



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA PvLEA6 DE FRIJOL
Phaseolus vulgaris L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

LUCERO YAZMIN RIVERA NAJERA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ENRIQUE MERINO PEREZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DR. JUAN MIRANDA RIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. MARZO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1: Análisis estructural de la proteína PvLEA6	5
INTRODUCCIÓN	5
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Purificación de la proteína PvLEA6 recombinante (rPvLEA6)	13
Cuantificación de la proteína rPvLEA6	13
Predicción de estructura de la proteína PvLEA6	14
DC de la proteína PvLEA6 obtenida de tejidos de planta	15
Análisis de la estructura en solución por Dicroísmo Circular	15
Medición de la fluorescencia de las tirosinas	17
Dicroísmo Circular en UV cercano	18
Termografía incrementando y disminuyendo la temperatura	19
Efecto del GdnHCl en la proteína rPvLEA6	20
Efecto del pH en la estructura secundaria de la proteína rPvLEA6	22
Análisis de formación de α-hélices con TFE	23
Efecto de la alta osmolaridad o el amontonamiento molecular en la estructura de la proteína rPvLEA6	24
Análisis de la proteína PvLEA6 recombinante por RMN de 1D y 2D	29
Análisis de la proteína rPvLEA6 marcada con ^{15}N por RMN	30
Entrecruzamiento de la proteína rPvLEA6	32
Separación por FPLC de la proteína rPvLEA6	33
Determinación del peso molecular de los oligómeros	34
Efecto de la urea en la estabilidad de los oligómeros	35
Hidrólisis ácida y análisis por espectrometría de masas de los aminoácidos y de los péptidos de la proteína rPvLEA6	36
Análisis de la fuerza iónica en la estabilidad de los oligómeros	37
Análisis de la estructura de la proteína rPvLEA6 en su forma oligomérica	38
Medición de la constante de disociación del dímero de la proteína rPvLEA6	39
DISCUSIÓN	40

CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Purificación de la proteína PvLEA6	44
Espectroscopia de Dicroísmo Circular	45
Fluorimetría	46
Ensayo de Western-blot.....	46
Hidrólisis ácida.....	48
Marcaje de proteína con ¹⁵N.....	49
Espectroscopia de NMR	49
Entrecruzamiento con Rutenio.....	50
Calorimetría de dilución isotérmica	50
Espectrometría de masas.....	51
Capítulo 2: Determinación de actividad de chaperona de RNA en la proteína PvLEA6	52
INTRODUCCIÓN	52
HIPÓTESIS	62
OBJETIVO GENERAL	62
OBJETIVOS PARTICULARES	62
RESULTADOS.....	62
Ensayo de retardo en gel nativo	62
Ensayo de entrecruzamiento con luz UV	65
Ensayo de procesamiento en <i>trans</i> (<i>trans-splicing</i>)	67
Ensayo de anti-terminación de la transcripción.....	71
Ensayo de complementación de la cepa cuádruple mutante en la familia de chaperonas de RNA Csp.	76
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIÓN.....	80
PERSPECTIVAS.....	80
MATERIALES Y MÉTODOS	80
Tratamiento del H₂O con DEPC (H₂O_{DEPC}).....	80
Preparación de gel acrilamida/tricina.....	80

Preparación del gel desnaturante de poliacrilamida/urea	81
Obtención del templado para transcripción	81
Purificación de RNA de gel.....	82
Transcripción <i>in vitro</i> de RNA con polimerasa T7.....	83
Transcripción <i>in vitro</i> de RNA a gran escala.....	83
Transcripción <i>in vitro</i> de RNA marcado con [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP	84
Cuantificación de marca incorporada	84
Ensayo de retardo en gel nativo	85
Ensayo de entrecruzamiento con luz UV (ultravioleta).....	87
Ensayo de trans splicing.....	88
Reacción para la síntesis de cDNA	88
PCR para analizar muestras de reacción de <i>trans-splicing</i>	88
Ensayo de trans-splicing usando RNA desnaturizado y renaturalizado	89
Ensayo de anti-terminación de la transcripción.....	90
Ensayo de anti-terminación de la transcripción (goteo en cajas con LB Cm e IPTG)	90
Preparación de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	90
Ensayo de choque de frío y recuperación en la cepa de <i>E. coli</i> BX04.....	91
REFERENCIAS	91
APENDICE	98

Capítulo 1: Análisis estructural de la proteína PvLEA6

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua es el principal elemento limitante del crecimiento de las plantas y, por tanto, de la productividad agrícola. Este factor ambiental fluctuante determina la producción de alimentos en una importante extensión del planeta para un elevado porcentaje de la población mundial (Boyer 1982).

