa).

Por otro lado, Mao y col. (2004) demostraron que a diferencia de la Hsp27, la cristalina- α A y la cristalina- α B, interaccionan con dos reguladores apoptóticos: Bax y Bcl-X_s, cuando en células epiteliales del lente de humano son sometidas a estrés osmótico producido por estaurosporina (un inductor de apoptosis), etopósido o sorbitol, las α -cristalinas previenen que estos reguladores apoptóticos viajen del citosol a la mitocondria, de tal forma que, preservan la integridad de la mitocondria, restringen la liberación del citocromo c y bloqueen la degradación de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa, sustrato de caspasa-3). Además, de que la cristalina- α B previene la apoptosis inducida por H₂O₂, interaccionando con pro-caspasa-3 y la parcialmente procesada pro-caspasa-3 evitando la activación de la caspasa-3. Posteriormente, Liu y col. (2007) demostraron que la cristalina- α B interacciona con p53, en células tipo C₂C₁₂ de ratón que fueron sometidas a un estrés oxidativo provocado por H₂O₂ y observan que la principal unión de la cristalina- α B con p53, se produce en el citoplasma evitando de esta forma la entrada de p53 a la mitocondria e inhibiendo las funciones pro-apoptóticas de esta proteína y regulando negativamente la apoptosis.

Anteriormente, se han mencionado las funciones anti-apoptóticas de la cristalina- α A, para el estudio de la formación de cataratas en ratones se sustituyó la arginina 49 por una cisteína. La mutación en la cristalina- α B-R49C causa múltiples efectos *in vivo* originado por cambios en la interacción con otras cristalinas, activando Bcl-2 en las células fibrosas del lente sufriendo muerte celular y por otro lado, un incremento en la insolubilización de proteínas, la pérdida de la transparencia del lente, una disminución en el tamaño de los ojos y la formación de cataratas (Xi, *et al*, 2008).

Uno de los ejemplos más controversiales de las sHsps debido a que se pensaba que sólo presentan un papel de chaperonas moleculares, es la Hsp12.6 de *Brugia malayi*, un nemátodo que causa filariasis en humanos. Esta sHsp presenta la característica de que se acumula en las diferentes etapas infectivas del parásito para evadir la respuesta inmunológica, simulando la función de la interleucina-10 (IL-10) de tal forma que evitaría la respuesta inmune regulada por la IL-10 (Gannasekar, *et al*, 2008).

Sustratos de sHsps.

Por lo general, las chaperonas de bajo peso molecular están involucradas en conferir estabilidad al proteoma de una célula, por lo que se han visto implicadas en proteger a diversas proteínas implicadas en la transducción de señales, el metabolismo, el ciclo celular, la transcripción y la traducción (Basha, *et al*, 2004). Por ejemplo la p26 de *Artemia franciscana* se asocia con la tubulina previniendo su desnaturalización e incrementa la resistencia de los embriones durante el estrés (Sun & MacRae, 2005). De igual forma, se ha reportado que la cristalina- α B interacciona con la tubulina uniéndose a proteínas asociadas a los microtúbulos incrementando la estabilidad de estos. Se ha estudiado ampliamente la interacción de sHsps con la actina, particularmente las Hsp25/27 que intervienen en la polimerización de actina. En el modelo propuesto por Mounier y Arrigo (2002) se describe que las sHsps pueden encontrarse en oligómeros no fosforilados, previo a un estrés, que no afecta la polimerización de actina, cuando la célula sufre un estrés, las sHsps se fosforilan y se disgregan tendiendo a formar pequeños oligómeros fosforilados que se unen a filamentos de actina estabilizándolos, previniendo o neutralizando la acción dañina que provocaría la desestabilización del citoesqueleto (Figura 2).

Otro posible sustrato de las sHsps es la membrana celular donde se ha comprobado que la Hsp16.3 es la proteína más abundante en la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* y que forma dímeros cuando interacciona con lípidos cargados positivamente, regulando la generación de especies reactivas de oxígeno por un mecanismo reversible de sulfoxidación de una metionina disminuyendo de esta forma la oxidación de los lípidos no saturados de la membrana y protegiendo a la bacteria del estrés oxidativo generado por la acción de los macrófagos (Sun & MacRae, 2005).

Por otro lado, Kashlan y col. en el 2007 demostraron que la cristalina- α A interviene en la regulación de un canal de sodio (ENaC) localizado en las células epiteliales de los ductos colectores de la corteza de la nefrona, que se expresa en respuesta a la deshidratación o a la falta de sales. En este trabajo los autores demostraron que la cristalina- α A co-inmunoprecipita con la sub-unidad α del canal ENaC y que participa en su ensamble y desensamble, regulando últimamente su degradación vía proteasoma en condiciones no estresantes para la nefrona.

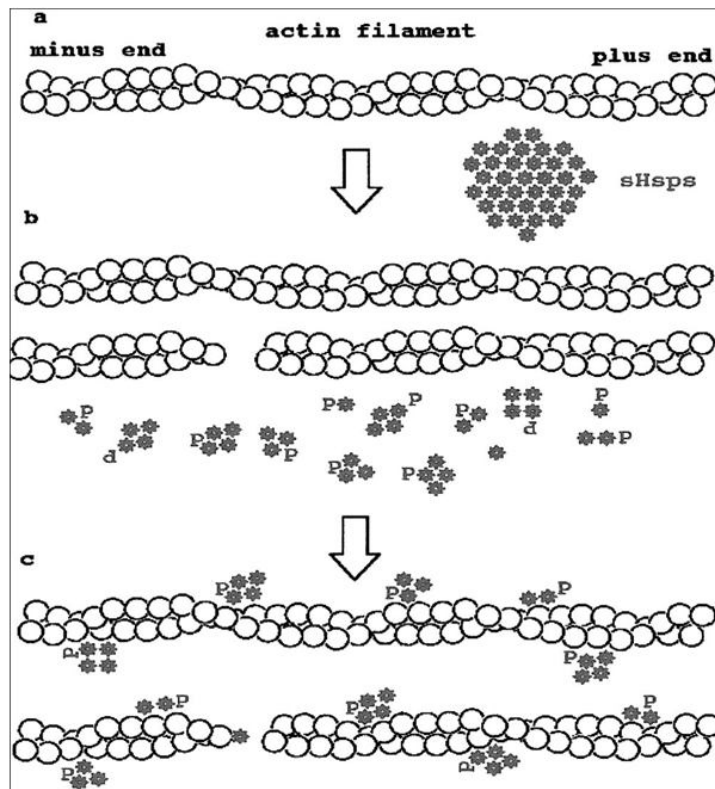


Figura 2. Modelo de protección de los microfilamentos de actina por sHsps. **A)** En células no estresadas las sHsps forman complejos de alto peso molecular no fosforilados. **B)** En la respuesta temprana al estrés por calor u otros tipos de estrés, las sHsps son fosforiladas y se disgregan, en algunos casos, hay una rápida hiper-oligomerización y desorganización del citoesqueleto. **C)** Las sHsps fosforiladas se organizan en pequeños oligómeros que pueden interactuar directa o indirectamente con la F-actina, protegiendo de algún daño a los filamentos de actina liberados y promoviendo su reorganización. Los monómeros no fosforilados de sHsps pueden unirse al final de los filamentos de actina y participar en la regulación del ensamblaje de los microfilamentos. (Tomado de Mounier & Arrigo, 2002).

Diferentes sHsps se localizan en el núcleo o en el nucléolo. Por ejemplo, la Hsp27 y la cristalina- α B de humano se unen al nucléolo y a los poros nucleares e inmunolocalizan con el factor SC35 (que forma parte de la maquinaria de maduración del mRNA), por lo tanto, a estas sHsps se les ha adjudicado un papel en la regulación de procesos moleculares y en la protección de proteínas esenciales en estos mecanismos (Rijk *et al*, 2003).

Estructura y oligomerización de las sHsps.

Las sHsps están presentes en células de plantas y de animales formando agregados de 200 kDa hasta 800 kDa e incluso partículas de 1 MDa (Neumann, 1989), ensamblándose en forma de barriles donde pueden unirse de 9 a 50 subunidades (Haslbeck, 2002). Un claro ejemplo de la formación de estos complejos de alto peso molecular se reporta en el trabajo de Nover y col. (1983), donde utilizaron cultivos de células en suspensión de tomate (*Lycopersicon peruvianum*) que fueron sometidas a choque térmico. En este trabajo, se reportó que una sHsp de 17 kDa forma gránulos denominados “gránulos de choque térmico” (HSG, por sus siglas en inglés), en donde también se encuentra la Hsp70; en este trabajo se concluye que las sHsps interactúan con las Hsps y juntas confieren tolerancia al estrés por elevadas temperaturas y contribuyen de esta manera a la renaturalización de proteínas desnaturalizadas por calor.

Una de las características principales de las sHsps es su tendencia a formar homo-oligómeros de alto peso molecular. Esta característica es un pre-requisito para la actividad de chaperona en la mayoría de las sHsps (Narberhaus, 2002). Por ejemplo, la Hsp16.3 de *M. tuberculosis* tiende a formar oligómeros de 12 subunidades (Figura 3A), la Hsp16.5 de *Methanocaldococcus jannaschii* forma agregados a manera de “donas” de 24 subunidades (Figura 3B) y la Hsp31 de *Escherichia coli* tiende a formar dímeros (Quigley *et al*, 2004). Esta tendencia también es mantenida por sHsps en eucariontes, como la Hsp26 de *S. cerevisiae* que se ensambla a partir de 24 subunidades (Figura 3A), la Hsp16.9 de *Triticum aestivum* que forma dobles anillos de 12 subunidades (Montfort *et al*, 2001) (Figura 3C) y la Hsp16.5 y la cristalina- α B de humano de 16 subunidades (Haslbeck *et al*, 2005). Otro ejemplo claro es la Hsp25 de ratón, que se encuentra por lo general en forma de tetrámero y tiende a ensamblarse en trímeros de tetrámeros (Narberhaus, 2002).

Actualmente, existe la cuestión de si las sHsps solo tienden a formar homo-oligómeros o pueden estar presentes en la célula o en diferentes compartimentos celulares formando hetero-oligómeros. Al respecto, con el aislamiento de las α -cristalinas de los ojos de vertebrados se ha demostrado que estas se encuentran formando hetero-oligómeros de cristalina- α A y cristalina- α B con una estequiometría de 3:1. Además, estas α -cristalinas pueden interactuar con otras Hsps, como la cristalina- α B de humano, que co-purifica con la Hsp28, o la cristalina- α B de rata con la Hsp27 (Zantema *et al*, 1992;

Kato *et al*, 1992). Helm y col. demuestran que la Hsp18.1 y la Hsp17.7 de chícharo, dos sHsps de citosol pertenecientes a la clase I y II, respectivamente, tienden a formar hetero-oligómeros *in vitro*. Aunque se sabe que estas dos sHsps tienden a formar estrictamente homo-oligómeros *in vivo*. De igual forma, Painter y col. (2008) demuestran que dos sHsps de *Arabidopsis*, la Hsp18.1 y la Hsp17.6 pertenecientes a la clase I localizadas en el citosol, tienden a formar dodécmeros que pueden estar constituidos de ambas sHsps, de tal manera, que la formación del hetero-oligómeros se proporciona de un manera secuencial incorporando dímeros de una sHsp e intercambiándolo por un dímero de la otra sHsp.

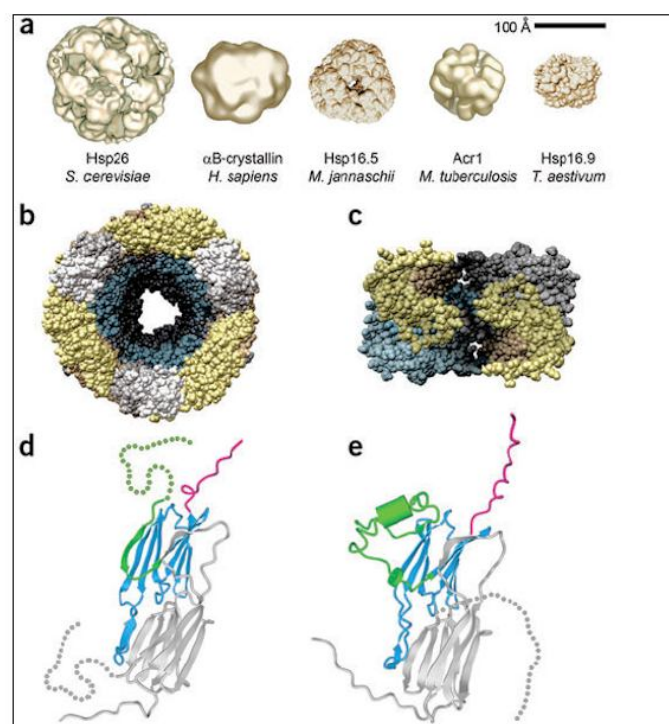


Figura 3. Estructuras secundarias y cuaternarias de diferentes sHsps. **A)** Las estructura cuaternaria de diferentes sHsp's se determinó por cyo-EM o cristalografía de rayos X. La Hsp26 de *S. cerevisiae* (24 subunidades, determinada por cryo-EM), α B-cristalina de humano (16 subunidades, por cyo-EM), Hsp16.5 de *M. jannaschii* (24 subunidades, por cristalografía), Acr1 de *M. tuberculosis* (12 subunidades por cryo-EM) y Hsp16.9 de *T. aestivum* (12 subunidades por cristalografía); **B)** La estructura cuaternaria de la Hsp16.5 de *M. jannaschii* consta de 24 subunidades idénticas arregladas en forma de un tetraedro esférico con un hueco en el centro; **C)** Dodecámero de wHsp16.9, el cual está constituido por dos anillos de 6 sub-unidades cada uno; **D)** Dímero de la Hsp16.5 de *M. jannaschii* unidos por una región hidrofóbica altamente conservada (IXIV); **e)** Dímero de la Hsp16.9 de *T. aestivum*. En verde el dominio N-terminal. En azul el dominio alfa cristalino y en rosa el dominio C-terminal. Los residuos punteadas son regiones no determinadas en la estructura (Tomado de Haslbeck *et al.*, 2005).

Las sHsps durante el desarrollo.

Muchas especies muestran patrones diferenciales de expresión de sHsps durante varios estadios del desarrollo, incluyendo la gametogénesis, la embriogénesis y la metamorfosis. Estos patrones de expresión son consistentes cuando los organismos se encuentran con algún tipo de estrés ambiental inusual o bajo circunstancias como la dormancia o la diapausa.

Uno de los ejemplos más estudiados en diferentes organismos son la sHsp27 y la α B-cristalina del pez cebra, que son expresadas constitutivamente en el tejido embrionario, principalmente en el músculo esquelético y el cardíaco. Inicialmente, la expresión de Hsp27 ocurre durante la gastrulación temprana y su acumulación se observa en embriones que han sido sometidos a un estrés por temperaturas elevadas (Mao y Sheldon, 2006). La Hsp27 de *Drosophila* se ha visto involucrada en la diferenciación de los discos imagales, al igual que la Hsp23, que se expresa durante la embriogénesis en células neuronales y en células de la glía durante el desarrollo del sistema nervioso central, por lo que se le ha atribuido, más que un papel esencial para el desarrollo del sistema nervioso central, un papel de protección contra el estrés (Arrigo, 2005; Michaud & Tanguay, 2003).

Las sHsps pueden estar diferencialmente reguladas por el desarrollo y por la exposición al estrés, tal como lo reportaron Coca y col. (1996), quienes aislaron dos genes de girasol; Ha hsp18.6 G2 y Ha hsp17.7 G4, que codifican para las sHsps. Los ensayos tipo *Northern-blot* revelan la acumulación del mensajero de la H hsp17.7 G4 durante la embriogénesis del cigoto, mientras que, en tejido vegetativo, este mensajero se acumula en respuesta al choque térmico (42°C), al ácido abscísico, o a un estrés provocado por agua. El mensajero de la Ha hsp18.6 G2 se acumula exclusivamente en respuesta al estrés térmico.

También una sHsp de *Artemia franciscana*, la p26, ayuda a incrementar la resistencia al estrés de embriones enquistados y contribuye al desarrollo del embrión (MacRae, 2003).

Las α -cristalinas y sHsps en enfermedades.

Las α -cristalinas constituyen el 90% de las proteínas de la lente de los ojos de vertebrados que son necesarias para el índice refractivo. Se encuentran ensambladas en un dímero de 20 kDa como unidad, pero pueden ser aisladas en una variedad de formas, incluyendo partículas esféricas con masas moleculares de 200 a 800 kDa (Horwitz, 2003). Comúnmente, también se encuentran en el corazón, el músculo esquelético, la piel, el cerebro, la columna vertebral y los pulmones (Horwitz, 2000). Las α -cristalinas son proteínas extremadamente termoestables que pierden el 10% de su estructura a una temperatura de 80 °C (Ganea, 2001), pertenecen a la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHsp) y presentan un dominio altamente conservado denominado α -cristalino (ACD), el cual es esencial para la actividad de chaperona que ayuda a prevenir la agregación y proporciona el plegado adecuado a diferentes proteínas sustrato (Klemenz *et al*, 1991; Hortwitz, 1992).

En sistemas animales, se ha estudiado el efecto de la fosforilación y el ATP sobre las α -cristalinas. La fosforilación favorece la actividad de chaperonas de las α -cristalinas (Wang *et al*, 1995), no obstante, las formas fosforiladas presentan mayor actividad de chaperonas (Derham & Harding, 1999). Con lo que respecta al efecto del ATP, las α -cristalinas incrementan su actividad de chaperonas moleculares en presencia de ATP y se ha sugerido sugieren que la unión de ATP les confiere estabilidad a las α -cristalinas al unirse a ciertos aminoácidos presentes en el ACD cargados positivamente presentes en el ACD (Muchowski & Clark, 1998; Muchowski, *et al* 1999). Además, Biswas & Das (2004), proponen demostraron que el ATP induce la unión de las α -cristalinas con su sustrato sin llevar a cabo la hidrólisis de éste, aunque concentraciones elevadas de esta molécula inhiben la actividad de chaperona (Wang & Spector, 2001).

Existe un gran interés por las α -cristalinas debido a que su deficiencia está implicada en varias enfermedades neurológicas en humanos. Las cristalinas- α B se han visto relacionadas con la enfermedad de Alexander's, Creutzfeldt-Jacob, Huntington y con la esclerosis múltiple (Horwitz, 2000), donde se han encontrado incrementados los agregados proteicos en tejidos específicos denominados fibras amiloides y se piensa que las cristalinas- α B evitan la formación de estos agregados (Sun & MacRae (a), 2005). En humanos mayores de 60 años, las α -cristalinas tipo A y B pueden tener modificaciones

post-traduccionales, como la truncación, la desaminación, la oxidación, la glicosilación y la racemización, teniendo como resultado la formación de cataratas en el ojo.

Existen mutaciones congénitas dominantes localizadas en los genes de la αA y αB cristalinas que también promueven la formación de cataratas, por ejemplo, una sustitución de la arginina-49 por una cisteína y en las cristalinas- αB es la arginina-120 por una glicina, causa la modificación su actividad de chaperona (Sun & MacRae, (a) 2005). Igualmente, una mutación en la cristalina- αB se ha visto implicada en miopatías relacionadas con la desmina (componente del citoesqueleto) (Horwitz, 2003). Otros reportes mencionan que las cristalinas- αB y la Hsp27 están involucradas en enfermedades del corazón, reduciendo los probables daños isquémicos en miocitos y en el músculo esquelético (Horwitz, 2000).

Recientemente, en estudios de poblaciones humanas en comunidades rusas, se encontró que una mutación nula de la proteína sHsp27 en el extremo C-terminal, provoca una enfermedad hereditaria neuromotora denominada Charcot-Marie Tooth (Evgrafov *et al*, 2004). Igualmente, se descubrió que en poblaciones eslavas, una enfermedad hereditaria es provocada por la mutación en el dominio α -cristalino de la sHsp22, que conduce hacia una progresiva y rápida pérdida de la sensibilidad en las extremidades, llevando a una parálisis completa de los músculos distales (Irobi, *et al*, 2004). Por lo anterior, es plausible proponer que las sHsp's en el humano son esenciales para funciones fundamentales del sistema neuromotor.