Por otro lado, la presencia de agua es y ha sido una fuerza selectiva de primer orden que ha determinado la selección de plantas con diferentes grados de tolerancia a la sequía. Las plantas superiores producen varias respuestas adaptativas ante el déficit hídrico, entre las que se encuentran: el cerrado de estomas, la síntesis de osmolitos como los polioles (azúcares), los aminoácidos libres, la síntesis de sistemas de transporte para desintoxicación de iones, la síntesis de proteínas chaperonas y la síntesis de proteínas hidrofílicas (Yancey, Clark et al. 1982, Giraudat 1995, Garay-Arroyo, Colmenero-Flores et al. 2000).

Las proteínas llamadas hidrofílicas se caracterizan por tener un índice de hidrofílicidad mayor a 1 y un contenido en glicina mayor al 6%. Estas proteínas además de encontrarse en las plantas, se han encontrado en hongos, bacterias, y nemátodos. La evidencia experimental sugiere que estas proteínas están involucradas en la respuesta adaptativa de diferentes organismos a condiciones hiperosmóticas. Un análisis *in silico* realizado durante su caracterización sugirió que pertenecen al grupo de las proteínas intrínsecamente desordenadas (PID). Entre las hidrofílicas se encuentran algunas de las proteínas LEA, las cuales se han caracterizado principalmente en plantas (Garay-Arroyo, Colmenero-Flores et al. 2000).

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) se describieron por primera vez como proteínas que se acumulaban durante la etapa de embriogénesis tardía, cuando se inicia la desecación de la semilla (Baker, Van Densteele et al. 1988, Bray 1997). Ahora se sabe que algunas proteínas LEA también se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a déficit hídrico o a tratamientos con ácido abscísico (ABA), el cual es una fitohormona que señala la respuesta a déficit hídrico (Galau, Hughes et al. 1986, Dure 1993); o bien, en condiciones de irrigación óptima en los tejidos en crecimiento (Colmenero-Flores, Moreno et

al. 1999), aunque algunas también se han encontrado acumuladas de manera constitutiva (Bravo, Close et al. 1999).

De acuerdo a las características típicas de las hidrofílicas, la mayoría de las proteínas LEA son altamente hidrofílicas, con un alto contenido de aminoácidos cargados y de glicinas, y contienen pocos o carecen de triptófanos y cisteínas (Battaglia, Olvera-Carrillo et al. 2008). A las proteínas LEA con estas propiedades fisicoquímicas se le ha llamado proteínas LEA típicas, dado que también se ha descrito otro subgrupo de proteínas LEA que son más bien hidrofóbicas y que, en algunos casos, se ha demostrado que adoptan una estructura globular. Las proteínas LEA típicas se han agrupado en siete familias de acuerdo a su similitud en la secuencia de aminoácidos (Battaglia, Olvera-Carrillo et al. 2008). Aunque se predice que mayoritariamente son PIDs, los miembros de algunas familias contienen segmentos que se predice pueden adoptar una conformación de α -hélice (Dure 1993). Para algunas proteínas LEA se ha demostrado que ciertas regiones de éstas adoptan estructura secundaria bajo condiciones de deshidratación (Shih, Hoekstra et al. 2008).

Del análisis estructural de algunas de estas proteínas se encontró que una proteína LEA de la familia 2 y otra de la familia 1 de soya adoptan parcialmente una conformación desplegada conocida como hélice poli L-prolina tipo II en solución acuosa (Soulages, Kim et al. 2002, Soulages, Kim et al. 2003). Estudios menos detallados han mostrado que una proteína LEA del grupo 4 y otras del grupo 2 presentan un alto porcentaje de desorden en solución acuosa (Lisse, Bartels et al. 1996, Shih, Lin et al. 2004).

Por otro lado, experimentos dirigidos a determinar la función de las proteínas LEA realizados bajo condiciones *in vitro* han demostrado que una proteína LEA de la familia 3 de *Typha latifolia* puede estabilizar cristales de sacarosa (Wolkers, McCready et al. 2001), y que otras de las familias 2, 3 y 4 tienen una actividad protectora ante situaciones de deshidratación parcial, al prevenir la inactivación de enzimas causada por la limitación de agua. En ningún caso se ha observado actividad de renaturalización de proteínas (Reyes J.L. Rodrigo 2005). Adicionalmente, se ha reportado que una proteína tipo LEA (de nemátodos), similar a las proteínas LEA del grupo 3, evita la agregación de proteínas inducida por desecación extrema (Goyal, Walton et al. 2005) y que no necesita de ATP para esta función. Además se ha reportado que las proteínas LEA de la familia 2, ERD10 y ERD14, disminuyen la agregación e inactivación de enzimas causada por temperatura (Kovacs, Kalmar et al. 2008). Una proteína LEA mitocondrial de la familia 3, protege liposomas sujetos a sequía (Tolleter, Jaquinod et al. 2007).

De experimentos *in vivo*, se encontró que la sobre-expresión de algunas proteínas LEA en bacterias, levaduras y plantas confieren tolerancia a salinidad, sequía y/o congelamiento (Imai, Chang et al. 1996, Xu, Duan et al. 1996, Swire-Clark and Marcotte 1999, Zhang, Ohta et al. 2000). Además, el silenciamiento de genes *LEA* pertenecientes a miembros de las familias 2 en musgos (Saavedra, Svensson et al. 2006) y 4, en *Arabidopsis* (Olvera-Carrillo, Campos et al. 2010) tiene como consecuencia una disminución en la tolerancia a los mismos tipos de estrés.

Varias funciones se han propuesto para algunas familias de las proteínas LEA, entre las que se encuentran: proporcionar un micro-ambiente hidrofílico ante condiciones limitantes de agua, y proteger las membranas y/o proteínas o el secuestro de iones, aunque la evidencia para todos estos casos aún es limitada (Dure 1993, Close 1997, Danyluk, Perron et al. 1998, Goyal, Tisi et al. 2003).

Por ahora sólo se tienen ensayos *in vitro* donde se detecta una actividad protectora de las proteínas LEA, pero aún no se ha corroborado que esto suceda en la célula. Se conoce la función de pocas proteínas altamente desordenadas y hay un número un poco mayor de casos donde se conoce la función de proteínas que tienen regiones desordenadas (Ferreon, Ferreon et al. 2013, Frye, Brown et al. 2013, Wentzel, Sommer et al. 2013).

Las PIDs existen en todos los reinos de la vida y son más abundantes en los proteomas eucarióticos (Xue, Dunker et al. 2012). Estudios bioinformáticos han predicho que 23-28% de las proteínas eucarióticas son mayoritariamente desordenadas (Oldfield, Cheng et al. 2005) y 70% de las proteínas de señalización contienen regiones desordenadas (Iakoucheva, Brown et al. 2002).

Para algunas de las PIDs se ha demostrado que al poder adoptar diferentes conformaciones pueden unir varios blancos y pueden producir acciones opuestas en blancos diferentes o aún en el mismo blanco. A diferencia de las proteínas plegadas, las PIDs usan la misma región o superficies superpuestas, para ejercer un efecto en diferentes blancos (Tompa, Szasz et al. 2005).

Un ejemplo de una proteína con regiones desordenadas que realiza varias funciones es la proteína p53, que es un factor transcripcional, que está involucrado en una red de señalización que activa la expresión de genes en respuesta a la progresión en el ciclo celular, apoptosis, reparación del DNA y estrés celular. Esta proteína regula más de 150 genes y se une a más de 100 proteínas (Oldfield, Meng et al. 2008).

Las plantas, además de las proteínas LEA, expresan otros tipos de proteínas con regiones desordenadas, entre las que se encuentran factores transcripcionales y proteínas involucradas en la transducción de señales como las proteínas GRAS y CRY (Cryptochromes) (Sun, Rikkerink et al. 2013). Los factores transcripcionales contienen un dominio de unión a DNA y un dominio de regulación, el cual carece de estructura bien definida. Algunas de las proteínas GRAS contienen un dominio en el extremo N-terminal que es desordenado y éste se estructura al unirse a sus proteínas blanco. Las proteínas CRY contienen un dominio desordenado en su extremo C-terminal, con el que se pueden unir a diferentes proteínas blanco, lo cual activa una cascada de regulación de diferentes procesos como el reloj circadiano y la respuesta a la luz (Sun, Rikkerink et al. 2013).

Se ha propuesto un modelo en el que las PIDs se mantienen desplegadas en la célula en condiciones óptimas de disponibilidad de agua, pero cuando hay limitación de agua algunas regiones se estructuran y con estas regiones se unen a sus moléculas blanco (Olvera-Carrillo, Luis Reyes et al. 2011). Se ha propuesto otro modelo en el que las proteínas LEA no interactúan directamente con sus moléculas blanco; en este modelo se sugiere que las proteínas LEA forman un escudo molecular alrededor de su molécula blanco y este evita la interacción entre proteínas que se agregan (Chakrabortee, Tripathi et al. 2012).

La concentración de macromoléculas en una célula modelo (*E. coli*) en condiciones ideales de crecimiento es aproximadamente de 300-400 g/L, pero puede llegar a >900 g/L después de una desecación severa (Zimmerman and Trach 1991, Mouillon, Eriksson et al. 2008). Al alto contenido de solutos en la célula se le conoce como amontonamiento molecular, el cual tiene como característica principal la repulsión estérica entre los solutos, aunque también pueden existir interacciones no específicas entre los solutos (Minton 2001). La teoría predice que el amontonamiento molecular promueve la formación de oligómeros e induce el plegamiento de proteínas (Minton 2000, Minton 2005). Dado que el amontonamiento molecular se incrementa en condiciones de deshidratación, la estructura de algunas proteínas LEA se ha analizado en esta condición.

Metodologías utilizadas para analizar proteínas intrínsecamente desordenadas

Se han utilizado diferentes metodologías para analizar la conformación de las proteínas intrínsecamente desordenadas tanto en solución como en estado sólido. A continuación se describen las más utilizadas.