Las sHsps en plantas.

Las sHsps son las proteínas más abundantemente expresadas durante el estrés. Sin embargo, también se expresan en ciertas etapas del desarrollo como son: el desarrollo del embrión, la germinación, el desarrollo del polen, la maduración del fruto y la embriogénesis somática (Waters *et al.*, *et al*, 1996). La familia de las sHsps en plantas se divide en siete sub-familias de acuerdo con su localización celular; las clases I, II y III están localizadas en citosol y en el núcleo mientras que las otras cuatro se encuentran en plástidos (P), retículo endoplásmico (RE), y mitocondria (M) y peroxisoma (Po) (Wang *et al.*, *et al*, 2004, Siddique *et al.*, *et al*, 2008) (ver Tabla I).

Se ha reportado que la expresión de las sHsps de plantas se incrementa cuando éstas son sometidas al estrés por calor, en donde su acumulación es proporcional a la duración y a la intensidad del choque térmico. Además, se ha argumentado que las sHsps son bastante estables después de un periodo de estrés, presentando una vida media de 30 a 50 horas. También, las sHsps están involucradas durante el estrés hídrico, como la HaHsp17.6 (clase I) y la Ha hsp17.9 (clase II) de girasol, que son altamente expresadas cuando la planta es sometida a este tipo de estrés (Sun *et al.*, *et al*, 2002).

Eckey-Kaltenbach y col. (1997), caracterizaron el primer cADN de una sHsp de perejil que se induce en respuesta al calor y al estrés oxidativo causado por ozono. En *A. thaliana*, la expresión de la Hsp17.6A perteneciente a la clase II, se expresa en respuesta al calor y al estrés osmótico y cuando se sobre-expresa *in planta*, se incrementa su tolerancia al estrés salino y a la sequía (Sun *et al.*, *et al*, 2002).

Por otro lado, las sHsps que se encuentran en diferentes etapas del desarrollo de distintas especies de plantas, como se demostró en el trabajo de Facchini y De Luca (1994), quienes aislaron un cADN de semilla de *Opium poppy*, que codifica para una proteína de 23.8 kDa homóloga a la sHsp de 18.5 kDa de soya (67% de identidad), con una de 16.5 kDa de alfalfa (72%), con la Hsp17.8 de maíz (32%) y la 17.5 kDa de *A. thaliana* (68%). Esta proteína se expresa en la raíz y en cultivos de callos, también fue detectada en el desarrollo de carpelos. Los autores de este trabajo proponen que probablemente esta proteína está implicada en la proliferación y en la diferenciación celular. La expresión de las sHsps pertenecientes a diferentes clases es diferencial, como lo describen Volkov y col. (2005) en la planta de tabaco donde las sHsps pertenecientes a la clase I se expresan tanto las etapas tempranas del desarrollo de la flor (donde son necesarias para iniciar el desarrollo del polen), así como en las fases tardías (donde sugieren que están implicadas en la protección de estructuras celulares durante el proceso de deshidratación). Por otra parte, las sHsps pertenecientes a la clase II, se expresan en todas las fases del desarrollo del polen. Cuando se someten las hojas y el polen de tabaco al estrés por calor, la expresión de las sHsps pertenecientes a ambas clases se incrementa en hojas y en polen, mientras que las de la clase I se expresan solamente en el polen.

La Hsp17 del árbol de corcho muestra un incremento en la expresión y en la acumulación de la proteína durante la embriogénesis somática, la cual disminuye durante la germinación. Los embriones sometidos a un estrés osmótico, choque térmico o a la exposición de rayos UV acumulan su mensajero (Puigderrajols *et al.*, *et al*, 2002). En *A.*

thaliana el mRNA de la Hsp17.4-CI se encuentra presente durante el desarrollo normal de la semilla y en el comienzo de la desecación, pero incrementa su expresión en embriones estresados por calor, hecho que relaciona a la Hsp17.4-CI con el desarrollo de la semilla y la protección de elevadas temperaturas (Wehmeyer & Vierling, 2000).

| Tabla I . sHsps en diferentes especies de plantas, su localización celular, miembros representativos y condición en que se expresan (Sun <i>et al.</i> , <i>et al</i> , 2002). | | | |
|--|----------------------|-------------------------------|---|
| Organismo | Localización celular | sHsps | Condición |
| Plantas | Citosol | | |
| CLASE I | | | |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | | Homóloga a LpHsp17.7 | Desarrollo embrionario |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | | Tom66 | Estrés por frío |
| <i>Helianthus annuus</i> | | HaHsp17.6 | Desarrollo embrionario y estrés osmótico |
| <i>Craterostigma plantagineum</i> | | Homólogo a HaHsp17.6 | Respuesta a ABA y estrés osmótico |
| <i>Quercus suber</i> | | QsHsp17 | Respuesta a ABA y estrés osmótico y oxidativo |
| <i>Petroselinum crispum</i> | | Hsp17.9 | Estrés oxidativo |
| <i>Castanea sativa</i> | | CsHsp17.5 | |
| <i>Medicago sativa</i> | | Hsp18.1, MsHsp18.2-CI | Respuesta a calor y frío, germinación |
| <i>Oryza sativa</i> | | OsHsp26.6 | Estrés por metales pesados y embriogénesis somática |
| <i>Pisum sativum</i> | | PsHsp18.1 y tres relacionadas | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | | AtHsp17.4-CI AtHsp17.6-A-CI, | Estrés oxidativo |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | | NtHsp18 | Desarrollo embrionario |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | | LpHsp17.7-CI | Germinación |
| <i>Lilium spp</i> | | cADN homólogo a sHsp (C-I) | Desarrollo del polen |
| <i>Pseudotsuga menziessii</i> | | DF4-5 | Maduración del fruto |
| | Citosol | | |
| CLASE II | | | |
| <i>Zea mays</i> | | ZmHsp17-CII | Desarrollo del polen |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | | LpHsp17.3-CII | Maduración del fruto |
| <i>Heliantus annuus</i> | | HaHsp17.9-CII | Estrés osmótico y |

| | | | |
|---|--------------------------|---|--|
| <i>Craterostigma plantagineum</i> <i>Pharbitis nil</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | | Homóloga a HaHsp17.9 sHsp-1 AtHsp17.7-CII, AtHsp17.6-CII | desarrollo embrionario Estrés osmótico Fotoperiodo Desarrollo embrionario, germinación y estrés oxidativo |
| <i>Pisum sativum</i> | Citosol/ Núcleo | PsHsp17.7-CII y dos relacionadas | Desarrollo embrionario |
| CLASE III <i>Arabidopsis thaliana</i> | Mitocondria | AtHsp17.6-CIII | Estrés por metales pesados |
| CLASE M <i>Zea mays</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Pisum sativum</i> | Plástido | ZmHsp23.8-M (Hsp22) Hsp22 AtHsp23.6-M, AtHsp23.5-M TaHsp23.5-M PsHsp22.9 | Estrés por calor Estrés oxidativo Estrés por calor Estrés por calor Estrés por calor |
| CLASE P <i>Hordeum vulgare</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | | HvHsp26.8-P, Hsp26.9-P LeHsp23.8-P (LeHsp21), TOM111 OsHsp26.6-P AtHsp25.3-P, AtHsp18.5-P | Germinación Estrés por frío Estrés oxidativo |
| CLASE RE <i>Glycine max</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> | Retículo endoplásmico | GmHsp22.0-ER C119 LeHsp21.5-ER PsHsp27.2-ER AtHsp22.0-ER | Estrés por calor Estrés por frío Maduración del fruto Estrés por calor Estrés por calor |
| CLASE PEROXISOMA <i>Arabidopsis thaliana</i> | Peroxisoma | PTS1 Hsp15.7 | Estrés por calor y oxidativo |

Antecedentes.

En el laboratorio del Dr. Federico Sánchez se clonó y se caracterizó el cADN de la nodulina 22 (Nod22) de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*). La secuencia de amino ácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, presentó una alta identidad con las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular incluidas en las bases de datos de proteínas (Figura 4). Para demostrar la actividad de chaperona de la Nod22 se clonó la región codificante del cADN en un vector de expresión de *E. coli*. Los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de este gen confiere resistencia a las células de *E. coli* en presencia de 1mM de H₂O₂. Sin embargo, no se obtuvo tolerancia frente a elevadas temperaturas; por lo que se ha propuesto que la Nod22 es una proteína importante para contender con el estrés oxidativo. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Jofré y col. (2003), en donde se demostró que la sobre-expresión en *E. coli* de la sHsp clase I *QsHsps-10.4* de *Quercus suber*, específica de polen, protege a las células ante elevadas temperaturas y al estrés oxidativo inducido por paraquat y por H₂O₂. En estudios similares se ha reportado que la sHsp de OsHsp 16.9 de arroz y la TLSh1 de tabaco también proporcionan tolerancia a altas temperaturas (Yeh *et al*, 2002; Joe *et al*, 2000). También se ha demostrado que la CsHsp17.5 de nuez incrementa la tolerancia de *E. coli* a condiciones de bajas y altas temperaturas (Soto *et al*, 1999).

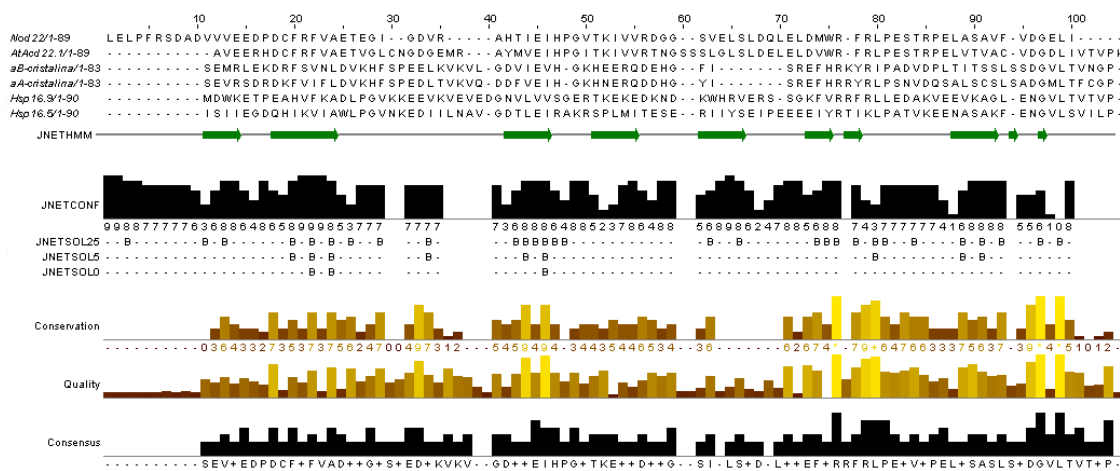


Figura 4. Alineamiento de la secuencias de amino ácidos de las proteínas que contienen el dominio ACD. La secuencia de aminoácidos del dominio cristalino Nod22 se alinearon con las secuencias de amino ácidos de la proteína AtAc22.1 de *A. thaliana*, Hsp16.5 de *M. jannaschii*, la α B y α A cristalina de humano y la wHsp16.9 de *T. aestivum*. En la parte inferior del alineamiento múltiple se indica la estructura secundaria de todas las proteínas, se indican las secuencias de amino ácidos que tienen una probabilidad alta de conformar una estructura de β -plegada según el algoritmo del programa Jalview 2.4 (Clamp *et al*, 2004)

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la Nod22 con las bases de datos de proteínas deducidas a partir del genoma de *A. thaliana*, demostró que la secuencia de aminoácidos de la Nod22 tiene una identidad de ~50 % con las proteínas AtAc22.1 (At3G22530) y la AtAc16.9 (At4G14830) que están localizadas en el cromosoma tres y cuatro, respectivamente. Por lo tanto, estos dos homólogos en *A. thaliana* pudieran tener una función similar a la Nod22. Para corroborar esta hipótesis se clonó la región codificante del cADN de los dos genes de *A. thaliana* en un vector de expresión de *E. coli*.

Los resultados obtenidos en el proyecto de investigación de mi tesis de licenciatura demostraron que la sobre-expresión del gen AtAc22.1 en *E. coli*, proporciona a las células tolerancia al estrés oxidativo y a altas temperaturas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Jofré y col. (2003), cuando expresaron la *QsHsps-10.4*. Sin embargo, cuando se determinó la resistencia de *E. coli* recombinante que expresa el gen AtAc16.9 de *A. thaliana*, no se observó tolerancia al estrés oxidativo ni resistencia a las altas temperaturas. Esto posiblemente pudo ser debido a que la expresión de este gen es tóxico para la bacteria, ya que no se obtuvo un crecimiento regular en condiciones óptimas. Ya hemos mencionado, que las chaperonas moleculares son esenciales para la renaturalización de las proteínas cuando las células se encuentran sometidas a diferentes estreses. Actualmente, en plantas todavía no se conocen todas las rutas de señalización

que participan en la regulación de la expresión génica de estas proteínas ó los mecanismos moleculares que regulan su actividad; por lo que, en este trabajo de investigación, se propone caracterizar la actividad de las chaperonas moleculares Nod22 de *Phaseolus vulgaris* y de su ortólogo AtAcd22.1 de *A. thaliana*.

Hipótesis.

Debido a la elevada identidad de la Nod22 y la AtAcd22.1 que presentan con la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, es muy probable que ambas proteínas muestren actividad de chaperona molecular.

Objetivos Generales.

Realizar los ensayos de actividad *in vitro* de las chaperonas Nod22 y la AtAcd22.1 utilizando como sustrato a la luciferasa (LUC).

Objetivos Específicos.

- 1.- Sobre-expresar a la Nod22 y a la AtAcd22.1 en *E. coli*.
- 2.- Purificar a las proteínas recombinantes 6-His-Nod22 y 6-His-AtAcd22.1.
- 3.- Realizar los ensayos de actividad *in vitro* tanto para la Nod22 como para la AtAcd22.1.
- 4.- Diseñar y expresar mutantes puntuales en las Argininas 124 y 131 de la Nod22 y las argininas 124 y 144 de la AtAcd22.1.

Materiales y métodos.

Cepas bacterianas y plásmidos.

En este trabajo se utilizó la cepa XL1-blue de *E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-hsdR 17 supE44 relA1 lac* [F' *pro AB lacIqZΔM15Tn10 (Tetr)*] (Stratagene^R). Los diferentes cADNs empleados se incluyeron en el vector de expresión pQE30, que contiene un cassette de resistencia a ampicilina y una fusión de 6 histidinas en el extremo NH-terminal (QIAGEN), lo cual facilita tanto la selección de transformantes como la purificación de la proteína de interés.

Preparación de células electrocompetentes XL1-Blue.

Se inoculó un litro de medio LB líquido con 1/100 v/v de un pre-cultivo saturado de células XL1-Blue. Las células se cultivaron a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de entre 0.5-0.8, se colocaron en hielo por un tiempo aproximado de 30 min y se centrifugaron a 4026 xg por 15 min. Posteriormente, se recuperó la pastilla en un litro de agua destilada, fría, estéril (colocándola cuidadosamente para no romper las células), y se centrifugó de nueva cuenta a la misma velocidad antes mencionada. Se recobró la pastilla y se suspendió en 500 ml de agua fría. El total se centrifugó de nuevo, la pastilla obtenida se resuspendió en ~20 ml de glicerol frío al 10%, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -70 °C.

Inducción de la sobre-expresión independiente de los genes AtAcd22.1 y de la Nodulina 22.

E. coli fue transformada genéticamente con el gen que codifica para la Nodulina 22 sin péptido señal (Figura 1A) y con la AtAcd22.1 (Figura 1B). Las colonias obtenidas en el medio de selección se utilizaron como inóculo en el medio apropiado de cultivo (LB [Luria Bertani: NaCl 0.5%, Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, H₂O estéril a un litro como volumen final] suplementado con ampicilina {100 mg/ml}) (Miller,1972) y se incubaron

durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día, 1 ml del cultivo saturado se empleó para inocular 100 ml de medio LB en presencia del antibiótico de selección. El cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.2-0.3. Posteriormente, se adicionó el inductor IPTG (Research Organics, Cleveland, Ohio, U.S.A.) a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó a 37°C durante 30, 60, 120 y 240 min. Se tomaron muestras de 50 µl a los tiempos de inducción indicados.

Extracción de la AtAcd22.1 y la Nodulina22 de extractos totales de *E. coli*.

Las células contenidas en las muestras del cultivo obtenidas a los diferentes tiempos de inducción fueron concentradas por centrifugación (10 min a 18600 xg), resuspendidas en 50 µl de solución de Laemmli 1X (125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10 % 2-β-mercaptoetanol, 1% bromofenol) (Laemmli, 1970) e incubadas durante 10 min a 94 °C. El contenido del sobrenadante de dichas muestras se analizó en geles de acrilamida al 15% (120 volts durante 190 min en el buffer apropiado [Tris-HCl 2 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%]). Enseguida, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Coomassie R-250 0.1%, metanol 50%, ácido acético glacial 7%) durante 30 min y desteñidos con solución desteñidora (metanol 50%, ácido acético glacial 10%) hasta obtener la tinción deseada.

El análisis previo indicó que el tiempo de inducción óptimo para obtener la mayor concentración de proteína quimérica es de 4 horas. Por ello, las células del cultivo inducido a este tiempo se procesaron de la siguiente manera: las células que sobreexpresan a la AtAcd22.1 se centrifugaron durante 15 min a 37732.50 xg. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en el buffer A (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, lizosima 0.1g, 100 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 10% de glicerol y 0.5% de Tween 20). Las muestras se sonicaron en frío con pulsos interrumpidos de 6 seg durante 10 min. Posteriormente, lo anterior se centrifugó 15 min a 37732.50 xg. El sobrenadante y los cuerpos de inclusión se diluyeron en solución de Laemmli y se incubaron a 94°C durante 5 min. Las muestras se centrifugaron por 1 min a 20400 xg.

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 8 M de urea y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Dicha muestra se sonicó en frío con pulsos de 6 seg durante 10 min y se centrifugó durante 15 min a 20400 xg. A partir del sobrenadante y del precipitado se prepararon muestras con solución de Laemmli 1X, que se analizaron por cromatografía en paralelo al proceso de purificación.

Purificación de la His-Nod22 y de la His-AtAcd22.1 bajo condiciones desnaturalizantes.

Para la purificación de la His-Nod22 se empleó una columna acoplada a níquel. La columna de Ni-NAT se lavó con 8 ml de agua destilada dos veces consecutivas y posteriormente se equilibró con una solución de 8 M de urea. Enseguida se añadieron 8 ml del extracto soluble que contiene a la His-Nod22 y se incubó el total durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eluyó de la columna el extracto que contiene a la proteína recombinante y se lavó la resina con 3 ml de 8 M de urea y con 2ml de 100mM de NaCl, 10 mM de KCl y 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 (buffer de lavado), con el fin de excluir contaminantes, tras lo cual se le agregaron 4 ml de buffer de elución (8 M de urea, 20 mM de ácido acético pH 4 y 4 ml de 100 mM de imidazol [buffer B]), el contenido de la columna se agitó por inversión durante una hora. Finalmente, el eluido se analizó en geles de acrilamida al 15%, tal y como se ha descrito en párrafos anteriores.