Dicroísmo circular: esta técnica se basa en que las moléculas quirales absorben de manera diferencial la luz circularmente polarizada a la derecha de la luz circularmente polarizada a la izquierda. Con esta técnica se puede detectar el contenido de estructura secundaria y de desorden, pero no proporciona información sobre cuáles son las regiones en la secuencia polipeptídica que están estructuradas o desordenadas.

FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy): es una técnica que es usada para obtener un espectro de absorción en infrarrojo de un sólido, líquido o gas. En el caso de las proteínas, el enlace peptídico es el que absorbe luz infrarroja y esta absorción depende de la estructura secundaria en la que se encuentre el enlace peptídico. Dado que esta técnica se puede realizar en estado sólido, esta metodología se ha utilizado para analizar la estructura de las proteínas LEAs en condiciones secas (97% de pérdida de agua). Esta técnica al igual que el DC solo provee información del contenido de estructura secundaria en una proteína.

RMN (Resonancia Magnética Nuclear): esta técnica se basa en que la frecuencia de resonancia del spin del núcleo del átomo depende del ambiente químico en el que se encuentre, es decir, de los átomos con los que esté formando enlaces o interactuando. Con esta técnica además de conocerse el contenido de estructura secundaria, también se puede conocer en qué regiones se encuentra dicha estructura, es decir se puede conocer la estructura terciaria de la proteína.

SAXS (Small angle X -ray scattering): esta técnica se basa en la dispersión de la luz (rayos X), lo cual depende de la forma y tamaño de las macromoléculas. Esta técnica se realiza en solución a diferencia de la cristalografía de rayos X, por lo cual permite el análisis de proteínas desordenadas.

ANTECEDENTES

La proteína PvLEA6 (anteriormente llamada PvLEA-18) es una proteína de *Phaseolus vulgaris* que pertenece a la familia 6 de las proteínas LEA, la cual está altamente conservada (Battaglia, Olvera-Carrillo et al. 2008). Genes homólogos a la proteína PvLEA6 se encuentran en plantas angiospermas y gimnospermas (Battaglia, Olvera-Carrillo et al. 2008). La Figura 1 muestra un alineamiento de algunas secuencias de proteínas LEA6 de plantas angiospermas, en donde se pueden observar los motivos altamente conservados.

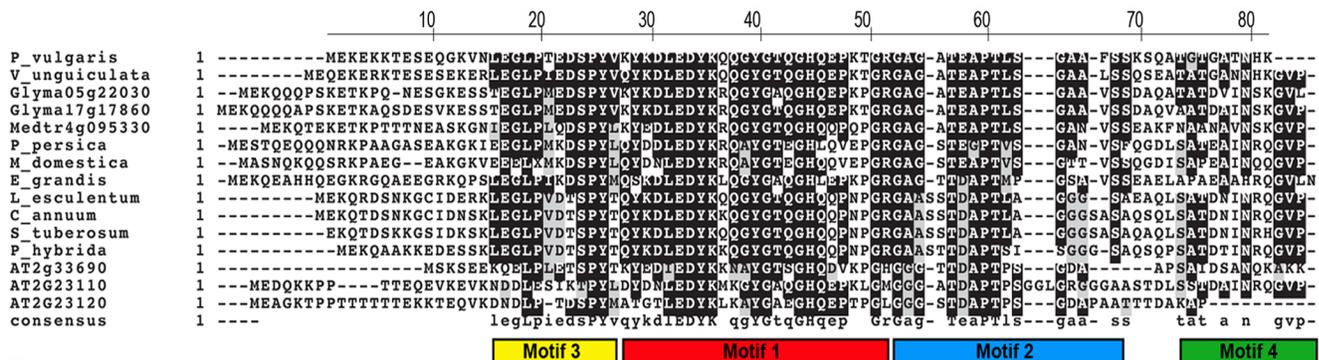


Figura 1. Alineamiento de algunas secuencias de proteínas LEA6 de plantas angiospermas. Las cajas muestran los motivos altamente conservados.

La proteína PvLEA6 contiene 82 residuos de aminoácidos, un peso molecular deducido de secuencia de 8.76 kDa y un punto isoeléctrico determinado experimentalmente de 6.7. La proteína PvLEA6 contiene 12 residuos de aminoácidos cargados negativamente (Asp + Glu) y 11 residuos de aminoácidos cargados positivamente (Arg + Lys). La Figura 2 muestra la secuencia y composición de aminoácidos de la proteína PvLEA6.

a)

```

      10           20           30           40           50           60
MEKEKKTESE  QGKVNLEGLP  TEDSPYVKYK  DLEDYKQOGY  GTQGHQEPKT  GRGAGATEAP

      70           80
TLSGAAFSSK  SQATGTGATN  HK

```

b) **Amino acid composition:**

Ala (A)	7	8.5%
Arg (R)	1	1.2%
Asn (N)	2	2.4%
Asp (D)	3	3.7%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	7.3%
Glu (E)	9	11.0%
Gly (G)	11	13.4%
His (H)	2	2.4%
Ile (I)	0	0.0%
Leu (L)	4	4.9%
Lys (K)	10	12.2%
Met (M)	1	1.2%
Phe (F)	1	1.2%
Pro (P)	4	4.9%
Ser (S)	6	7.3%
Thr (T)	9	11.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	4	4.9%
Val (V)	2	2.4%

Figura 2. a) Secuencia de aminoácidos. B) Composición de aminoácidos de la proteína PvLEA6.

La proteína PvLEA6 se acumula durante la embriogénesis tardía, en la fase de la deshidratación de la semilla; también se acumula en tejidos vegetativos de plantas sometidas a déficit hídrico y en regiones de crecimiento de plantas crecidas bajo condiciones de irrigación óptima. Por otro lado, se ha demostrado que es una proteína que se localiza en núcleo y citoplasma de diferentes tipos celulares en hojas, tallo y raíz (Colmenero-Flores, Moreno et al. 1999). Adicionalmente, al analizarse la proteína PvLEA6 por experimentos tipo Western, utilizando un anticuerpo específico, se detectaron bandas adicionales que migran con masas moleculares aparentes mayores al monómero que podrían corresponder a homooligómeros.

Ensayos *in vitro* que han permitido detectar una actividad protectora en diferentes hidrofílicas de plantas y de otros organismos sobre algunas actividades enzimáticas ante una deshidratación progresiva mostraron que la proteína PvLEA6 es incapaz de ejercer un efecto protector (Reyes, Rodrigo et al. 2005).

En esta tesis se decidió estudiar con mayor profundidad las características estructurales de la proteína PvLEA6 con la idea de determinar si realmente era una proteína estructuralmente desordenada en solución, lo cual nos permitiría establecer estrategias para el análisis funcional no sólo de esta proteína, sino de las proteínas de toda la familia, dado su alto grado de conservación. Puesto que esta proteína LEA fue la primera caracterizada de la familia 6 en todas las plantas, se consideró que podría resultar un buen modelo para el estudio de las PIDs en plantas, de tal forma que al conocer con mayor detalle sus propiedades estructurales obtendríamos herramientas para sugerir un mecanismo de acción de esta proteína.

En este trabajo no sólo se abordó el análisis de la estructura de la proteína PvLEA6 en solución acuosa, sino que también se planteó la pregunta de que, en caso de resultar desordenada en solución, si esta característica pudiera modificarse ante cambios en su ambiente. Este cuestionamiento surgió ante el conocimiento de que ante situaciones de déficit hídrico cambia la disponibilidad de agua para las diferentes moléculas en la célula, lo cual podría derivar en diferentes grados de cambio en su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria debido a los cambios en la organización de las moléculas de agua, lo que podría favorecer interacciones intra- y/o inter-moleculares diferentes. Más aún, la reducción en el agua disponible genera en consecuencia un aumento en el amontonamiento molecular intracelular que, como se menciona arriba en este texto, podría promover no solamente

cambios estructurales diversos sino también interacciones entre la misma proteína o con sus ligandos. Por tanto, la hipótesis de esta tesis fue

HIPOTESIS

La proteína PvLEA6 es desordenada en solución, se estructura parcialmente en condiciones de alta osmolaridad y/o por amontonamiento molecular y forma oligómeros.

OBJETIVOS

1. Con la finalidad de conocer el comportamiento estructural de la proteína PvLEA6 se abordaron los siguientes objetivos:
 - 1.1. Determinación de la conformación en solución acuosa.
 - 1.2. Determinación de la capacidad de la proteína para adoptar estructura secundaria.
 - 1.3. Análisis del efecto del amontonamiento molecular y/o baja disponibilidad de agua sobre la estructura de la proteína.
 - 1.4. En caso de detectar formación de estructura secundaria por DC se propuso utilizar RMN 2D (Resonancia Magnética Nuclear en 2D) para conocer las regiones de la proteína capaces de estructurarse.

2. Con la finalidad de estudiar la capacidad para formar oligómeros de la proteína PvLEA6 se realizaron los siguientes objetivos:
 - 2.1. Determinación de la capacidad de la proteína PvLEA6 para formar oligómeros.
 - 2.2. Análisis de las fuerzas que estabilizan a los oligómeros.
 - 2.3. Análisis de la estructura de la proteína en su forma oligomérica.
 - 2.4. Determinación de la constante de asociación en los oligómeros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la proteína PvLEA6 recombinante (rPvLEA6)

Con la finalidad de caracterizar la conformación de la proteína PvLEA6, ésta se expresó en *E. coli* a partir del plásmido pTYB11:PvLEA6, y se purificó a homogeneidad (Figura 3 y sección de Materiales y métodos). La masa molecular y la secuencia de la proteína PvLEA6 recombinante (rPvLEA6) se verificó por espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica del IBt, dando una masa molecular de 8.76 kDa, que concuerda con la masa deducida de la secuencia previamente reportada (Moreno-Fonseca and Covarrubias 2001). La proteína rPvLEA6 pura migra en geles de SDS-PAGE con una masa molecular aparente de 14 kDa; esta migración aberrante se ha observado para proteínas desordenadas y se sugiere que se debe a que estas proteínas unen menos SDS que las proteínas globulares (Receveur-Brechot, Bourhis et al. 2006).