Para la purificación de la His-AtAcd22.1, se siguió el mismo protocolo. Sin embargo, los cuerpos de inclusión que contienen a la proteína recombinante His-AtAcd22.1 se solubilizaron en 1 M de arginina acida (pH 4.4). Dicha muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se sonicó en frío con pulsos de 6 seg durante 10 min y se centrifugó durante 15 min a 20400 xg y se analizó en geles de acrilamida al 15%. Posteriormente, se eluyó de la columna el extracto que contiene a la proteína recombinante y se lavó la resina con 3 ml de 1 M de arginina acida con el fin de excluir contaminantes, tras lo cual se le agregaron 2 ml de buffer de elución (1 M de urea, y 2 ml de 100 mM de imidazol [buffer C]), el contenido de la columna se agitó por inversión durante una hora. Finalmente, el eluido se analizó en geles de acrilamida al 15%, tal y como se ha descrito en párrafos anteriores.

Identificación de la Nod22 por “Western-blot”.

Las proteínas analizadas en geles de acrilamida se transfirieron a membranas de nylon pre-humedecidas con buffer de transferencia (29 mM glicina, 48 mM Tris.base, 0.037% SDS, metanol 20 %, pH 8.3). El protocolo de transferencia empleado consistió en la aplicación de una corriente constante de 150 mA durante 190 min en un sistema de

transferencia semiseca (OWL). Posteriormente, se bloquearon los sitios libres en la membrana con una solución de leche descremada al 1% (Carnation) diluida en TTBS (30 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100). La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante, tras lo cual se adicionó el anticuerpo anti-Nodulina 22 (anti-Nod22) en una dilución 1:1000 y se incubó durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Posteriormente, la membrana se lavó en tres ocasiones con TTBS durante 10 min y después se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina [Boehringer] diluido 1:5000 en TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TTBS. Por último, la señal de reconocimiento del anticuerpo unido a la Nodulina 22 se analizó añadiendo los substratos necesarios para la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina, elemento reportero que se encuentra unido al anticuerpo secundario (NBT [nitrobluetetrazolium] y BCIP [5-bromo 4-cloro 3-indolfosfato] diluidos en agua destilada en una relación 1:1).

Preparación de los buffers para la diálisis y ulterior solubilización de la His-Nod22 y de la His-AtAcd22.1.

Las fracciones colectadas de la His-Nod22 que se encuentran solubles en el buffer de elución se incluyeron en una membrana de diálisis (corte de 6000 a 8000 Da) y se dializaron con el buffer D a diferentes pH (HEPES 25 mM, 150 mM KCl, 2 mM DTT pH 7.5, 7 y 6.5) en una relación de 2 ml: 500 ml (proteína: buffer), incubada durante 24 horas, con cambios de lavado cada 12 horas. Posteriormente, se colectó la muestra obtenida y se centrifugó 5 min a 20400 xg a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvo una fracción soluble y un precipitado. Cada una de las fracciones solubles se diluyeron en solución de Laemmli 2X y el precipitado en solución de Laemmli 1X y se analizaron en geles de acrilamida al 15%. Para la AtAcd22.1, se dializó con 40 mM HEPES pH 5.7 (buffer E) en una relación de 2ml: 500ml (proteína: buffer), incubada durante 24 horas, con cambios de lavado cada 12 horas. Posteriormente, se colectó la muestra obtenida y se centrifugó 5 min a 20400 xg a 4°C. De esta forma se obtuvo una fracción soluble y un precipitado. Cada una de las fracciones solubles se diluyeron en solución de Laemmli 2X y el precipitado en solución de Laemmli 1X y se analizaron en geles de acrilamida al 15%.

Ensayo de interacción de la His-Nod22 con proteínas desnaturalizadas.

Para el ensayo tipo *dot-blot* se utilizaron BSA, lisozima, α 2-macroglobulina y caseína. Las diferentes proteínas se prepararon a una concentración final de 100 μ g en un buffer nativo (buffer 5 [240 mM Tris-HCl pH 8, sacarosa 60% p/v, 20 mM ϵ -ácido aminocaproico, 4 mM de benzamidina, 0.04% p/v de azul de bromofenol]) con el fin de utilizarlas como referencia. Las proteínas desnaturalizadas se utilizaron a concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 μ g en solución de Laemmli 1X, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en cámara de vacío durante 30 min. La membrana que contiene a las proteínas nativas y desnaturalizadas se bloqueó con TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con la fracción soluble en buffer D que contiene a la proteína recombinante His-Nod22 durante 1 hora a temperatura ambiente. Enseguida, se siguió el protocolo previamente descrito para ensayos "*Western-blot*".

Generación de las mutantes His-Nod22 R115G y His-Nod22R131G.

La clonación de la Nod22 fue previamente realizada en nuestro laboratorio por Assif Mohammad (datos no publicados) e introducido en la cepa de *E. coli* BL21. A partir de esta cepa, purificamos el vector, el cual se re-introdujo en la cepa XL1-Blue utilizada en este trabajo. Para la clonación de la Nod22 sin péptido señal, Mohammad (datos no publicados) diseñó oligonucleótidos específicos para amplificar el extremo 5' (UE17/spbam, 5'CGGGATCCATGAAGGTCCACCCTGTTCC 3') y para el extremo 3' (LE17_Pst1, 5' AACTGCAGTCACTGTACAAGCACAAGTCTA 3') con lo cual se obtuvo la construcción molecular que se denominó Enod22 SP 500pb, la cual se clonó en el mismo vector.

Para la generación de las mutantes en las argininas que se encuentran en el ACD se extrajo ADN del plásmido del vector de sobre-expresión pQE30-His-Nod22.

Con el objeto de mutagenizar a los residuos de arginina, se diseñaron oligonucleótidos específicos dirigidos a la región de los genes Nod22 con la ayuda del programa Oligo, contenido en la página www.stragene.com. El par de oligonucleótidos para la mutación en la arginina 115, denominados N22R114G 5': 5'-tcg gcg acg tgg ggg cgc aca cg-3' y N22R114G 3': 5'-cgt gtg cgc ccc cac gtc gcc ga-3' contienen la mutación del cambio de la arginina 115 por una glicina, mientras que los oligonucleótidos

N22R131G 5': 5'-gaa gat cgt ggt ggg gga cgg cgg ttc-3' y N22R131G 3': 5'-gaa ccg ccgt ccc cca cca cgat ctt c-3' introducen la mutación en la arginina 131.

El protocolo para diseñar a las mutantes consistió en realizar una reacción de PCR que incluye la combinación de los oligonucleótidos, la cual se efectuó de la siguiente forma:

| Oligonucleótido | Fragmento esperado | |
|-----------------|--------------------|-------|
| UE17/spbam 5' | N22R114G3' | 354pb |
| LE17_Pst1 3' | N22R114G5' | 266pb |
| UE17/spbam 5' | N22R131G3' | 404pb |
| LE17_Pst1 3' | N22R131G5' | 221pb |

La reacción de la PCR para la combinación de los oligonucleótidos silvestres y los mutantes de la Nod22 se efectuó bajo las siguientes condiciones: 2:30 min a 94 °C, 35 ciclos de amplificación: 30 seg a 94 °C, 30 seg a 68 °C, 1 min a 72 °C y un ciclo de 10 min de extensión a 72 °C. Los fragmentos de ADN de 354 y 266pb se clonaron en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas), que se empleó para transformar a células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue. Para dicha transformación genética se agregó 1 µg de DNA a 50 µl de células electrocompetentes, que se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después, la mezcla se transfirió a una celda de electroporación, y se aplicó un choque de 1.6 volts. Las células fueron recuperadas en 250 µl de medio LB e incubadas durante 1 hora a 37 °C. Por último, 50 µl del cultivo se plaquearon en cajas de LB suplementadas con ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C. La selección de las colonias recombinantes con el inserto para ambos genes se comprobaron por PCR, bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Una vez purificados los fragmentos de ADN, se realizó otra ronda de PCR, esta vez, utilizándolos como molde a una concentración de 100 ng/µl. Las condiciones de la reacción de la PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 10 min, 1 ciclo a 72 °C de 5 min, 10 ciclos a 95 °C 1 min y 30 seg a 60°C, 7 ciclos a 72°C por 30 seg. Lo anterior, sin añadir a los oligonucleótidos de la región codificante de la Nod22. Posteriormente, éstos se agregaron a la reacción (UE17/spbam 5' y LE17_Pst1 3') para obtener el gen completo

que contiene a la mutación deseada. Para ello se realiza una ronda de PCR con las siguientes condiciones: 2:30 min a 94 °C, 35 ciclos de reacción de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 68 °C, 1 min a 72 °C y un ciclo de 10 min de extensión a 72 °C. El fragmento obtenido se clonó en el vector pJET1.2. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR en colonia bajo las condiciones previamente mencionadas.

Ensayos de actividad de chaperona de la Nod22.

Las reacciones de calentamiento se llevaron a cabo con 1 µM de luciferasa en buffer de calentamiento de luciferina (LUC) (2.5 mM de HEPES pH 7, 5 mM de Mg Cl₂, 150 mM de KCl y 2 mM de DTT en un volumen total de 25 µl) y diferentes concentraciones de la Nod22 (1 µM, 500 nM y 250 nM). Las mezclas fueron calentadas a 42 °C durante 20 min tras lo cual se transfirieron a hielo por 5 min. Se tomaron alícuotas de 2.5 µl (que corresponden a 50 nM de LUC) y se incubaron con 30 µl de lisado de reticulocitos de conejo (RRL) los cuales proporcionan una elevada concentración de chaperonas de alto peso molecular y 12.5 de buffer de renaturalización (20 mM Tricina-KOH, HEPES-KOH 100 mM, 20 mM MgCl₂, 8 mM de ATP, 4 mM de DTT, 470 µM de luciferina y 40 mM de KCl). Enseguida, se incubaron en un baño de agua a 30 °C durante 5 min.

Como control positivo del sistema se emplearon 50 nM de luciferasa no calentada y midiendo su actividad en buffer HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 470 µM de sustrato (luciferin), 8 mM de ATP). Como control negativo de esta reacción se usaron 50 nM de luciferasa calentada a 42 °C en el buffer mencionado, pero sin la adición de la Nod22. La actividad de la luciferasa se monitoreó en un luminómetro (Monolight™ 3010 PHARMIGEN A, Becton Dickinson Company) y la emisión de la luz se midió a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 min) con un tiempo de integración de 10 seg.

Análisis filogenético de la familia de las sHsps.

A partir de las secuencias de las 12 sub-familias de sHsps de plantas reportadas por Siddique y col (2008), se realizó un alineamiento a nivel de amino ácidos con el programa Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>), para posteriormente construir un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) y el paquete *Phylip* 3.66.

Las matrices de distancia fueron generadas utilizando una matriz de sustitución JTT para amino ácidos. El análisis estadístico se obtuvo a partir de mil réplicas de bootstrap y generamos un árbol por réplica. Presentamos aquí el árbol consenso con el porcentaje de réplicas en las que está presente cada rama.

Predicción de la estructura tridimensional de la Nod22 y la AtAcd22.1.

Inicialmente el modelo se diseñó utilizando como molde a la wHsp16.9 de trigo previamente cristalizada y se utilizó el programa *Modeller* que es un programa que se utiliza para generar los modelos tridimensionales a partir de homología, es decir, busca homólogos en una base de datos de secuencias de estructuras conocidas muy disimilares (menos de un 30% identidad) realiza un alineamiento y construye un modelo tridimensional con ciertas restricciones como el seleccionar el molde adecuado para el diseño del modelo. Por otro lado, se utilizó el algoritmo *CNS_solve* que es un programa que permita la minimización de energía de todos los átomos del modelo generado con respecto a la cadena principal (Brünger *et al* 1998)

Para la validación del modelo diseñado utilizamos algoritmos que nos permitan validar la estructura generada. La primera prueba fue efectuada con *Ramachandra Plot 2.0* obtenido del programa *Win Coot-0.5.2*, que proporciona los valores de los ángulos Psi-Phi para todos los aminoácidos (excepto Gly y Pro) y se espera que al menos el 90% de los aminoácidos se encuentren en las regiones “más favorables” que se observan comúnmente en las proteínas (Brünger *et al*, 1998). En la Figura suplementaria 1 se observa que para la mayoría de los aminoácidos de Nod22 y de la AtAcd22.1 se encuentran en las regiones permitidas (80.10% y 88.78%, respectivamente). El siguiente algoritmo utilizado para la validación de las estructuras fue el programa denominado PROSA-web (o Protein Structure Analysis). El programa solamente evalúa la interacción de los carbonos alfa, de modo que las estructuras de baja resolución o los modelos aproximados son comparados con modelos predichos de alta resolución. Este programa genera dos graficas la del z-score, valor que indica la calidad global del modelaje y la desviación del total de la energía de dicha estructura con respecto a su distribución (derivada de las conformaciones aleatorias o desordenadas) y la gráfica de energía que muestra la calidad local del modelo, que se fundamenta en las energías obtenidas como

una función de la posición de cada aminoácido dentro de la estructura. En general, los valores positivos corresponden a errores o problemas encontrados en alguna de las regiones del modelo (Wiederstein & Sippl, 2007) (Figura suplementaria 2). La validación de los modelos obtenidos también se efectuó con el programa VERIFY3D, que analiza la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). En el método de 3D, los perfiles de cada residuo son caracterizados con respecto a su medio y representados por una serie de 20 números contenidos en una tabla. Estos números son preferencias estadísticas denominadas 3D-1D scores o el valor de cada uno de los 20 aminoácidos de la serie y el resultado (o S) para cualquier secuencia de aminoácidos que se pliegue de manera similar al modelo en comparación. El perfil 3D tiene tres fines: 1) el identificar una secuencia de cualquier proteína que se pliegue de manera similar a la estructura del cual se realizó el perfil, es decir, secuencia con valores elevados para el modelo generado; 2) ya que los modelos correctos presentan valores (scores) elevados el perfil evalúa la validez de los modelos sometidos; 3). Por último, el perfil 3D determina el estado de oligómero de una proteína plegada correctamente, ya que por lo general, las proteínas que forman oligómeros presentan scores elevados (Eisenberg et al, 1997) (Figura suplementaria 3). El último paso dentro de nuestro protocolo de validación se realizó con el algoritmo Errat 2.0, un método que analiza las diferencias entre regiones correcta e incorrectamente plegadas dentro de una proteína, por medio de sus interacciones atómicas. A partir del principio en el cual los átomos de una proteína se distribuyen aleatoriamente, se puede construir un modelo estadístico que permita generar gráficas de error donde se evalúen las distribuciones correctas de los átomos dentro de una proteína. Las estructuras que han sido resueltas con métodos de alta resolución a través de este método presentan valores de error por debajo del 95% (indicado en color gris), mientras que los valores de error representados en color negro indican que la estructura contiene errores en la posición de los átomos (Colovos & Yeates, 1993) (Figura suplementaria 4). Por último, la identificación de las regiones desordenadas se evaluó con el programa PONDR que compara la secuencia de amino ácidos de regiones de proteínas que presentan regiones desordenadas y que su estructura ha sido resuelta por RMN e identifica las regiones desordenadas de la proteína en cuestión (Bhanuprakash *et al*, 2006).

Resultados.

El cADN de la Nod22 de frijol fue previamente aislada en nuestro laboratorio (Mohammad *et al*, 2004). El análisis de la secuencia de esta proteína reveló que existen dos proteínas homólogas en el genoma de *A. thaliana*, el gen At3g22530.1 que codifica para la proteína que nosotros llamamos AtAcd22.1 y el gen At4g14830, que codifica para la proteína AtAcd16.9. Dichos genes se encuentran localizados en el cromosoma 3 y 4, respectivamente (Tabla II).

| Tabla II. Porcentaje de identidad de la secuencia de proteínas Nod22, AtAcd22.1 y AtAcd16.9 | | |
|---|-------|-----------|
| | Nod22 | AtAcd22.1 |
| AtAcd22.1 | 54% | 100% |
| AtAcd16.9 | 56% | 58% |

El gen At3g22530.1 de 947 pb no presenta intrones y presenta un marco de lectura abierto de 597 pb. Además, presenta regiones 5' y 3' no traducidas relativamente largas, de 180 pb y 185 pb respectivamente.

Las sHsps se clasifican en seis clases de acuerdo a su localización sub-celular, tres de estas clases (CI, CII y CIII) se encuentran localizadas en el citoplasma o en el núcleo y las otras tres clases son proteínas presentes en plástidos, retículo endoplásmico y mitocondria. Por lo general, las proteínas que se incluyen en las tres últimas clases presentan un péptido señal localizado en el extremo NH-terminal (Sun *et al*, 2002). Para establecer la relación de la Nod2 y laAtAcd22.1 e identificar a que sub familia de la sHsps pertenecen estas proteínas, se realizó un árbol filogenético con el programa *Phylip 3.69* en el cual se puede observar que la Nod22 y sus proteínas homólogas de Arabidopsis la AtAcd22.1 y la AtAcd16.9 y sus homólogas de leguminosas: la Gm22 y Mt22 de *G. max* y *M. truncatula* respectivamente, son proteínas que no pertenecen a ninguna de las 12 subfamilias de las sHsps reportadas. Por tanto, podríamos considerarlas como una nueva subfamilia de las sHsps que están agrupadas en un clado en el que podrían estar incluidas con las de otras leguminosas (Fig. 5).

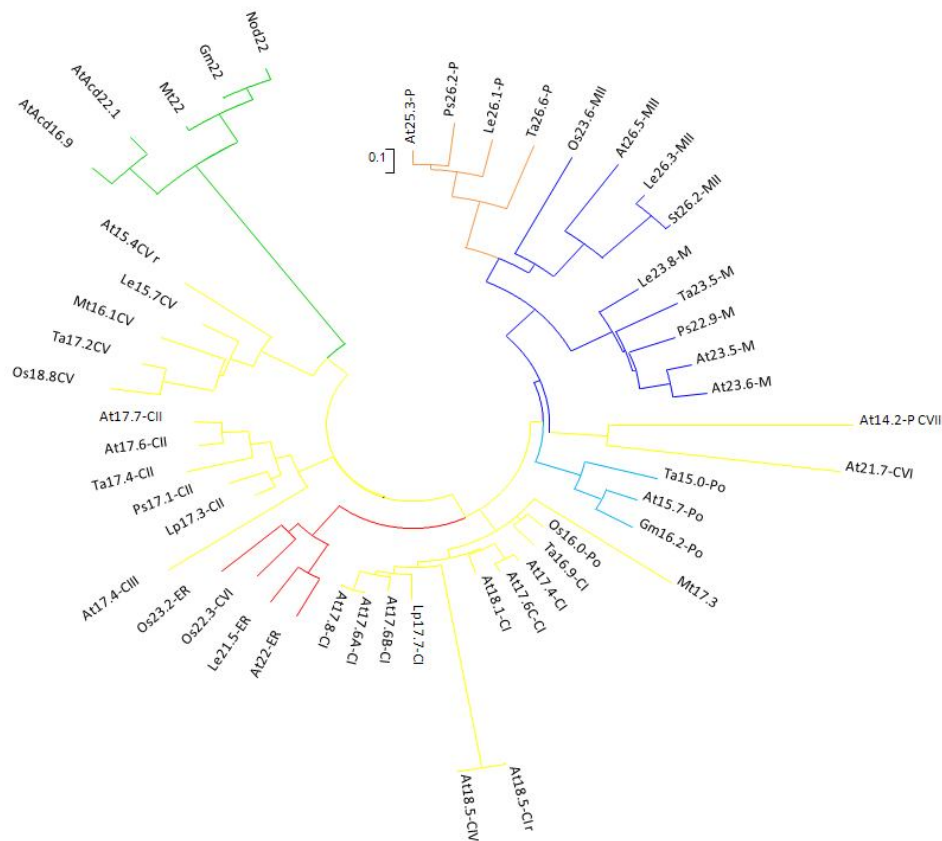


Figura 5. Análisis filogenético de la Nod22 y la AtAc22.1. El árbol filogenético se diseñó a partir de un alineamiento con las sHsp's de plantas, basándose en un alineamiento de la secuencia de aminoácidos realizado con el programa T-coffee y el árbol filogenético fue obtenido con el método N-J (neighbor-joining). Las 12 subfamilias son: siete citoplásmicas/nucleares; CI a CVII (en amarillo), una subfamilia para las proteínas con péptido señal; retículo endoplásmico (ER, en rojo), plástidos (P, en naranja) y peroxisomas (Po, en azul claro), así como dos subfamilias mitocondriales MI and MII (en azul), respectivamente. La Nod22 y sus proteínas homólogas de *A. thaliana*, *G. max* y *M. truncatula* se indican en verde.