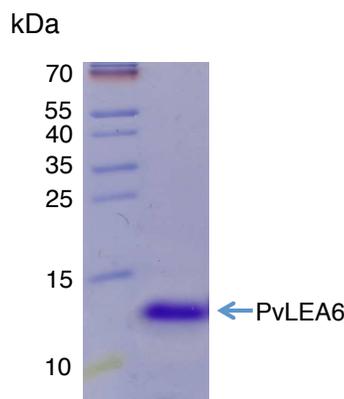


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de la proteína PvLEA6 recombinante purificada a homogeneidad. Gel teñido con Coomassie.

Cuantificación de la proteína rPvLEA6

Para analizar la estructura de la proteína por Dicroísmo circular, es necesario conocer la concentración de la proteína, por lo que se determinó la concentración de la proteína.

En la literatura se ha reportado que los métodos colorimétricos para cuantificación de proteínas sub-estiman la concentración de las PIDs, debido a que los métodos colorimétricos interactúan más con aminoácidos hidrofóbicos, los cuales son poco abundantes en las PIDs. La proteína rPvLEA6 se cuantificó con varios métodos para determinar si alguno determinaba de forma más exacta la concentración de la proteína. Para determinar la concentración por $Ab_{S_{280nm}}$, el coeficiente de extinción se determinó experimentalmente (ver

sección de Materiales y métodos), con lo que se obtuvo un coeficiente de extinción al 0.1% de 0.592, por lo que esta concentración podría ser la más acercada a la real.

Los protocolos de los métodos colorimétricos se encuentran en la sección de Materiales y métodos. Para la cuantificación por Abs₂₀₅, se utilizó un coeficiente de extinción al 0.1% (e_{0.1%}) de 30, de acuerdo a Scopes R. K. (Scopes 1974). Como se observa en la Tabla 1, todos los métodos probados sub-estiman la concentración de la proteína PvLEA6, y el método más cercano a la concentración determinada por Abs_{280nm} es el de Lowry.

	Métodos				
	Bradford	Lowry	Ponceau (-)	Abs280(e _{0.1%} =0.592)	Abs205 (e _{0.1%} =30)
% que mide	4.6	50	10	100	16
aa que detecta	arginina, lisina, histidina, y aromáticos	tirosina triptófano cisteína	interacciones electrostáticas e hidrofóbicas	aromáticos	enlace peptídico histidina y aromáticos

Tabla 1. Cuantificación de la proteína PvLEA6 con diferentes métodos. aa, aminoácidos.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA

Predicción de estructura de la proteína PvLEA6

La predicción de la estructura secundaria de la proteína PvLEA6 se realizó con diferentes programas de predicción de estructura. Como se muestra en la Figura 4, todos los programas predicen formación de estructura en la secuencia de los aminoácidos ≈16-44, lo cual corresponde a 35% de formación de estructura. Esta región que se predice puede formar estructura secundaria, contiene a la zona más conservada de la proteína y a las únicas 4 tirosinas que contiene, las cuales están altamente conservadas.

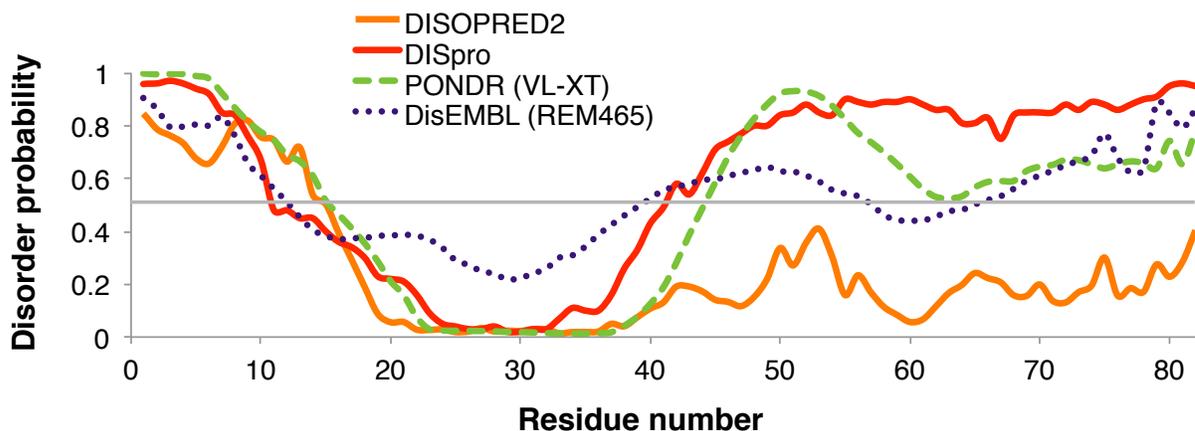


Figura 4. Predicción de estructura secundaria de la proteína PvLEA6.

DC de la proteína PvLEA6 obtenida de tejidos de planta

Se realizó el DC (Figura 5) de la proteína nativa (obtenida de embriones de frijol *Phaseolus vulgaris*) en solución para saber si ésta presentaba la misma estructura que la proteína recombinante (la cual no contiene modificaciones post-traduccionales) y, con ello validar el uso de la proteína recombinante para el análisis de la estructura secundaria. Las dos proteínas presentan un espectro muy similar, es decir los dos espectros presentan un mínimo alrededor de 200 nm y una banda alrededor de 220 nm. Esto valida el uso de la proteína recombinante para el estudio de la estructura secundaria de la proteína PvLEA6.

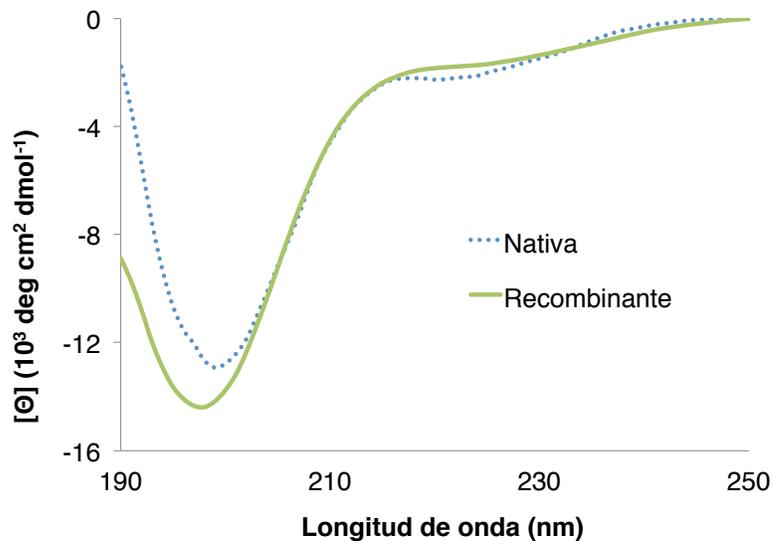


Figura 5. Espectros de DC de la proteína PvLEA6 recombinante o nativa (obtenida de embriones de frijol).

Análisis de la estructura en solución por Dicroísmo Circular

Para probar si la proteína PvLEA6 era desordenada como se había predicho, la proteína rPvLEA6 se analizó en solución (amortiguador K-fosfatos 10 mM pH 8) por espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC) en ultravioleta lejano, en colaboración con la Dra. Gloria Saab. Como se observa en la Figura 6, el espectro de la proteína rPvLEA6 en solución muestra un mínimo a 198 nm, que corresponde al perfil característico de proteínas desordenadas (Soulages, Kim et al. 2003). Sin embargo también existe información experimental que sugiere que espectros similares se pueden obtener de proteínas que contienen un poco de orden local, como hélices poli-prolina tipo II (PPII) o conformaciones

tipo beta (Tiffany and Krimm 1969, Rucker and Creamer 2002, Shi, Olson et al. 2002, Chen, Liu et al. 2004, Shi, Chen et al. 2005, Kjaergaard, Norholm et al. 2010).

Para conocer qué cambios producía el incremento de la temperatura en la conformación de la proteína PvLEA6, se realizó el DC a diferentes temperaturas (10-80 °C). Los espectros de DC a las diferentes temperaturas (Fig. 6) muestran un mínimo alrededor de los 198 nm el cual va disminuyendo conforme se incrementa la temperatura, y una banda dicroica negativa entre 210 y 230 nm que se hace más negativa conforme se aumenta la temperatura. También se observa un punto en 208 nm por el que pasan todas las curvas (llamado punto isodicroico), el cual indica que esta proteína en solución acuosa está en equilibrio entre dos estados conformacionales.

Los cambios de la estructura dependientes de la temperatura se han analizado para péptidos y PIDs (Shi, Olson et al. 2002, Kjaergaard, Norholm et al. 2010). Para varios péptidos, el cambio de la conformación dependiente de la temperatura se analizó por DC y RMN, de donde se concluyó que a bajas temperaturas se forman mayoritariamente hélices PPII, en tanto que a altas temperaturas el contenido de conformación β se incrementa (Shi, Chen et al. 2005). Estos datos llevaron a proponer que la conformación desplegada de las PIDs consisten principalmente de hélices extendidas PPII y de conformaciones β intercaladas con una variedad de otras conformaciones, las cuales fluctúan entre sí (Shi, Olson et al. 2002, Shi, Chen et al. 2005).

Los espectros que se obtuvieron para la proteína PvLEA6, se han obtenido para otras proteínas LEA de soya del grupo 1 y 2, donde también se detectó la conformación de hélice extendida a bajas temperaturas (Soulages, Kim et al. 2002, Soulages, Kim et al. 2003).