Por otro lado, analizamos la secuencia de la AtAc22.1 y la Nod22, efectuando una predicción del posible sitio de localización celular. La Nod22 es una proteína de 198 aminoácidos con una masa molecular de 22.1 kDa y un punto isoeléctrico hipotético de 5.7908. Mohammad y col. en el 2004 describieron que la Nod22 presenta un posible péptido señal de 25 aminoácidos con un perfil hidrofóbico elevado con características hidrofóbicas similares a las encontradas en las proteínas que participan en la vía secretoria o de localización en el retículo endoplásmico. Por otro lado, encontramos que la AtAc22.1 presenta un probable péptido señal de 31 aminoácidos localizado en el NH-terminal que, con base en el análisis hidropático (Kyte & Doolittle, 1982), indica un perfil hidrofóbico elevado. De igual forma, el ACD y la firma típica que se encuentra al final de la AtAc22.1 son muy hidrofóbicos (Figura 6A). Asimismo, existen tres probables sitios de corte en los aminoácidos 24, 27 y 32, predicho con el programa *Signal P 3.0 Server* (Bendtsen *et al*, 2004) (Figura 6 B). La predicción de la localización indica que se trata de una proteína dirigida a la vía secretoria o al retículo endoplásmico y que definitivamente no presenta las características de un péptido señal para su localización en el cloroplasto, mitocondria o núcleo (Tabla III).

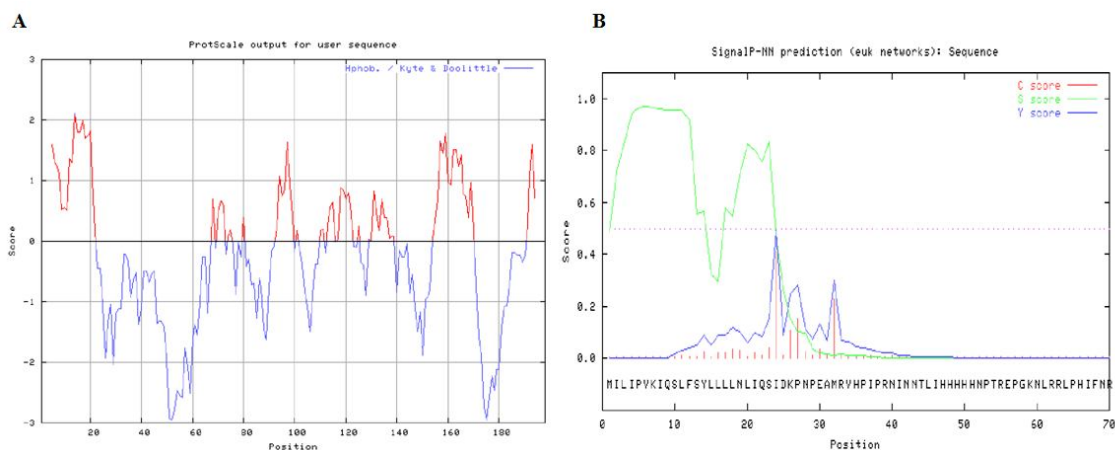


Figura 6. Perfil hidropático y predicción del sitio de corte del péptido señal de AtHsp22.1. A. El perfil hidropático fue realizado utilizando el algoritmo Kyte & Doolittle (1982), donde exponen las regiones hidrofóbicas de la AtHsp22.1 y en particular el perfil hidrofóbico del NH-terminal y el ACD indicado en rojo. B. El probable sitio de corte de la AtHsp22.1 con mayor valor es en la posición 24 (*). Sin embargo existen otros dos picos más, de posibles sitios de corte indicados en azul.

| Tabla III. Predicción de los probables sitios de localización celular. | | |
|--|------------------------|-------------|
| Nod22 | AtAcd22.1 | Referencia |
| Reticulo endoplásmico (0.82) | Vía secretoria (0.585) | PSORT 6.4 |
| Vía secretoria (0.956) | Vía secretoria (0.74) | TargetP 1.0 |

Expresión de las chaperonas de bajo peso molecular Nod22 y AtAcd22.1.

El uso de sistemas heterólogos como el de *E. coli* ha sido ampliamente utilizado para la expresión de chaperonas de bajo peso molecular. Por lo tanto, decidimos clonar el cADN de la Nod22, sin el péptido señal, y el cADN de la AtAcd22.1 en el vector pQE30, lo cual nos permitió fusionar en el extremo NH-terminal de ambas proteínas a un péptido de 6 histidinas (Figura 7 A y B). Estos plásmidos posteriormente se utilizaron para transformar a la cepa XL1-Blue de *E. coli*.

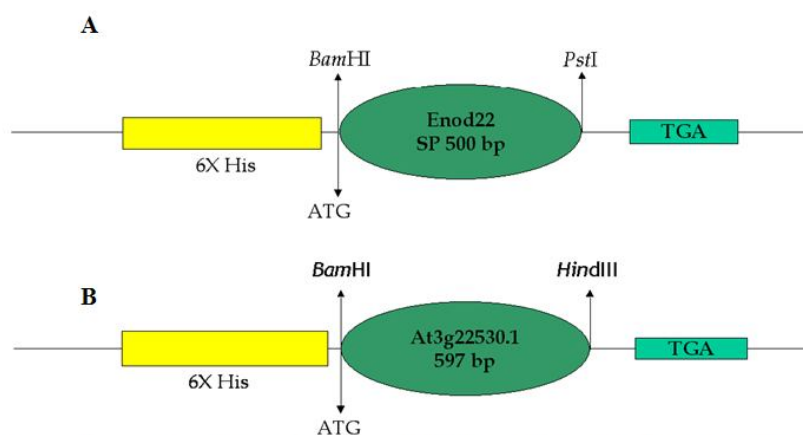


Figura 7. Representación gráfica de los plásmidos pQE30-Enod22 y pQE30-AtAcd22.1. A. El cDNA de la Nod22 se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pQE30 que presenta una fusión de histidinas en el NH-terminal. Esta construcción fue utilizada para la sobre-expresión de la proteína Nod22. B. El gen At3g22530 se insertó en el sitio múltiple de clonación del vector pQE30 para la sobre-expresión de la AtAcd22.1.

Posteriormente, se analizó la cinética de expresión de las proteínas de fusión a diferentes tiempos de inducción. Las muestras obtenidas se separaron en un gel

desnaturalizante de acrilamida y las proteínas se visualizaron con una tinción con azul de Coomasie.

Observamos que las dos proteínas recombinantes se expresan a partir de la primera hora después de la inducción con IPTG (Figura 8). Sin embargo, se observa una mayor acumulación de la proteína de interés después de 240 min. Por lo anterior, todos los experimentos posteriores se realizaron con las proteínas que se expresan a este tiempo de inducción. En la Figura 8, la masa molecular de las bandas identificadas en el gel corresponde a la calculada teóricamente para las proteínas 6His-Nod22 y 6His-AtAc22.1. Además, demostramos que estas proteínas se unen a la resina de Ni-NTA. Ambas proteínas recombinantes se encuentran ausentes en el perfil de extractos de células de *E. coli* transformadas únicamente con el vector pQE30.

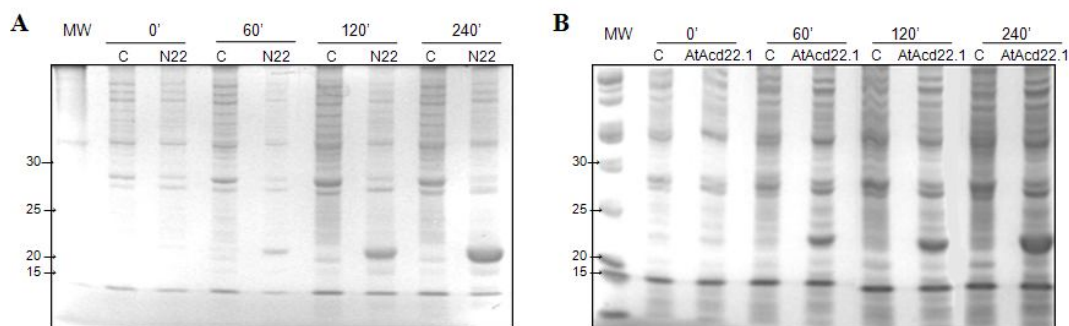


Figura 8. Cinética de expresión de las chaperonas de bajo peso molecular de plantas. La cepa XL1-blue de *E. coli* transformadas con el vector que contiene el cDNA de la Nod22 (panel A) o el cDNA AtAc22.1 (panel B) se crecieron a diferentes tiempos en presencia de IPTG (0, 60, 120, 240 minutos). Los extractos totales se separaron en un gel de acrilamida al 15% y las proteínas se visualizaron con una tinción de Azul de Coomasie. En ambos casos se indica el control con una C.

AtAc22.1 y Nod22 se encuentran en cuerpos de inclusión.

Los cultivos celulares de las cepas que expresan el cADN de la AtAc22.1 y de la Nod22 fueron fraccionados por sonicación, de acuerdo al protocolo incluido en la metodología. Posteriormente, el cultivo se centrifugó para separar la fracción soluble de los cuerpos de inclusión. Las proteínas de ambas fracciones se separaron en un gel de acrilamida. La AtAc22.1 y la Nod22 se encuentran en la fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se incubaron con 3 M guanidina, un agente caotrópico que expone las cadenas laterales de los aminoácidos facilitando su interacción con el agua. Posteriormente, la fracción soluble se separó de la insoluble por centrifugación y el perfil de proteínas contenidas en ambas fracciones se analizó por

electroforesis. Los cuerpos de inclusión de las cepas que sobre-expresan a la AtAcd22.1 se solubiliza eficientemente mientras que la Nod22 no se solubilizaron completamente en guanidina. De este modo, la AtAcd22.1 solubles se empleó para llevar a cabo experimentos posteriores.

La proteína recombinante AtAcd22.1 no se eluye de las perlas Ni-NAT.

Anteriormente se mencionó que las proteínas recombinantes Nod22 y AtAcd22.1 se expresan con una fusión de seis histidinas en el extremo NH-terminal, por lo que estas proteínas pueden purificarse a través de una columna de Ni-NAT (Figura 7). Las proteínas solubilizadas a partir de los cuerpos de inclusión se incubaron con la resina Ni-NAT. Tras un lavado exhaustivo, se adicionaron concentraciones crecientes de imidazol como agente de elución (200 mM a 4 M), el análisis de las fracciones obtenidas de las proteínas de fusión no se eluyeron de la resina bajo ninguna condición probada e incluso utilizando diferentes soluciones con distintos detergentes para remover contaminantes, tales como ácidos nucleicos, lípidos u otras proteínas que estuvieran en complejo con la proteína AtAcd22.1 y por último se utilizaron soluciones a diferentes pH tanto ácidos como básicos en presencia de imidazol (1M) y se probó la elución en presencia de agentes quelantes (EGTA 200 mM y EDTA 200 mM), sin embargo, el uso de estas soluciones no lograron provocar la elución de la AtAcd22.1.

Solubilización y purificación de la Nod22 bajo condiciones desnaturalizantes de urea.

Como se mencionó anteriormente, la Nod22 se solubiliza en guanidina. Sin embargo, la concentración de la proteína soluble obtenida es muy baja, por lo que se decidió solubilizar a los cuerpos de inclusión en urea. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 8 M de urea y se obtuvo un rendimiento óptimo de la proteína (Figura 9 A, carril 5). A partir de estos fraccionamientos solubles se llevaron a cabo los experimentos de pegado a la columna de Ni-NAT (Figura 9, carril 6). Después de un lavado exhaustivo con 8 M de urea y el buffer de lavado ideado para eluir contaminantes en la resina, se le adicionó el buffer B para eluir a la proteína de interés. Bajo estas condiciones desnaturalizantes, la His-Nod22 se purifica adecuadamente (Figura 9, carril 8). Posteriormente, se realizó un ensayo tipo *Western-blot* con el anticuerpo anti-Nod22 con

el fin de verificar si efectivamente la proteína purificada corresponde a la Nod22 (Figura 9 B).

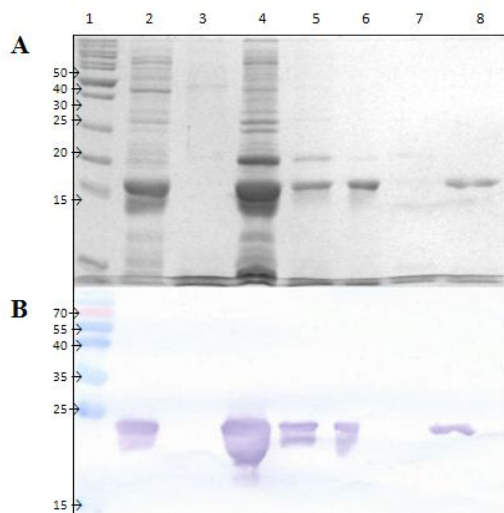


Figura 9. Purificación de la Nod22. **A.** La Nod22 se purificó bajo condiciones desnaturizantes de urea. La Nod22 se expresa adecuadamente a las 4 horas de inducción con IPTG (carril 2). Los extractos que contienen a la Nod22 se sonicaron y centrifugaron obteniendo una fracción soluble y una insoluble (carriles 3 y 4, respectivamente). Los cuerpos de inclusión que contienen a la Nod22 se solubilizaron en 8 M de urea (carril 5). Las fracciones colectadas en urea se hicieron pasar a través de la resina de Ni-NAT (carril 6). La elución se efectuó inicialmente lavando la resina con 8 M de urea para eluir contaminantes (carril 7) y posteriormente con una solución compuesta por 8 M de urea, 20 mM de ácido acético pH 4 y 4 ml de 100 mM de imidazol (carril 8). **B.** Se verificó la presencia de la Nod22 por *Western blot* con el anticuerpo anti-nodulina22 que nos indica la presencia de la proteína recombinante en las fracciones mencionadas. Carril 1 marcador de peso molecular.

La fracción enriquecida Nod22 se encuentra suspendida en el buffer B de elución que contiene 8 M de urea, por lo que se encuentra desnaturalizada. Para recobrar su estructura nativa, las fracciones recuperadas se dializaron en el buffer D a pH 7.5. Después de dos cambios de buffer cada 12 horas, la muestra se centrifugó. Se obtuvo un precipitado y una fracción soluble, mismos que se analizaron por electroforesis en un gel de acrilamida (Figura 10).

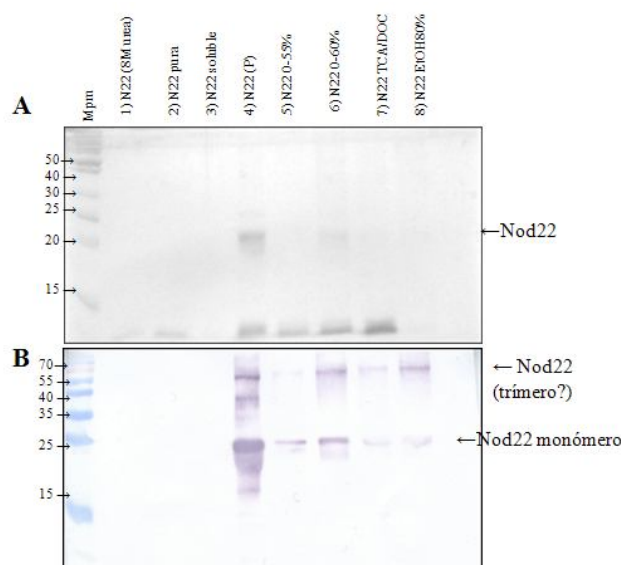


Figura 10. Identificación en la fracción soluble de la Nod22. **A.** Las fracciones colectadas de la purificación de la Nod22 que están contenidas en 8 M de urea, 100 mM de imidazol fueron dializadas contra el buffer de actividad (HEPES 25 mM, 150 mM KCl, 2 mM DTT, pH 7.5). Las muestras se colectaron y se centrifugaron obteniendo una fracción soluble (carril 4) y un precipitado (carril 5) y se analizaron en un gel de acrilamida al 15%. **B.** Se verificó la presencia de la AtAc22.1 en cada una de las fracciones por *Western blot* con el anticuerpo anti-nodulina22, que nos indica la presencia de la proteína recombinante en las fracciones mencionadas.

Debido a que la Nod22 se encuentra en bajas concentraciones en la fracción soluble en el buffer de actividad, y considerando que este efecto pudiera estar relacionado al pH del medio (pH 7.5), nos dimos a la tarea de re-cambiar el buffer de actividad empleando soluciones con diferentes pHs (7 y 6.5). Las fracciones solubles e insolubles de la diálisis con los nuevos buffers de actividad fueron analizadas.

En la figura 11 se muestra la acumulación de la Nod22 en la fracción soluble e insoluble del buffer de actividad que tiene pH 7 (Figura 11, carriles 8 a 9), mientras que a pH 6.5 la proteína se acumula muy poco en la fracción soluble (Figura 11, carriles 2 a 5), por lo que pudimos concluir que el pH óptimo en el buffer de actividad para la Nod22 es

de 7, debido a que se encuentra acumulada en la fracción soluble aunque también se encuentra en la fracción insoluble.

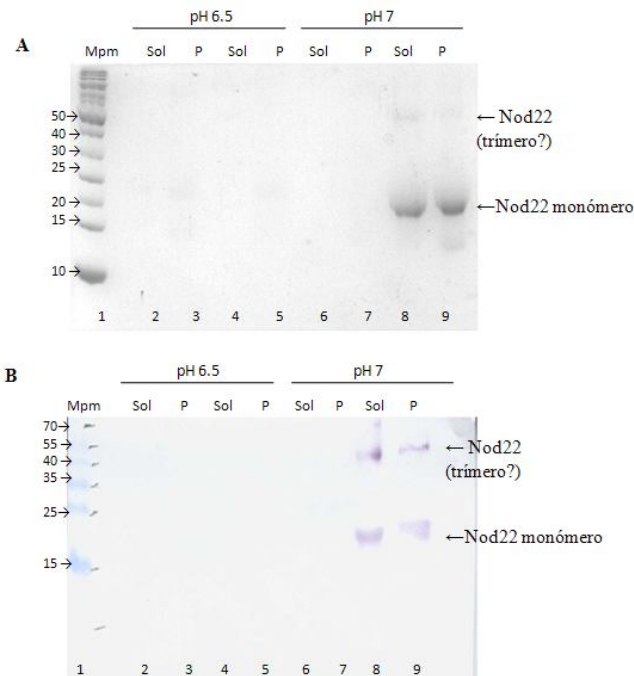


Figura 11. Identificación en la fracción soluble de la Nod22. **A.** Diferentes fracciones colectadas de la purificación de la Nod22 que están contenidas en 8M de urea, 100mM de imidazol fueron dializadas contra el buffer de actividad (HEPES 25mM, 150mM KCl, 2mM DTT) la fracción 3 (carril 2 y 3) a pH 6.5 y carriles 6 y 7 a pH 7 no se acumula a la Nod22. Mientras que en la fracción 4 (carril 8 y 9) a pH 7 la proteína se solubiliza además de que hay una fracción en el precipitado (P) y la fracción 4 a pH 6.5. no se acumula la proteína (carriles 4 y 5). **B.** Se verificó la presencia de la Nod22 por *Western blot* con el anticuerpo anti-nodulina22 que nos indica la presencia de la proteína recombinante en las fracciones mencionadas.

Ganea (2001) ha reportado que las sHsps interaccionan con proteínas desnaturalizadas. Por ello, para analizar si la fracción soluble que contiene a la Nod22, presumiblemente en estado nativo, es capaz de interactuar con otras proteínas, se realizó un ensayo tipo *Far-Western-Blotting*. Se incubó 1 ml de la fracción soluble de la Nod22 con distintas proteínas desnaturalizadas en buffer de Laemmli y hervidas a 94°C (BSA, caseína, lisozima y α 2-macroglobulina) y se unieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-Nod22 y se efectuó la inmunodetección de la misma siguiendo el protocolo descrito en la sección correspondiente a materiales y métodos. El análisis de la interacción indica que la Nod22 se une a las proteínas desnaturalizadas, principalmente a la lisozima, y en menor proporción a la α 2-macroglobulina, la BSA y la caseína (Figura 12 A). Sin embargo, en el control de la lisozima la Nod22 reconoce a la proteína nativa. Esto posiblemente se debe

a que la proteína se encuentre degradada (Figura 12 A, carril 1). La incubación de las proteínas desnaturalizadas con el anticuerpo anti-Nod22 en ausencia de la proteína se efectuó con el fin de verificar que la señal obtenida no se debía a una reacción cruzada inespecífica del anticuerpo (Figura 12 B).

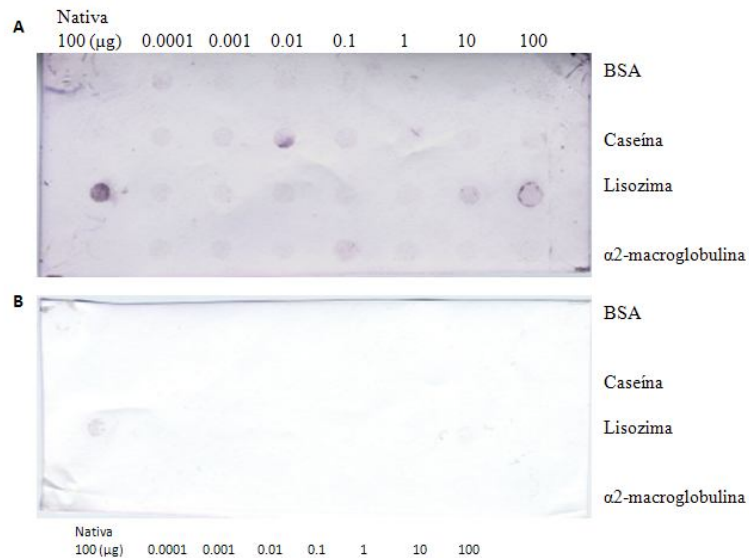


Figura. 12. Interacción de la Nod22 con proteínas desnaturalizadas. **A.** La fracción dializada que contiene a la Nod22 nativa se incubó con diferentes proteínas desnaturalizadas (BSA, caseína, lisozima y α 2-macroglobulina) a diferentes concentraciones. En el carril 1 corresponde a cada una de las proteínas en buffer nativo. A partir del carril 2 se incrementaron las concentraciones de las proteínas desnaturalizadas. El ensayo tipo *Far Western Blot* se incubó con la Nod22 y posteriormente con el anticuerpo anti-Nod22. **B.** Mientras que como control se incubó solamente el anticuerpo anti-nod22 con las proteínas desnaturalizadas.

Solubilización y purificación de la AtAcd22.1 bajo condiciones desnaturalizantes.

Como se mencionó anteriormente, la AtAcd22.1 se solubiliza en guanidina. Sin embargo, la concentración final de esta proteína es extremadamente baja, insuficiente para llevar a cabo estudios posteriores. Por ello, recurrimos a la solubilización de los cuerpos de inclusión, con el fin de obtener a la AtAcd22.1 purificada a homogeneidad, se evaluaron condiciones desnaturalizantes que incluyen arginina ácida (Tsumoto *et al*, 2004). Los resultados indican que la AtAcd22.1 se purifica adecuadamente bajo estas condiciones desnaturalizantes en presencia de arginina ácida (Figura 13, carril 5).

Posteriormente, con el fin de verificar la identidad de la proteína purificada, se realizó un ensayo tipo *Western blot* con el anticuerpo anti-Nod22 (Figura 13 B).

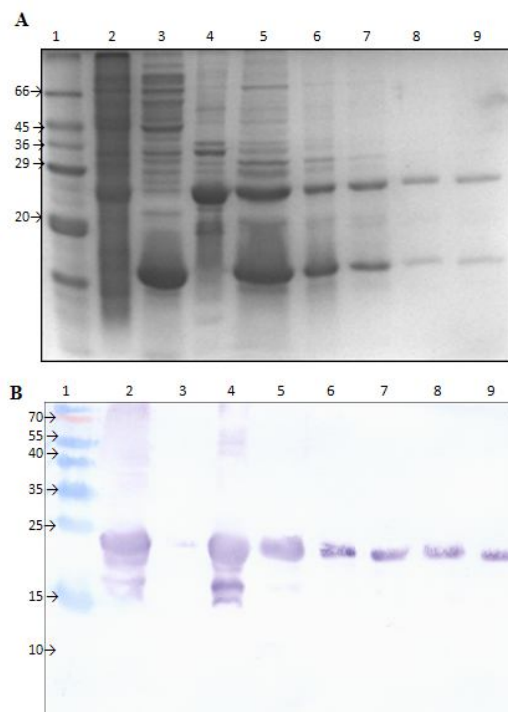


Figura 13. Purificación de la AtAc22.1. **A.** La AtAc22.1 se purificó bajo condiciones desnaturizantes de arginina ácida. La AtAc22.1 se expresa adecuadamente a las 4 horas de inducción con IPTG (carril 2). Los extractos que expresan la AtAc22.1 se sonicaron y centrifugaron obteniendo una fracción soluble y una insoluble (carriles 3 y 4, respectivamente). Los cuerpos de inclusión donde se encuentra la AtAc22.1 se solubilizaron en 1M de arginina ácida (carril 5) y se hizo pasar a través de la resina de Ni-NAT (carril 6). La elución se efectuó inicialmente lavando la resina con 1M de arginina ácida para eluir contaminantes (carril 7) y posteriormente se eluyó con 1M de arginina ácida y 100 mM de imidazol (carril 8 y 9). **B.** Se verificó la presencia de la AtAc22.1 por *Western blot* con el anticuerpo anti-nodulina22 que nos indica la presencia de la proteína recombinante en las fracciones mencionadas. Carril 1, marcador de peso molecular.

Ensayo de actividad de chaperona molecular *in vitro* de la Nod22.

Se encuentra descrito que las sHsps pueden proteger eficientemente a otras proteínas de su agregación inducida por el estrés calórico. Para analizar que la Nod22 está involucrada en proporcionar protección a la inactivación por calor a una enzima modelo, utilizamos como posible sustrato de la Nod22 a la enzima luciferasa, ya que los ensayos de actividad con esta proteína son altamente sensibles al ser evaluados por bioluminiscencia. Inicialmente, efectuamos un ensayo de la actividad de la luciferasa (a 50 nM), y distintos controles como son la luciferasa sin ATP, sin sustrato (luciferina) o la

propia luciferasa calentada a 42°C (Figura 14 A) y se midió su actividad en un experimento efectuado por triplicado a diferentes tiempos. Posteriormente, realizamos el ensayo de actividad de chaperona molecular incubando a la luciferasa con diferentes concentraciones de la Nod22. En la figura 14 B se observa que al incubar la luciferasa calentada a 42°C con diferentes concentraciones de Nod22 (1 µM o 250 nM), la recuperación de actividad de la luciferasa se observa principalmente en presencia de la Nod22 a 1 µM y 250 nM, mientras que a concentraciones 3 µM y 6 µM donde observamos que la actividad de luciferasa disminuye, conforme la concentración de esta chaperona incrementa (Figura 14 C).

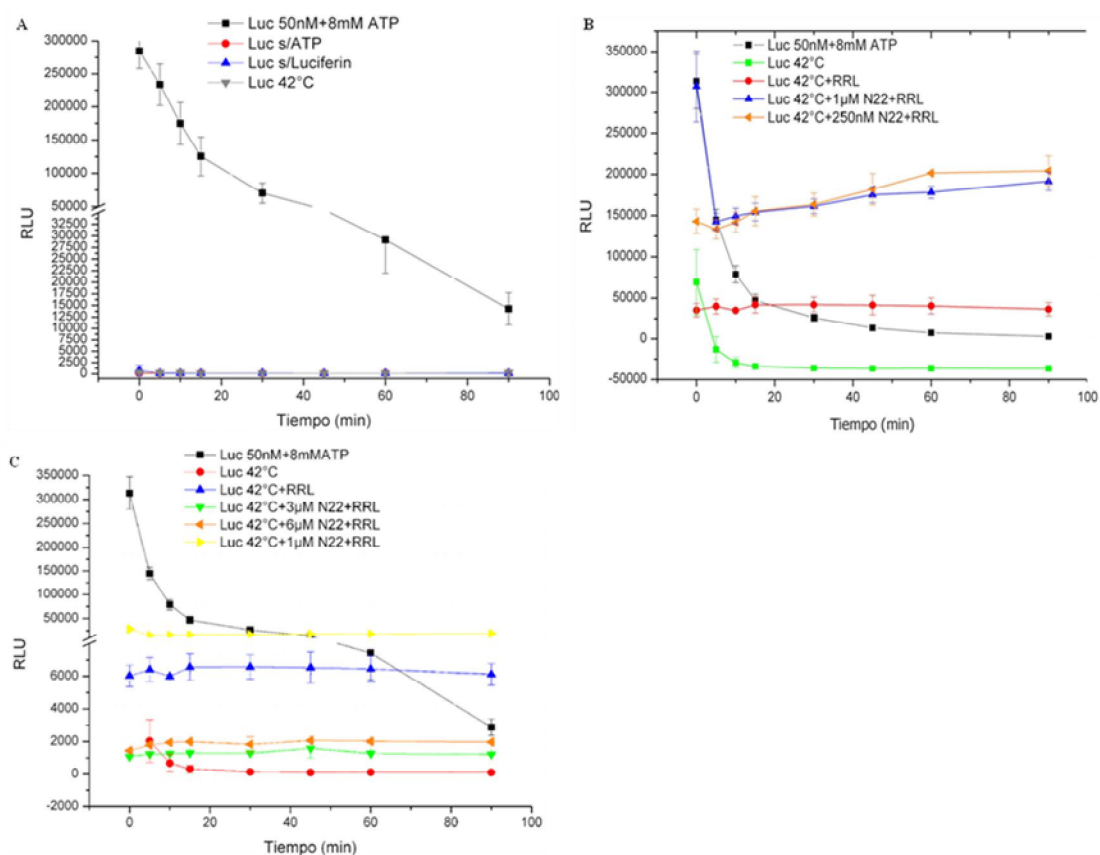


Figura 14. Ensayo de actividad de chaperona molecular *in vitro* de la Nod22. A. Se midió la actividad de luciferasa (LUC) en diferentes ensayos control utilizando 50 nM de enzima en cada experimento. ■ indica la actividad de LUC, ● LUC sin ATP, ▲ LUC sin sustrato y ▼ LUC desnaturizada a 42 °C. B. Las muestras de LUC fueron tratadas a 42 °C por 20 minutos en presencia de distintas concentraciones de Nod22 (▲ 1µM y ◀ 250nM). C. Las muestras de LUC fueron tratadas a 42 °C por 20 minutos en presencia de distintas concentraciones de Nod22 (▼ 3µM y ◀ 6µM). Posteriormente, se diluyeron en lisado de reticulocitos (RRL) hasta una concentración final de 50 nM de LUC; la reactivación de la LUC se monitoreó durante 90 minutos. Los datos graficados son el resultado del promedio de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar se indican con barras de error en cada gráfica. Se utilizó como control a la LUC desnaturizada a 42 °C sin Nod22 (■) y LUC a 42 °C en presencia de RRL sin Nod22 (●).

Generación de las mutantes Nod22 R124G y Nod22 R131G.

Una de las características más importantes de la sHsps es su actividad de chaperona. Distintos estudios indican que esta actividad reside en el dominio α -cristalino. Existen varias mutaciones relacionadas a la pérdida de la función de chaperona, por ejemplo, la mutación R120G en el ACD de la α B-cristalina que resulta en una estructura cuaternaria irregular relacionada con la formación de cataratas y enfermedades cardiovasculares en humano (Bova *et al*, 1999). En este trabajo nos planteamos evaluar la función de las argininas localizadas en el dominio α -cristalino de la Nod22 mediante una mutación puntal. Diseñamos oligonucleótidos internos que resultan en el cambio de la arginina 115 y de la arginina 131 en la Nod22. Ambos residuos potencialmente están involucrados en la función de chaperona; que se localizan en el dominio ACD.

Utilizando como templado al cADN de la Nod22 silvestre, se realizó una PCR con los oligonucleótidos internos, para generar dos fragmentos que presentan ambas mutaciones. Los fragmentos obtenidos para la mutación en la arginina 115 presentan un tamaño de 266 pb y de 354 pb (Figura 15 A) mientras que los dos fragmentos obtenidos para la mutación en la arginina 131 presentan un tamaño de 404 pb y de 202 pb, respectivamente (Figura 15 A). Posteriormente, estos fragmentos se clonaron en el vector de clonación pJET1.2/blunt y se analizaron las colonias seleccionadas (Figura 15 B). Posteriormente, se purificaron los plásmidos que contienen los insertos mutagenizados con el fin de efectuar una segunda ronda de PCR re-ensamblando los dos fragmentos para obtener la secuencia completa de la Nod22 utilizando para ello oligonucleótidos externos que codifican en las zonas del codón de inicio (ATG) y del codón de paro (TGA) del gen (Figura 15 C). Por otro lado, los fragmentos de 500 pb que se obtuvieron en la segunda ronda de PCR, se clonaron en el vector de clonación pJET1.2/blunt y se mandaron secuenciar, lo cual nos indico, que no presentaban la mutación deseada por lo que la metodología utilizada en el diseño de mutantes no es el más adecuado por lo que se plantea en un futuro utilizar técnicas diferentes para el diseño de mutantes.

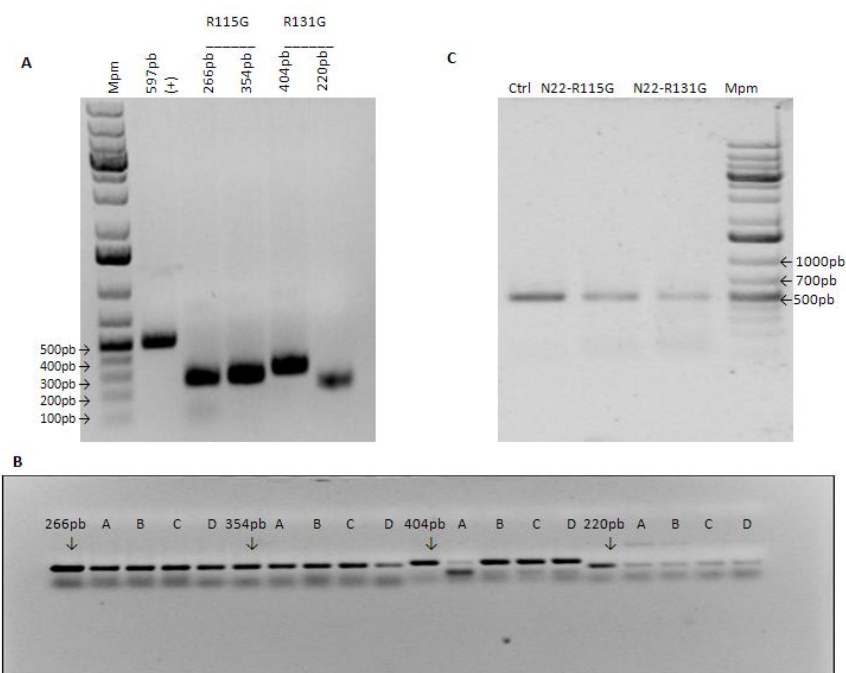


Figura 15. Generación de las mutantes Nod22R115G y Nod22 R131G. **A.** La obtención de las mutantes por solapamiento se generaron a partir de la síntesis de oligonucleótidos internos que contienen la mutación, generando dos fragmentos (266 y 354 pb). Ambos fragmentos inducen el cambio del codón que codifica para la arginina 115 (CGG) por una glicina (GGG). Por otro lado, para la obtención de la mutante R131G se obtienen fragmentos de 404 y de 202 pb. **B.** Colonias bacterianas que contienen el plásmido con el inserto de cada una de las mutantes **C.** Los fragmentos obtenidos de 266 y 354 pb que contienen a la mutación R115G se emplearon en una segunda ronda de PCR, para obtener la secuencia completa del cADN que codifica para la Nod22 mutante para ese aminoácido. Por último, se utilizaron los fragmentos de 404 y de 202 pb que contienen a la mutación R131G en una segunda ronda de PCR para obtener la secuencia completa del cADN que codifica para la Nod22 mutante para ese aminoácido. El fragmento de 500 pb es el tamaño del cADN de la Nod22 WT que se utilizó como control.

Predicción preliminar de la estructura secundaria de la Nod22 y de la AtAcd22.1 y validación de los modelos tridimensionales.

Existen escasas estructuras terciarias en la base de datos de proteínas. Entre ellas, la estructura de la Hsp16.9 de trigo que tiende formar dobles anillos de 12 subunidades subunidades (Montfort *et al*, 2001), es el único ejemplo para sHsps de plantas. Por ello, en nuestro laboratorio nos dimos a la tarea de modelar la estructura de la Nod22 y de la AtAcd22.1 con la ayuda del programa *Modeller*, utilizando como molde de partida la estructura cristalizada de la Hsp16.9 de trigo (PDB: 1GME). Los resultados preliminares de la estructura de la Nod22 y de la AtAcd22.1 obtenidos mediante esta estrategia revelan que estas proteínas presentan una identidad del 55% y del 45 % con respecto a la

Hsp16.9 de trigo, por que el modelo de la AtAcd22.1 se diseñó a partir del modelo validado de la Nod22. Sin embargo, estructuralmente el ACD se encuentra altamente conservado (I). Además, el dominio N-terminal presenta una pequeña estructura α -hélice muy parecida a la Hsp16.9 (II) mientras que el dominio C-terminal no muestra una estructura definida, es decir, presenta una región desordenada (Figura 16).

Cuando un nuevo modelo se genera, es necesario validar la dinámica molecular. Nuestro procedimiento de validación se efectuó con el programa *CNS_solve*, en el que se efectúa un refinamiento posicional de los aminoácidos con la intención de disminuir la variación de los ángulos, la longitud de los enlaces entre los residuos y minimizar la energía (recocido simulado = simulated annealing). Este proceso computacional refleja los pasos establecidos en el proceso físico del tratamiento térmico de proteínas, es decir, se incrementa inicialmente la temperatura y gradualmente se enfría hasta alcanzar un estado de conformación energéticamente estable, reconocido como el plegamiento más adecuado en donde la entropía sea la menor posible (Clote & Backofen, 2000).

El algoritmo *CNS_solve* generó tres estructuras para la Nod22 y la AtAcd22.1, que presentan diferentes valores *rmsd* (o desviación de la raíz cuadrada de las medias, que es una medida para verificar el ajuste entre dos moléculas). Este valor de *rmsd* nos calcula particularmente, un porcentaje de las distancias entre las cadenas principales de dos proteínas que han sido superpuestas, por lo que la Nod22 presenta un valor de *rmsd* de 1.283 Å con respecto a la wHsp16.9, mientras que la AtAcd22.1 un valor *rmsd* de 0.7364 con respecto a la Nod22. Estos valores nos permiten indicar el movimiento de las diferentes partes de la proteína que se modifican con respecto al tiempo. Los valores elevados de *rmsd* indican que la proteína es flexible y sufre diversos cambios significativos durante la simulación.

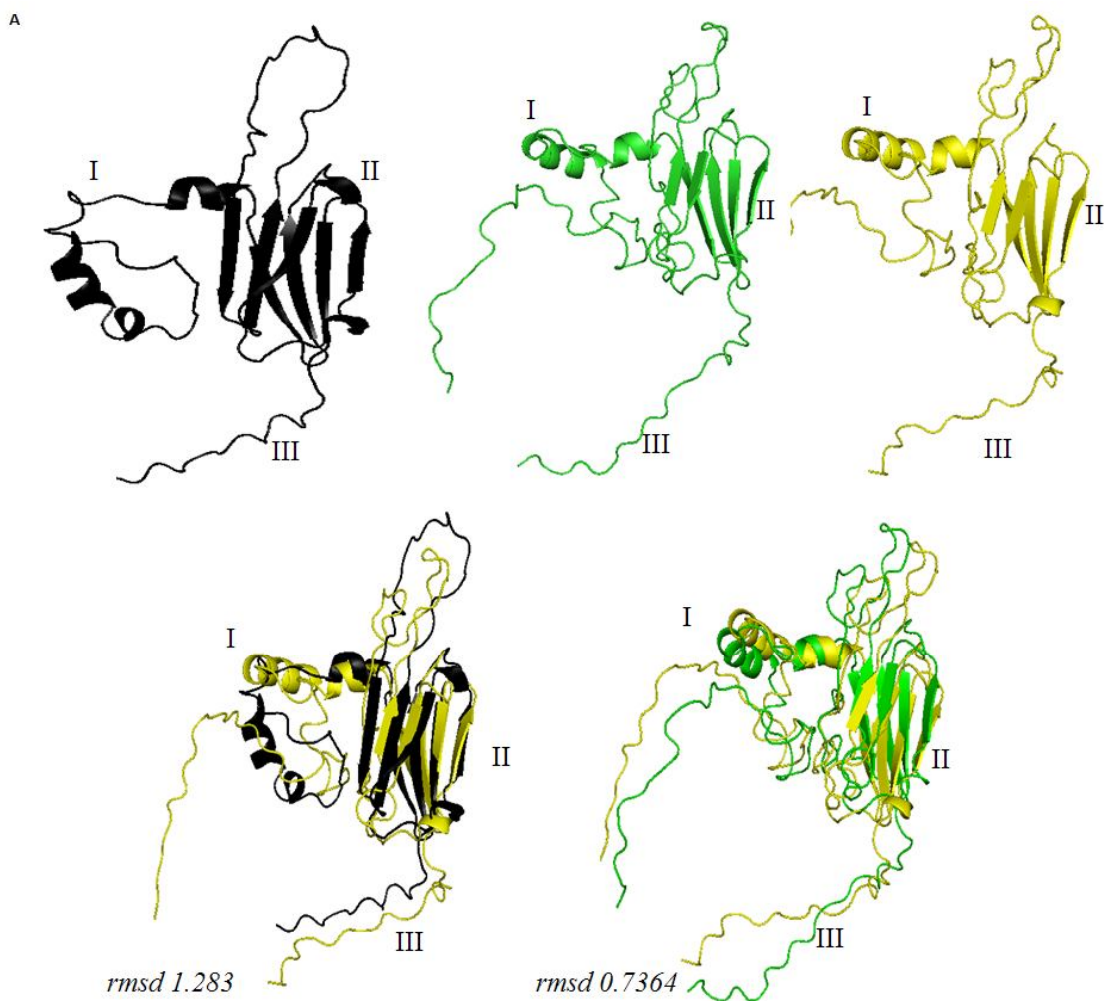


Figura 16. Modelo tridimensional de la Nod22 y de la AtAc22.1. Las estructuras de la Nod22 se diseñaron tomando como molde la sHsp16.9 de trigo previamente cristalizada (van Montfort *et al*, 2001). **A.** Modelo de la sHsp16.9 de trigo (negro), modelos generados de la Nod22 (amarillo) y de la AtAc22.1 (verde). **B.** Superposición de la estructura secundaria de la Nod22 con la sHsp16.9 panel de la izquierda y modelo superpuesto de la Nod22 con la AtAc22.1 panel de la derecha. Los números I , II y III indican los dominios N-terminal, Dominio alfa cristalino y C-terminal respectivamente que conforman las sHsps. Los valores de *rmsd* fueron calculados con el programa *Wincoot 0.5.2*.

Discusión.

En plantas existe una gran diversidad y abundancia de sHsps, y se ha propuesto que éstas participan de manera importante en la protección celular ante diversos tipos de estrés. Las sHsps de plantas conservan el dominio α -cristalino (ACD) y dos motivos básicos, al igual que todas las sHsps de eucariontes. Se ha sugerido que las sHsps funcionan como chaperonas moleculares ATP-independientes, al unirse a proteínas que se encuentran parcial o totalmente desnaturalizadas y de esta manera, previenen su agregación irreversible. En el genoma de *Arabidopsis* existen 19 marcos de lectura abiertos que codifican para proteínas relacionadas con las 5 clases previamente caracterizadas de sHsps de plantas. Además, existe un nuevo grupo de proteínas que está representado por 25 marcos de lectura abiertos que codifican para sHsps que contienen uno o más ACD (Scharf *et al*, 2001). Los miembros de las sHsps de diferentes especies de plantas presentan una alta identidad en su secuencia de aminoácidos. La Nod22 es una proteína que posee una alta identidad con las sHsps de plantas y que, comparada con la AtAcd22.1, tiene una identidad del 54%.

Se generó un árbol filogenético con los miembros de las 7 sub-familias reportadas por Scharf y col. (2001) y las 5 nuevas sub-familias definidas por Siddique y col (2008), en el que podemos observar que la Nod22 y la AtAcd22.1 no se agrupan dentro de ninguna sub-familia de las sHsps, con base en esto podemos establecer una 13 subfamilia de sHsps que se encuentra conservada en leguminosas como *G. max* y *M. truncatula*. Por otro lado, las sHsps reportadas están involucradas en el estrés, así como, durante distintas etapas del desarrollo, por lo que consideramos que la Nod22 es una chaperona involucrada particularmente en el proceso de nodulación a diferencia de las otras sHsps reportadas que no se encuentran presentes en este proceso. Podría ser una chaperona específica para este tipo de desarrollo e incluso como una proteína que se encuentra involucrada en el estrés que se presenta durante la simbiosis. Por otro lado, los datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la AtAcd22.1 se expresa en semilla, silicuas y flor por lo que podría ser una proteína involucrada en procesos del desarrollo donde existe una elevada síntesis de proteínas, similar a las condiciones que se presentan en los nódulos con una alta actividad metabólica. Podríamos suponer que tanto en el tejido reproductor y en el nódulo la tasa tan elevada de síntesis de proteínas podría generar una tendencia a formar agregados proteicos y que esta proteína podría impedir su formación.

Sin embargo, se conoce muy poco de la función de esta proteína por lo que aun no podemos establecer con certidumbre el papel que desempeña dentro de la célula.

Aunque la Nod22 y la AtAcd22.1 presentan una alta identidad a nivel de su secuencia de aminoácidos, sus características fisicoquímicas son distintas. Existen reportes en la literatura que involucran la sobre-expresión de las sHsps de plantas en sistemas bacterianos (Lee *et al*, 1998). En concordancia, con el fin de purificar a homogeneidad ambas proteínas, en este trabajo estudiamos su cinética de inducción en sistemas de expresión heterólogos. Ambas proteínas se acumulan mayoritariamente tras cuatro horas de inducción, por lo que consideramos este tiempo como punto de partida para el protocolo de purificación (Figura 8).

La sobre-expresión de sHsps o de otras proteínas recombinantes en sistemas bacterianos frecuentemente forma cuerpos de inclusión (Kuczyńska-Wiśnik *et al*, 2004). La formación de cuerpos de inclusión puede ser considerada como una ventaja en el proceso de purificación debido a que éstos son fáciles de aislar por centrifugación. Sin embargo, para la recuperación de las proteínas recombinantes es indispensable emplear agentes desnaturizantes como la urea, lo cual puede afectar de manera irreversible el proceso de re-plegamiento del péptido, y por ende, su función. En este identificamos tanto la Nod22 como la AtAcd22.1 donde se encontraron acumuladas en cuerpos de inclusión (Figura 9, carril 4 y figura 13, carril 4) respectivamente.

Es importante mencionar que el diseño molecular del vector de expresión usado en este ensayo fusiona al extremo NH-terminal una cola de histidinas, lo cual hace posible la purificación de ambas proteínas por cromatografía de afinidad empleando una columna de níquel y, posteriormente, su elución con diferentes concentraciones de imidazol.

Inicialmente solubilizamos a la Nod22 en 8 M de urea y la unimos a la columna de níquel. Esta sHsp interacciona adecuadamente a la resina en presencia de urea (Figura 9, carril 6) y se eluye eficientemente al agregar el buffer B (Figura 9, carril 8), lo cual nos permitió la purificación de esta sHsp.

Por otro lado, el análisis de la secuencia de amino ácidos de la AtAcd22.1 indica que esta proteína presenta cinco histidinas contiguas localizadas en las posiciones 47-51, lo cual, aunado a la cola de histidinas fusionadas a la versión recombinante de esta proteína, puede resultar en la formación de once enlaces con el níquel, y en consecuencia, en una mayor fuerza de interacción con la resina, lo cual explicaría el por qué fallaron las diferentes estrategias de elución probadas e incluso consideramos que el uso de la guanidina podría interferir con el proceso de purificación por lo que decidimos

utilizar a otro agente caotrópico que nos permitiera la solubilización de los cuerpos de inclusión. Ecroyd y Carver (2007) han descrito el uso de arginina ácida para suprimir la agregación de proteínas. La arginina disminuye la tendencia de las proteínas desnaturalizadas a formar estructuras plegadas incorrectamente mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas en las que interviene su grupo guanidino. Dichas interacciones previenen el establecimiento de interacciones intermoleculares que llevan al incorrecto plegamiento de las proteínas y a su consecuente agregación. Por otro lado, Tsumoto y col. (2004) han descrito que la utilización de Arg-HCl en la purificación de anticuerpos (IgG₄) por cromatografía de afinidad depende de la concentración de arginina y del pH de la solución para eluir el anticuerpo. Estos autores obtuvieron el 82% del anticuerpo total eluído con 0.5 M de Arg a pH 4.1, 84% con 2 M de Arg a pH 4.4 y 65% con 2 M de Arg a pH 4.7. Existen reportes adicionales que describen el uso de arginina en la prevención de la agregación de diferentes proteínas, como la lisozima, RNasa A, quimiotripsina, concavalina A, citocromo c y la mioglobina (Shikari *et al*, 2002).

Considerando esta información, decidimos utilizar arginina para disgregar a la chaperona AtAc22.1 de los cuerpos de inclusión. Solubilizamos a los cuerpos de inclusión que contienen a la AtAc22.1 en 1 M de Arg-HCl y observamos esta sHsp interacciona adecuadamente con la resina de níquel en presencia de arginina ácida y se eluye eficientemente al agregar el buffer C (Figura 13).

Durante el proceso de purificación de la Nod22 y de la AtAc22.1 se identificaron los medios adecuados para mantener en su forma activa y soluble a las proteínas recombinantes. Dentro de los buffers empleados para la solubilización de diversas sHsps de plantas se encuentra el uso de sales que de potasio (KCl), reductores de cisteínas para la formación de puentes disulfuro y HEPES, que se considera un buffer capaz de contener las cargas positivas y negativas de los grupos ionizables de los aminoácidos (Lee & Vierling, 1998).

Por lo que el empleo del buffer D nos permitió, mantener a la Nod22 soluble a pH 7 (Figura 10). Derham y Harding (2002) y Biswas y col. (2007), mencionan que en proteínas con tendencia a formar oligómeros como las cristalinas αA y las αB -, los aminoácidos cargados (por ejemplo las argininas), están normalmente involucrados en la formación de puentes salinos y de hidrógeno. Además, se sabe que el grupo guanidino de la arginina interacciona con amino ácidos aromáticos que podrían estar involucrados en la formación del oligómero (Tsumoto *et al*, 2004). Los residuos de arginina a pH neutro están completamente protonados, es decir, cargados positivamente; por lo que pensamos que

estos aminoácidos se encuentran implicados en proporcionar la formación de la estructura nativa de la Nod22, en particular a pH 7. Sin embargo, para la AtAcd22.1 no hemos encontrado los medios adecuados para mantenerla en una forma soluble y activa debido a que el uso del buffer E nos permite mantener una fracción soluble de esta proteína, en un dato preliminar la AtAcd22.1 presenta muy poca actividad a pH ácidos (datos no mostrados).

Un segundo objetivo en este trabajo fue el analizar la actividad de chaperona *in vitro* de la Nod22 mediante la prevención de la inactivación de la luciferasa. Diversos estudios *in vitro* sugieren que la función biológica de las sHsps consiste en prevenir la agregación del sustrato que ha sido desnaturalizado por un algún tipo de estrés. Para ello, presentan al sustrato a otros componentes celulares que requieren de ATP para renaturalizarlos (Hsp70 ó Hsp60). Lo anterior sugiere un mecanismo de acción conjunto con el complejo Hsp70. Es sabido que aunque las sHsps no interactúan directamente con Hsp70, incrementan la recuperación de la actividad del sustrato en presencia de otras chaperonas. Este mecanismo es común en eucariontes y procariontes.

Diversos estudios de sHsps de origen vegetal indican que estas proteínas tienden a formar oligómeros compuestos por 8 a 12 subunidades. La disociación de estos oligómeros inducida por un choque térmico, propicia el intercambio de subunidades y la exposición de regiones hidrofóbicas, regiones que posiblemente están involucradas en la unión al sustrato (Friedrich *et al*, 2004). Siddique y col. (2008) han propuesto que otro factor importante en la interacción de las sHsps con proteínas desnaturalizadas es el dominio amino terminal que interviene con la unión al sustrato, así como el ACD con la actividad de chaperona.

Al respecto, se ha demostrado que la Hsp18.1 de chícharo, perteneciente a la clase I, recupera la actividad de la luciferasa en presencia de sistemas Hsp70 eucariontes o procariontes (Lee & Vierling, 2000). Por otro lado, Wang y Spector (2000) han demostrado que la cristalina αA y la αB de humano, tienden a re-naturalizar adecuadamente a la luciferasa en presencia de RRL (lisado de reticulocitos de conejo) o con sistemas de Hsp70/Hsp40 o Hsp60. Reddy y col. (2006), reportaron que cuando las cristalinas- α se pre-incubaban con su sustrato a temperaturas elevadas, estas tienden a sufrir cambios estructurales que permiten la exposición de sitios hidrofóbicos que participan importantemente en la actividad de chaperona. Además, se ha reportado que las sHsps requieren de la presencia de un sistema de chaperonas de alto peso molecular

para llevar a cabo la renaturalización de sustratos modelo. El uso de RRL proporciona una elevada concentración de chaperonas (Schumacher *et al*, 1994).

Por lo anterior, incubamos previamente a la luciferasa a 42°C con diferentes concentraciones de Nod22 que posteriormente se incubaron en presencia de RRL a 30°C, lo cual permite la reactivación de la luciferasa, y su actividad se midió con respecto al tiempo (Figura 14 A). Demostramos que la recuperación de la actividad de la luciferasa se presenta en concentraciones de 1 μ M y 250 nM de Nod22, lo que indica que la Nod22 es una chaperona molecular.

Anteriormente, Wang y Spector (2000) y Lee y Vierling (2000) reportaron que el incubar a la luciferasa desnaturalizada exclusivamente en presencia del RRL no es suficiente para recuperar su actividad. En nuestro ensayo, este dato fue consistente (Figura 13 B), por lo que decidimos utilizar dicha mezcla como un control negativo de la reacción. El reciente trabajo de Siddique y col. (2008), por otro lado, indica que la recuperación de la actividad de la luciferasa está directamente relacionada con la concentración de sHsps. Tomando estos datos en consideración, utilizamos diferentes concentraciones de Nod22 (3 y 6 μ M) (Figura 14 C) y observamos que la actividad de luciferasa disminuye conforme la concentración de esta chaperona incrementa. Este comportamiento poco común es similar a la Hsp16.6 de *Synechocystis*, que a concentraciones elevadas es incapaz de reactivar a la luciferasa (Friedrich *et al*, 2004) y no es parecido a las otras sHsps de *Arabidopsis thaliana* antes mencionadas.

Una de las características más importantes de las sHsps es su organización en complejos de alto peso molecular. Actualmente, se encuentran reportadas las estructuras de seis miembros de esta familia de chaperonas que han sido determinadas por técnicas de cristalografía o de microscopía electrónica. No obstante la diversidad en secuencia y las diferencias en el ensamble del oligómero que existe entre las diferentes sHsps, estas conservan una organización estructural común (Haslbeck *et al*, 2005).

En este trabajo, diseñamos las estructuras tridimensionales tanto de la Nod22 como de la AtAcd22.1, utilizando como modelo de partida a la sHsp16.9 de trigo. En la Figura 15 se representa el modelo de la Nod22 y se observa que esta proteína conserva características típicas en el plegamiento con respecto al modelo empleado. El plegamiento de la AtAcd22.1, por otra parte, resulta mayormente similar a la Nod22, posiblemente debido a que entre estas proteínas se conserva el 54% de identidad a nivel de amino ácidos.

En las sHsps, el extremo amino terminal, de secuencia y longitud variable, es requerido para la oligomerización e interviene en la interacción entre monómeros y la “captura” del sustrato (Trewick *et al*, 2003). La estructura parcialmente resuelta de esta región incluso sugiere que incrementa la flexibilidad de la molécula y la estabilización del oligómero (Rob *et al*, 2001). Asimismo, se ha reportado que este dominio presenta una estructura desordenada en la Hsp16.5 de *M. jannaschii*. Tanto la Nod22 como la AtAc22.1 tienen un extremo amino terminal integrado por 81 aminoácidos. Los resultados de los análisis estructurales llevados a cabo en este estudio indican a partir de su origen (el residuo de metionina) y hasta la prolina localizada en la posición 40 de la Nod22 o el aspártico situado en la posición 23 de la AtAc22.1, se presenta una estructura desordenada. Al respecto, Rob y col. (2001) demostraron que el solapamiento de las estructuras de la Hsp16.5 de *M. jannaschii* y la Hsp16.9 de trigo varía considerablemente justo en esta región, lo cual implica que no solo difieren en secuencia, sino que además el plegamiento en esta zona no es del todo conservado.

El dominio α -cristalino (ACD) es la firma típica de las sHsps y es el encargado de proporcionar la actividad de chaperona molecular. El ACD presenta un plegamiento similar a las inmunoglobulinas, esto es, un sándwich compacto de 3 a 5 β -plegadas en sentido anti-paralelo conectadas entre sí por una pequeña asa inter-dominio, que interviene en la formación de dímeros y que se conserva en toda la familia de sHsps (Van Montfort *et al*, 2001). En la Nod22 y la AtAc22.1, el dominio ACD se localiza a partir de los amino ácidos 82 al 171. La estructura tridimensional de la Nod22 y la AtAc22.1 diseñadas en este estudio conservan el plegamiento de β -plegadas anti-paralelas, tal y como se describe en el modelo de la sHsp16.9 de trigo (Figura 16).

Una vez generados los modelos tridimensionales de la Nod22 y la AtAc22.1, se procedió a su validación, se efectuó con los diferentes algoritmos: *Ramachandran plot 2.0*, PROSA-web, VERIFY3D, *Errat 2.0* y *PODNR* descritos en la metodología e indicado en las figuras suplementarias la cual consistió inicialmente en determinar los ángulos psi y phi de cada amino ácido. En la Figura suplementaria 1 se observa que para la mayoría de los aminoácidos de Nod22 y de la AtAc22.1 se encuentran en la regiones permitidas (80.10% y 88.78%, respectivamente). Los modelos diseñados de la Hsp16.5 de *M. jannaschii* (Kim *et al*, 1998) y la Hsp16.9 de trigo (Rob *et al*, 2001) incluyen alrededor del 80% de los aminoácidos dentro de esta zona.

Diversas proteínas han sido sometidas a la validación del programa PROSA-web, un par de ejemplos son los transportadores ABC, el MsbA de *E. coli* (PDB:1JQS) y el

Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (PDB:2HYD). Las gráficas generadas por este algoritmo muestran que la Nod22 presenta una calidad en el modelo obtenido de -2.52, lo cual indica que el valor se encuentra dentro de las características de las estructuras nativas generadas por métodos experimentales, mientras que la AtAcd22.1 presenta un z-score de -0.59, un valor alto, que no refleja el valor de una típica estructura nativa. Las gráficas de energía indican que el modelo de la Nod22 contiene regiones erróneas en una ventana de análisis de 10 amino ácidos, pero no en la de 40 amino ácidos, mientras que la AtAcd22.1 presenta errores en la mayoría de la secuencia y en ambas ventanas de análisis de aminoácidos, aunque con una pequeña región en el C-terminal que es aceptable. Esto nos indica que el uso de la Hsp16.9 de trigo y de la Nod22 como moldes de partida no son adecuados para determinar la estructura de la AtAcd22.1 (Figura suplementaria 2).

Por otro lado, las estructuras moleculares diseñadas se sometieron al análisis del algoritmo VERIFY3D. Este algoritmo nos permitió determinar que la gráfica obtenida de la Nod22 en la mayoría de sus regiones es compatible comprendiendo valores positivos a lo largo de su secuencia y sólo 34 residuos (17.17%) quedan exentos; mientras que la AtAcd22.1 tiene 88 residuos (44.44%) que se encuentran dentro los valores negativos. Lo anterior indica que el modelo de la Nod22 presenta mayor compatibilidad con su secuencia primaria, mientras que la AtAcd22.1 tiene menor compatibilidad con la secuencia 3D de amino ácidos, ya que presenta valores por arriba de cero en prácticamente la totalidad de su secuencia de amino ácidos, y particularmente en la región del dominio α -cristalino (amino ácidos 82-171), en donde se observa un plegamiento factible con su secuencia de primaria y con los ACD reportados. Por otro lado, la AtAcd22.1 solo presenta pequeños picos de valores altos en toda la secuencia, lo cual es un indicativo de que el modelo de la proteína presenta errores en el modelo generado (Figura suplementaria 3).

Por último, la validación del modelo se evaluó con el programa *Errat 2.0*, que compara las diferencias entre regiones correcta e incorrectamente plegadas dentro de la estructura de una proteína fundamentándose en las interacciones de sus átomos. El análisis de los modelos de la Nod22 y de la AtAcd22.1 indica que, pese a la presencia de errores en el extremo amino-terminal, tanto en la Nod22 como en la AtAcd22.1 existen regiones que se encuentran plegadas correctamente, principalmente, el ACD de ambas proteínas (Figura suplementaria 4).

El dominio C-terminal, que presenta una estructura flexible y que contiene aminoácidos polares que están involucrados en la interacción con el solvente, participa en la estabilización del oligómero, aunque no directamente en el proceso de oligomerización (Treweek *et al*, 2003, Rob *et al*, 2001 (2), Bhanuprakash *et al*, 2006). La introducción de aminoácidos hidrofóbicos en esta región, provoca alteraciones en la flexibilidad, reduce la estabilidad a temperaturas elevadas y reduce la actividad de chaperona (Ganea 2001). De hecho, el análisis de agregados por RMN de distintas sHsps de mamíferos, confirma que el C-terminal es flexible y no estructurado. En este trabajo identificamos que tanto la Nod22 como la AtAcd22.1 presentan un C-terminal de 25 amino ácidos de estructura desordenada (Figura Suplementaria 5a y 5b, respectivamente), lo cual confirma que es una evidencia más de su naturaleza como sHsps.

Conclusiones.

1. Los patrones de purificación de la Nod22 y la AtAcd22.1 son distintos, a pesar de presentar una identidad del 54% en su secuencia de amino ácidos
2. A pesar de presentar una identidad del 54% en su secuencia de aminoácidos, el comportamiento físico-químico de la Nod22 y de la AtAcd22.1 es distinto, lo cual posiblemente se debe a su función o localización específica en la célula o incluso por su interacción con algún sustrato concreto.
3. La Nod22 interacciona con proteínas desnaturalizadas en ensayos *in vitro*.
4. La Nod22 presenta actividad de chaperona molecular, siendo más eficiente a concentraciones bajas que a concentraciones por arriba de 3 μM , al reactivar a la luciferasa desnaturalizada.
5. El modelo de la estructura terciaria tanto de la Nod22 como de AtAcd22.1 indica que el ACD se encuentra altamente conservado. Por otro lado, la predicción preliminar y la validación de la estructura de la Nod22 sugiere que el modelo generado presenta valores aceptables.

Perspectivas.

- Solubilizar a la AtAcd22.1 en un buffer de actividad adecuado.
- Realizar los ensayos de actividad de chaperona molecular *in vitro* con la AtAcd22.1 purificada.
- Generar las mutantes para la Nod22 y la AtAcd22.1 en las argininas conservadas.
- Evaluar la tolerancia al estrés oxidativo y temperaturas elevadas en *E. coli* cuando expresen las proteínas mutantes tanto de la Nod22 y de la AtAcd22.1.
- Identificar las regiones de interacción de los sustratos de la Nod22 y la AtsHsp22.1 con 1,1'-bis(4-anilino) naphthalene-5,5'-disulfonic acid (bis-ANS) un marcador de regiones hidrofóbicas.

Literatura citada.

1. Arrigo AP. (2005). In Search Of The Molecular Mechanism By Which Small Stress Proteins Counteract Apoptosis During Cellular Differentiation. *J. Cell. Biochem.* 94:241–246.
2. Bhanuprakash RG, Kumar PA & Satish Kumar M. (2006). Chaperone-like Activity And Hydrophobicity Of α -Crystallin. *IUBMB Life.* 58:632-641.
3. Bellyei S., Szigeti A., Pozsgai E., Boronkai A., Gomori E., Hocsak E., Farkas R., Sumegi B & Gallyas F Jr. (2007). Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. *Eur J Cell Biol.* 86: 161-71.
4. Biswas A, Goshe J, Miller A, Santhoshkumar P, Luckey C, Bhat MB & Nagaraj RH. (2007). Paradoxical Effects of Substitution and Deletion Mutation of Arg56 on the Structure and Chaperone Function of Human α B-Crystallin. *Biochemistry.* 46: 1117-1127.
5. Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL & Horwitz J. (1999). Mutation R120G In α B-Crystallin, Which Is Linked To A Desmin-Related Myopathy, Results In An Irregular Structure And Defective Chaperone-Like Function. *PNAS.* 96: 6137-6142.
6. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Díaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E & Garrido C. (2000). Hsp27 Negatively Regulates Cell Death By Interacting With Cytochrome C. *Nat Cell Biol.* 2: 645-652.
7. Brünger A. T, Adams P. D, G. Clore M, DeLano W. L, Grose P, Grosse-Kunstleve R. W, Jiang J. S, Kuszewski J, Nilges M, Pannuh N.S, Read R.J, Rice L. M, Simonson T and Warren G.L. (1998). Crystallography & NMR System: A New

- Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.*D54:905-921.
8. Carver JA., Rekas A., Thorn DC & Wilson MR. (2003). Small Heat Shock Proteins And Clusterin: Intra- And Extracellular Molecular Chaperones With A Common Mechanism Of Action And Function?. *IUBMB Life.* 55: 661-668.
 9. Clamp M., Cuff J., Searle S. M. and Barton G. J. (2004), "The Jalview Java Alignment Editor". *Bioinformatics.* 20: 426-7.
 10. Computational Molecular Biology: An Introduction. P. Clote & R. Backofen. John Wiley and Sons ed. 2000. Cap 2: 43-45pp.
 11. Coca MA, Almoguera C Thomas TL & Jordano J. (1996). Differential Regulation Of Small Heat Shock Genes In Plants: Analysis Of A Water-Stress-Inducible And Developmentally Activated Sunflower Promoter. *Plant. Mol. Biol.*31: 863-876.
 12. Colovos C & Yeates T.O (1993). Verification Of Protein Structures: Patterns Of Nonbonded Atomic Interactions. *Protein Science.*2: 1511-1519.
 13. Derham B K & . Harding JJ (2002). Effects Of Modifications Of α -Crystallin On Its Chaperone And Other Properties. *Biochem J.* 364: 711-717.
 - a. Eckey-Kaltenbach H., Kiefer E., Grosskop E., Ernst D., Sandermann Jr H. (1997). Differential Transcript Induction Of Parsley Pathogenesis-Related Proteins And Of A Small Heat Shock Protein By Ozone And Heat Shock. *Plant. Mol. Biol* 33: 343-350.
 14. Eisenberg D., Luthy R and Bowie, J.U. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol.* 277: 396-404.

15. Ehrnsperger M, Gaestel M & Buchner J. (1999). Analysis of Chaperones Properties of Small Hsp's. *Meth Mol Biol*.99: 421-429.
16. Emanuelsson O, Henrik Nielsen, Søren Brunak and Gunnar von Heijne.(2000). Predicting Subcellular Localization Of Proteins Based On Their N-Terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol*. 300: 1005-1016.
17. Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin JJ, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RK, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P & Timmerman V. (2004). Mutant Small Heat-Shock Protein 27 Causes Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease And Distal Hereditary Motor Neuropathy. *Nat. Genet* 36: 602-606.
18. Facchini PJ & De Luca V. (1994). A cDNA Encoding a Low Molecular Mass Heat-Shock Protein from Opium Poppy. *Plant Physiol* 106: 811-812
19. Feder ME & Hofmann GE. (1999). Heat Shock Proteins, Molecular Chaperones And The Stress Response: Evolutionary And Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol* 61: 243-282.
20. Fonte V, Kipp DR, Yerg III J, Merin D, Forrestal M, Wagner E, Roberts CM & Link CD. (2008). Suppression of *in Vivo* Amyloid Peptide Toxicity by Overexpression of the HSP-16.2 Small Chaperone Protein. *J. Biol Chem*.283: 784-791.
21. Friedrich K, Giese KC, Buan NR & Vierling E. (2004). Interaction Between Small Heat Shock Protein Subunits and Substrate in Small Heat Shock Protein-Substrate Complexes. *J. Biol. Chem*.279: 1080-1089.

22. Gallyas Jr F. (2007). Preventing Apoptotic Cell Death By A Novel Small Heat Shock Protein. *Eur. J. Cell Biol.* 86: 161-171.
23. Ganea E. (2001). Chaperone-Like Activity Of α -Crystallin And Other Small Heat Shock Proteins. *Curr Prot & Pept Sci.* 2: 205-225.
24. Gnanasekar M, Anandharaman V, Anand SB, Nutman TB & Ramaswamy K. (2008). A Novel Small Heat Shock Protein 12.6 (HSP12.6) From *Brugia Malayi* Functions As A Human IL-10 Receptor Binding Protein. *Mol. Biochem. Parasit.* 159: 98-103.
25. Haslbeck M. (2002). sHsps And Their role In The Chaperone Network. *Cell Mol Life Sci.* 59: 1649-1657.
26. Haslbeck M., Franzmann., Weinfurter D & Buchner J. (2005). Some Like It Hot: The Structure And Function Of Small Heat-Shock Proteins. *Nat Struct & Mol Biol.* 12:842-846.
27. Helm KW., Lee GJ & Vierling E.(1997). Expression and native structure of cytosolic class II small heat-shock proteins. *Plant Physiol.* 114:1477-85.
28. Horwitz J. (2000). The Function Of α -Crystallin In Vision. *Cell & Developmental Biology* 11: 53-60.
29. Ingolia TD & Craig EA. (1982). Four Small Heat Shock Proteins Are Related To Each Other And To Mammalian α -Crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10449-10453.
30. Irobi J., Van Impe K., Seeman P., Jordanova A., Dierick I., Verpoorten N., Michalik A., De Vriendt E., Jacobs A., Van Gerwen V., Vennekens K., Mazanec R., Tournev I., Hilton-Jones D., Talbot K., Kremensky I., Van Den Bosch L., Robberecht W., Van Vandekerckhove J., Broeckhoven C., Gettemans J., De Jonghe P.,

- Timmerman V. (2004). Hot-Spot Residue In Small Heat-Shock Protein- 22 Causes Distal Motor Neuropathy. *Nat Genet* 36: 597-60.
31. Jakob U., Gaestel M., Engel., Buchner J. (1993). Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem* 268: 1517-1520
32. Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS & Hong CB. (2000). High Temperature Stress Resistance Of *Escherichia Coli* Induced By A Tobacco Class I Low Molecular Weight Heat-Shock Protein. *Mol Cells* 10: 519-24.
33. Jofré A, Molinas M & Pla M. (2003). A 10-Kda Class-CI sHsp Protects *E. coli* From Oxidative And High-Temperature Stress. *Planta* 217: 813-9.
34. Kato KH, Shinohara S, Goto Y, Inaguma R, Morishita & T Asano.(1992). Co-purification of Small Heat Shock Protein With α B-crystallin From Human Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 267:7718–7725.
35. Kashlan OB, Mueller GM, Qamar MZ, Poland PA, Ahner A, Rubenstein RC, Hughey RP, Brodsky JL & Kleyman TR. (2007). Small Heat Shock Protein α A-crystallin Regulates Epithelial Sodium Channel Expression. *J. Biol. Chem.* 282: 28149-28156.
36. Kim KK., Kim R & Kim SH. (1998). Crystal Structure Of A small Heat-Shock Protein. *Nature.* 394: 595-599.
37. Kuczyńska-Wiśnik D, Żurawa-Janicka D, Narkiewicz J, Kwiatkowska J, Lipińska B & Laskowska E. (2004). *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA/B Enhance Activity Of Enzymes Sequestered In Inclusion Bodies. *Acta Biochimica Polonica.* 51: 925-931.
38. Kyte J and Doolittle RF. (1982). A Simple Method For Displaying The Hydrophobic Character Of A Protein. *J Mol Biol.* 299: 501-522.
<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>.

39. Laemmli UK. (1970) Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
40. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontaney M & Garrido C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 743-761.
41. Lee GJ, Pokala N & Vierling E. (1995). Structure And *In Vitro* Molecular Chaperone Activity Of Cytosolic Small Heat Shock Proteins From Pea. *J. Biol. Chem* 270: 10432-10438.
42. Lee GJ & Vierling E. (1998). Expression, Purification And Molecular Chaperone Activity Of Plant Recombinant Small Heat Shock Protein. *Methods in Enzymology*.290: 350-365.
43. Lee GJ & Vierling E. (2000). A Small Heat Shock Protein Cooperates With Heat Shock Protein 70 Systems To Reactive A Heat –Denatured Protein. *Plant Physiol.* 122: 189-197.
44. Liberek K, Lewandowska A & Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. (2008). *EMBO J.* 27: 328-35.
45. Liu S, Li J, Tao y & Xiao X. (2007). Small Heat Shock Protein α B-Crystallin Binds To P53 To Sequester Its Translocation To Mitochondria During Hydrogen Peroxide-Induce Apoptosis. *Biochem & Biophys Res Commun.* 354: 109-114.
46. MacRae TH. (2003). Molecular Chaperones, Stress Resistance And Development in *Artemia franciscana*. *Sem cell Dev Biol.* 14:251-258.
47. Mao YW, Liu JP, Xiang H & Li WC. (2004). Human α A- and α B-crystallins Bind To Bax And Bclx_s To Sequester Their Translocation During Staurosporine-Induced Apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* 11: 512-526.

48. Mao L & Sheldon EA. (2006). Developmentally Regulated Gene Expression Of The Small Heat Shock Protein Hsp27 In Zebrafish Embryos. *Gene Expr Patt.* 6: 127-133.
49. Michaud S & Tanguay RM. (2003). Expression Of The Hsp23 Chaperone During Drosophila Embryogenesis: Association To Distinct Neural And Glial Lineages. *Mol. Reprod. Dev* 61: 3-13.
50. Mohammad, A, Miranda-Rios, J, Estrada Navarrete. G, Quinto, C, Olivares JE, García-Ponce, B & Sánchez F. (2004). Nodulin 22 From *Phaseolus Vulgaris* Protects *E. Coli* From Oxidative Stress. *Planta.* 219: 993-1002.
51. Mounier N & Arrigo AP. (2002). Actin Cytoskeleton And Small Heat Shock Proteins: How Do They Interact?. *Cell Stress & Chaperones.* 7: 167-176.
52. Rob L, Montfort RL van, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C & Vierling E. (2001). Crystal Structure And Assembly Of A Eukariotic Small Heat Shock Protein. *Nat Struct Biol* 8: 1025-1030.
53. Narbehaus F. (2002). α -crystallin-type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones In The Context Of A Multichaperone Network. *Micro & Mol. Biol Rev.* 66: 64-93.
- a. Neumann D., Nover L., Parthier B., Rieger R., Scharf K-D et al. (1989). Heat Shock And Other Stress Response Systems Of Plants. *Biologisches Zentralblatt* 108: 1-156.
54. Pace CN, Shirley BA, McNutt M & Gajiwala K. (1996). Forces Contributing To The Conformational Stability Of Proteins. *FASEB.* 10: 75-83.
55. Painter AJ, Jaya N, Vierling E, Robinson CV & Benesch JLP. (2008). Real-Time Monitoring Of Protein Complexes Reveals Their Quaternary Organization And Dynamics. *Chem & Biol.* 15: 246-253.

56. Puigderraols P., Jofré A., Mir G., Pla M., Verdaguer D., Huguet G & Molinas M. (2002). Developmentally And Stress-Induced Small Heat Shock Proteins In Cork Oak Somatic Embryos. *J. Exp Bot.* 53: 1445-1452.
57. Quigley PM, Korotkov K, Baneyx F & Hol Wim G. J. (2004). The 1.6-Å Crystal Structure Of The Class Of Chaperones Represented By *Escherichia coli* Hsp31 Reveals A Putative Catalytic Triad. *PNAS.* 100: 3137-3142.
58. Reddy GB, Kumar PA & Kumar MS. (2006). Chaperone-like Activity and Hydrophobicity of α -Crystallins. *IUBMB Life.* 58: 632-641.
59. Rob L., van Montfort RL., Basha E., Friedrich KL., Slingsby C., Vierling E. (2001). Crystal Structure And Assembly Of A Eukariotic Small Heat Shock Protein. *Nat Struct Biol* 8: 1025-1030.
60. Scharf KD., Siddique M & Vierling E. (2001) The Expanding Family Of *Arabidopsis thaliana* Small Heat Stress Proteins And A New family O Proteins Containing α -Crystallin Domains (Acid Proteins). *Cell Stress Chaperones:* 6: 225-237.
61. Schumacher R.J, Hurst R, Sullivan W.P, McMahon N.J, Toft D.O. & Matts R.L. (1994). ATP-Dependent Chaperoning Activity of Reticulocyte Lysate. *J. Biol. Chem.* 269: 9493-9499.
62. Siddique M, Gernhard S, von Koskull-Döring P, Vierling E & Scharf KD. (2008). The Plant sHsp Superfamily: Five New Members In *Arabidopsis thaliana* With Unexpected Properties. *Cell Stress Chaperones:* 13: 183-197.
63. Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C & Gómez L. (1999). Heterologous Expression Of A Plant Small Heat-Shock Protein Enhances *Escherichia coli* Viability Under Heat And Cold Stress. *Plant Physiol.* 120: 521-8.
64. Sun W, Van Montagu M & Verbruggen N. (2002). Small Heat Shocks Proteins And Stress Tolerance In Plants. *Biochem et Biophys acta.* 1577:1-9.

65. Treweek TM., Morris AM & Carver JA. (2003). Intracellular Protein Unfolded And Aggregation: The Role Of Small Heat-Shock Chaperone Proteins. *Aust J Chem.* 56: 357-367.
66. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima JS & Arakawa T. (2004). Role Of Arginine in Protein Refolding, Solubilization and Purification. *Biotechnol Prog.* 20: 1301-1308.
67. Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001). Structure And Function Of The Small Heat Shock Protein/Alpha-Crystallin Family Of Molecular Chaperones. *Adv. Protein Chem.* 59:105–156.
68. van Rijk AE., Stege GJ., Bennink EJ., May A & Bloemendal H. (2003). Nuclear staining for the small heat shock protein alphaB-crystallin colocalizes with splicing factor SC35. *Eur J Cell Biol.* 82:361-8.
69. Wehmeyer N & Vierling E. (2000). The Expression Of small Heat shock Proteins In Seeds Responds To Discrete Developmental Signals And Suggests A General Protective Role In Desiccation Tolerance. *Plant Physiol* 122: 1099-1108.
70. Vierling E, Mishkind ML, Schmidt GW & Key JL. (1986). Specific Heat Shock Proteins Are Transported Into Chloroplasts. *83 (2)*: 361-365.
71. Volkov RA., Panchuk II & Schöffl F. (2005). Small Heat Shock Proteins Are Differentially Regulated During Pollen Development And Following Heat Stress In Tobacco. *Plant Mol Biol.* 57: 487-502.
72. Yeh CH, Chen Yih YM & Lin CY. (2002). Functional Regions Of Rice Heat Shock Protein, Oshsp16.9, Required For Conferring Thermotolerance in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 128: 661-668.

73. Wang W, Vincour B, Shoseyov O, Altman A. (2004). Role Of Plant Heat-Shock Proteins And Molecular Chaperones In The Abiotic Stress Response. *Trends In Plant Science* 9: 244-252.
74. Wang K & Spector A. (2000). α -Crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat-shock proteins to renature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner. *Eur. J. Biochem.* 267, 4705:4712.
75. Waters ER., Lee GJ., Vierling E. (1996). Evolution, Structure And Function Of The Small Heat Shock Proteins In Plants. *J. Exp. Bot* 47: 325-338.
76. Wiederstein M & Sippl M. (2007). Prosa-Web: Interactive Web Service For The Recognition Of Errors In Three-Dimensional Structures Of Proteins. *Nuclei Acids Research.* 35: W407-W410.
77. Xi JH, Bai F, Gross J, Townsend RR, Menko AS, & Andley UP. (2008). Mechanism Of Small Heat Shock Protein Function In Vivo A Knock-In Mouse Model Demonstrates That The R49C Mutation In α A-Crystallin Enhances Protein Insolubility And Cell Death. *J Biol. Chem.* 283: 5801-5814.
78. Zantema AM, Verlaan-De VD, Maasdam SB & A. van der Eb. (1992). Heat Shock Protein 27 And α B-crystallin Can Form A Complex, Which Dissociates By Heat Shock. *J. Biol. Chem.* 267:12936–12941.

Abreviaciones.

ACD: Dominio alfa-cristalino.

Arg-HCl: Arginina ácida.

ATP: Adenosín-trifosfato.

ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario.

C₁₃E₁₀: Poli-oxietileno 10 tridecil-eter.

EDTA: Ácido etilen-di-amino-tetra acético.

EGTA: Ácido etilen-glicol tetra-acético

HCl: Ácido clorhídrico.

IPTG: isopropil β-D-tiogalactopiranosido.

KCl: Cloruro de potasio.

NaCl: Cloruro de sodio.

NaH₂PO₄: Fosfato de sodio monobásico.

(NH₄)₂SO₄: Sulfato de amonio.

Ni-NAT: Níquel más ácido nitrilotriacético

NH-terminal: Amino-terminal.

NP40 IGEPAL-630: Octilfenoxi-polietoxietanol.

OD: Densidad óptica.

ARNi. Ácido ribonucleico de interferencia.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

rpm: Revoluciones por minuto.

RRL: Lisado de retículos de conejo.

RUBISCO: ribulosa-1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa.

SDS: Dodecil-sulfato de sodio.

TBS: Buffer tris salino.

TTBS: Buffer tris salino, 0.1% Tween-20.

Figuras suplementarias.

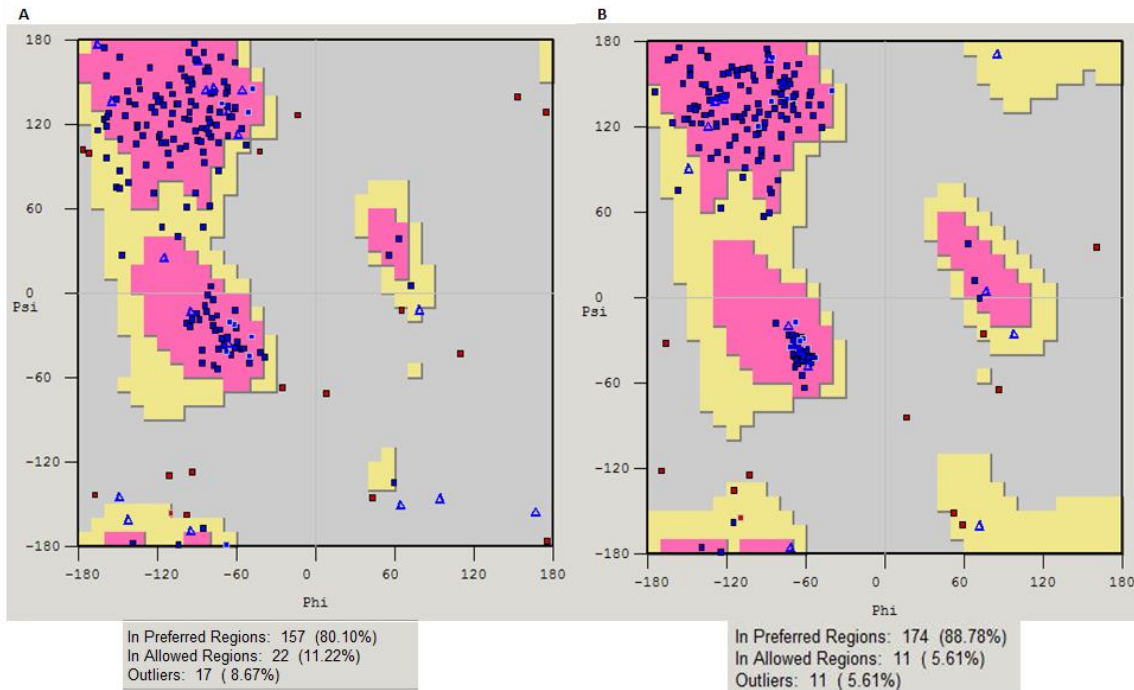


Figura suplementaria 1. Gráficas Ramachandran de la Nod22 y la AtAcd22.1. A. El *Ramachandran plot* generado para la Nod22 indica que ésta es una proteína formada tanto por α -hélices y principalmente por β -plegadas, en donde el 80.1 % (157 AA de 198 AA) se encuentran en la región preferentemente permitida (rosa), 22 residuos (11.22%) se encuentran en la región permitida (amarillo) y 17 residuos (8.67%) en la región no permitida (gris). B. El *Ramachandran plot* generado para la AtAcd22.1 indica que 88.78% (174 AA de 198 AA) se encuentran en la región preferentemente permitida (rosa), 11 residuos (5.61%) se encuentran en la región permitida (amarillo) y 11 residuos (5.61%) se encuentran en la región no permitida (gris).

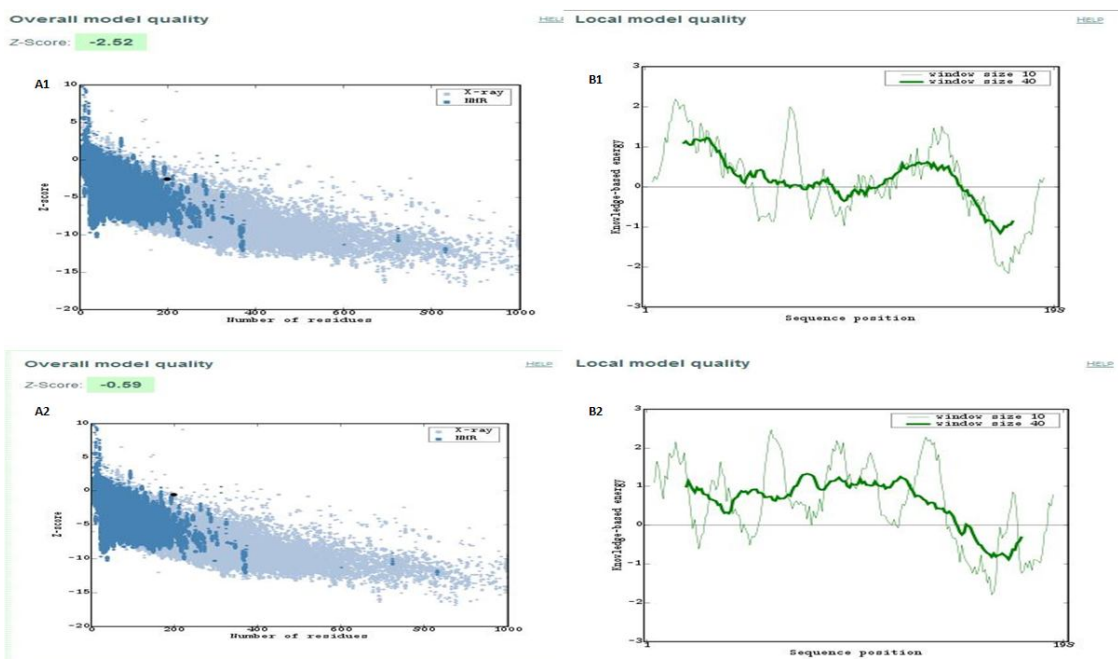


Figura suplementaria 2. Gráficas de validación de los modelos tridimensionales de la Nod22 y la AtAc22.1 por el programa Prosa-web. Los valores de la calidad global del modelo (*z-score*) de la Nod22 presenta un valor de -2.52 (A1), que es un valor característico de las estructuras nativas y la AtAc22.1 (-0.59, A2) que indica que presenta errores en la estructura. Por otro lado, las gráficas de energía representan que la Nod22 tiene errores en la ventana de análisis de 10 amino ácidos (línea delgada, B1), no así, en la ventana de análisis de 40 amino ácidos (línea gruesa, B1), mientras que la AtAc22.1 tiene errores en la mayoría del modelo en ambas ventanas de análisis de amino ácidos, aunque muestra una pequeña región en el C-terminal con valores aceptables B2.

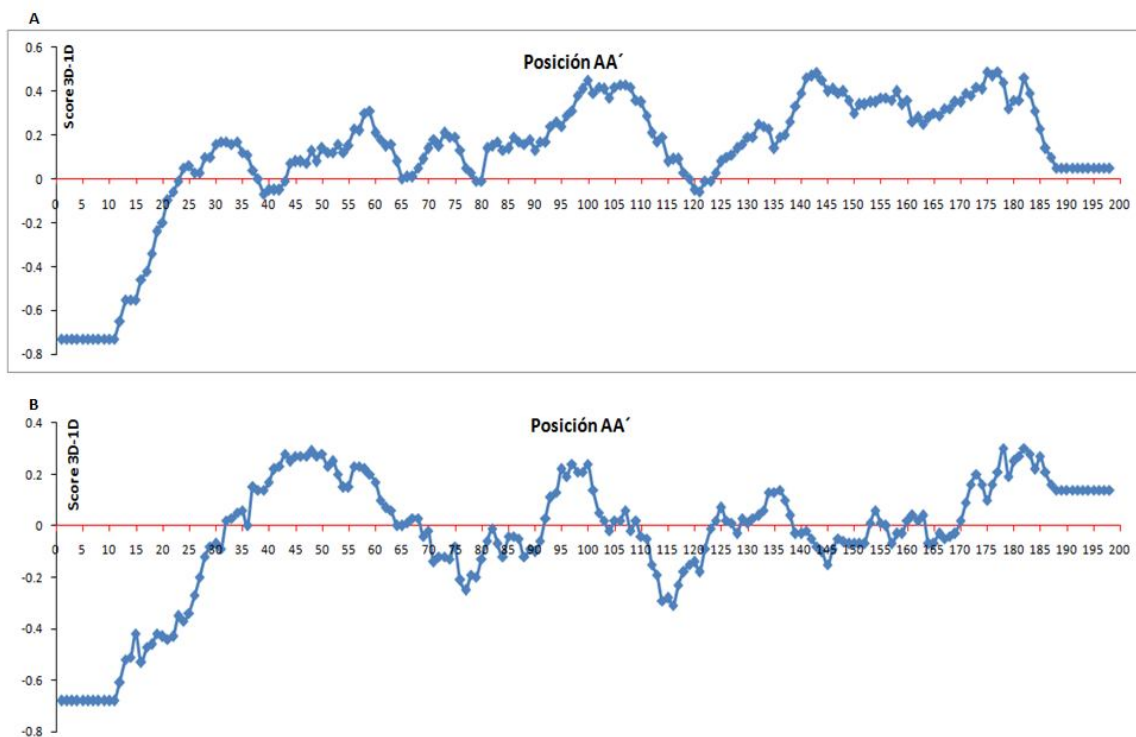


Figura suplementaria 3. Perfiles 3D-1D de los modelos de la Nod22 y la AtAcid22.1. El perfil 3D-1D representa el valor la secuencia de amino ácidos con respecto al modelo tridimensional, es decir, la secuencia con valores elevados evalúa la validez de los modelos sometidos. Los valores que presenta la Nod22 tienden a ser positivos a partir del amino ácido 23 hasta el 187 aproximadamente, es decir, el modelo 3D se adecua a la secuencia primaria (A) y los valores para la AtAcid22.1 presentan valores que fluctúan a lo largo de la proteína, es decir, ciertas regiones de la AtAcid22.1 presentan un estructura compatible con su secuencia de aminoácidos pero en la mayoría presenta valores negativos (B).

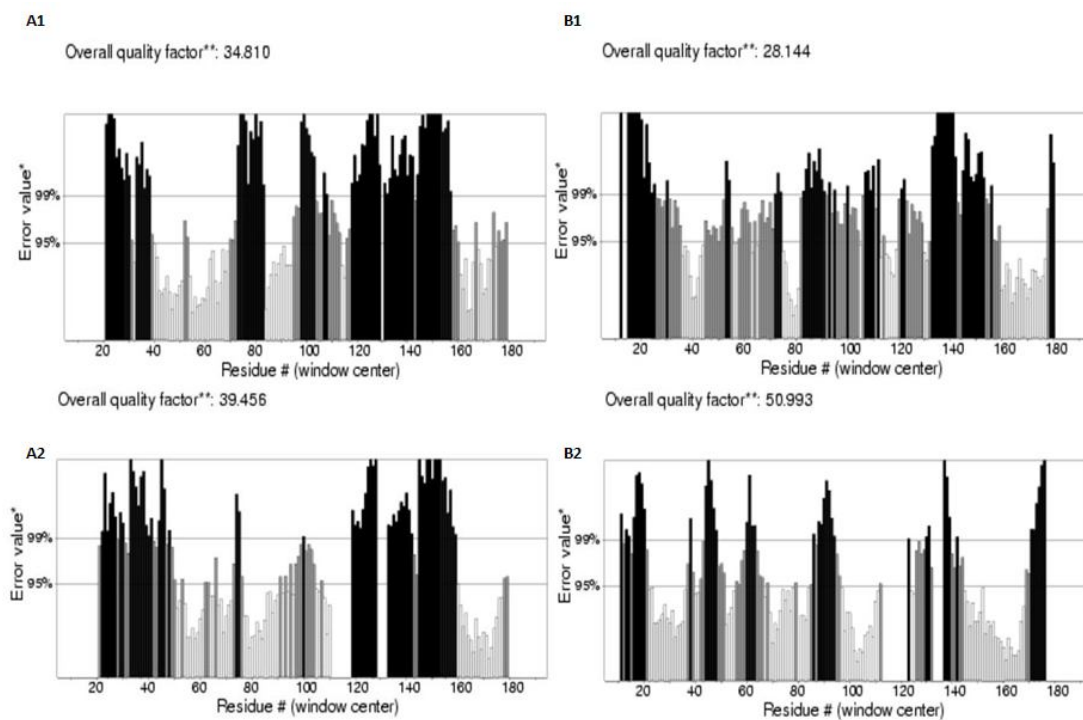


Figura suplementaria 4. Gráficas de validación por *Errat 2.0* de la Nod22 y la AtAc22.1. A. El análisis de la interacción de átomos por el algoritmo *Errat 2.0* de los modelos generados de la Nod22 y la AtAc22.1 presentan un factor de calidad de 39.456 (A2) y de 50.933 (B2), respectivamente. Tanto la Nod22 (A1: 34.810) y la AtAc22.1 (B1: 28.144) presentan regiones con interacciones incorrectas en el modelo generado previo a la validación y que indica que pueden ser regiones que no presentan una estructura correctamente plegada.

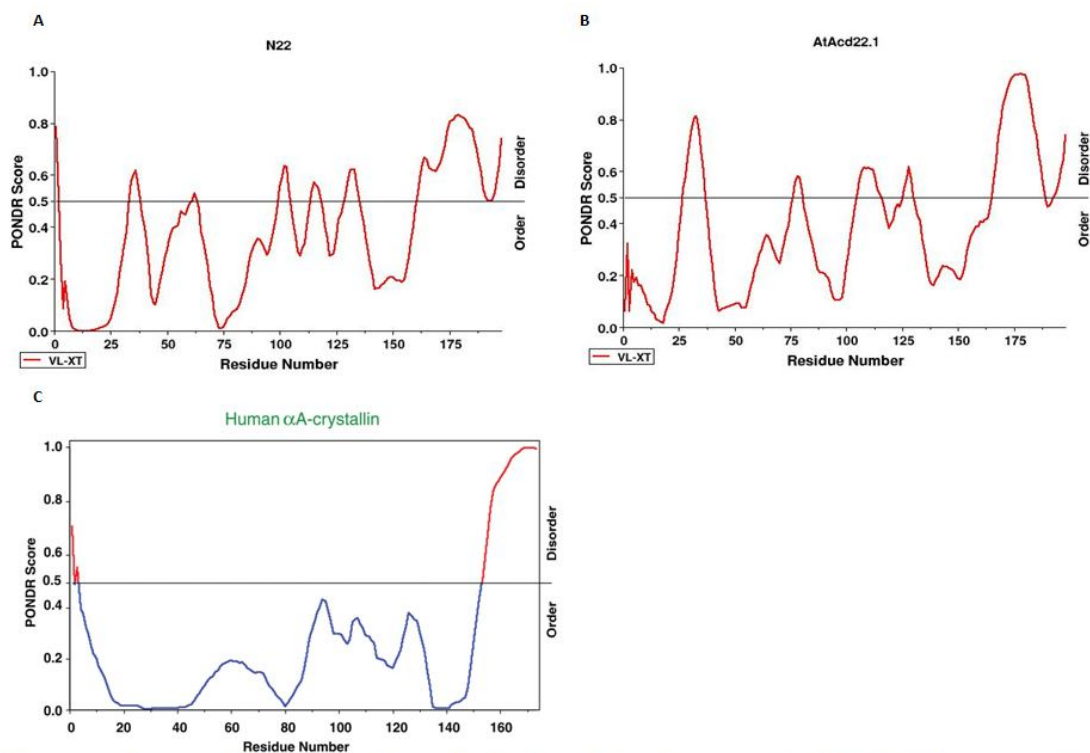


Figura suplementaria 5. Graficas de predicción de regiones desordenadas de la Nod22 y la AtAc22.1. A. El desorden intrínseco de la Nod22 (A), la AtAc22.1 (B) y la α A-cristalina de humano (C) se predijeron con el programa *PONDR*. La Nod22 y la AtAc22.a presentan un grado significativo de desorden en el extremo C-terminal, como la α A-cristalina previamente resuelta por espectroscopia de resonancia magnética nuclear .