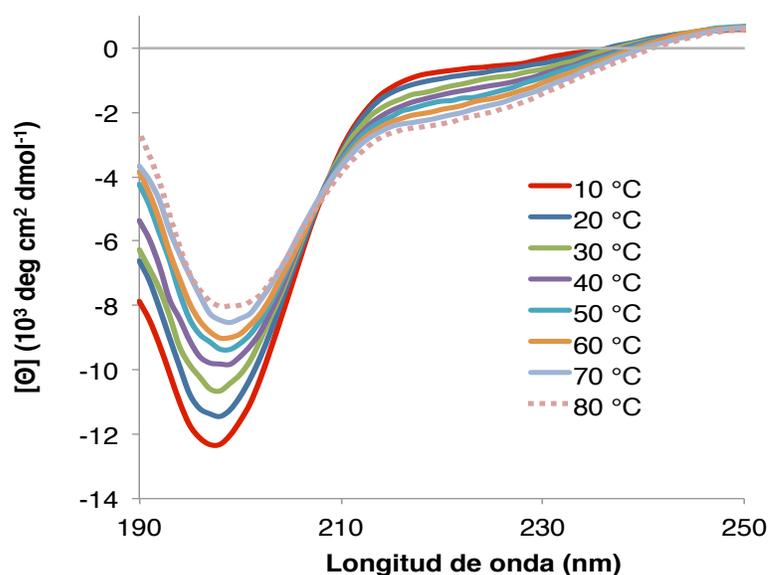


Figura 6. Espectros de DC en ultravioleta lejano de la proteína rPvLEA6 a diferentes temperaturas.

Medición de la fluorescencia de las tirosinas

Se midió la fluorescencia de las tirosinas, para tratar de determinar cuáles eran los cambios que le sucedían a la conformación de la proteína rPvLEA6 con el incremento de la temperatura, en donde se esperaba que si las tirosinas se encontraban en una región que formara α -hélice, al incrementar la temperatura esta estructura se desestabilizaría con lo que la fluorescencia de las tirosinas aumentaría. En la Figura 7 se muestran los espectros de fluorescencia a diferentes temperaturas. La fluorescencia disminuye conforme se incrementa la temperatura, debido al aumento del movimiento molecular con el incremento de la temperatura, lo cual resulta en más colisiones moleculares y subsecuente pérdida de energía, fenómeno que ha sido documentado en la literatura (Gally and Edelman 1962, Liyanage, Bakshi et al. 2014). El máximo de fluorescencia no se desplaza a longitudes de onda más larga o más corta con el incremento de temperatura, lo que sugiere que el ambiente hidrofílico de las tirosinas no cambió, es decir, tanto en la conformación favorecida a baja temperatura como en la conformación favorecida a alta temperatura, las tirosinas se encuentran igualmente expuestas al solvente, lo cual apoya el resultado del DC a diferentes temperaturas, que sugiere que las dos conformaciones que presenta la proteína PvLEA6 contienen hélices PPII ó estructuras tipo beta, las cuales son conformaciones muy abiertas, es decir las cadenas laterales se encuentran muy expuestas al solvente.

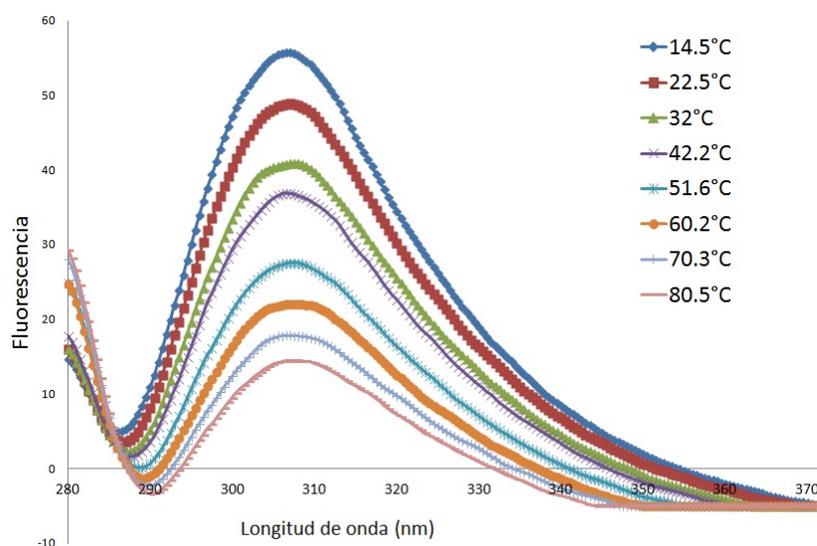


Figura 7. Espectros de fluorescencia de la proteína rPvLEA6 a diferentes temperaturas.

Dicroísmo Circular en UV cercano

Para profundizar más sobre las modificaciones sufridas con el cambio de la temperatura en la conformación de la proteína PvLEA6, se realizó un análisis por DC en UV cercano, en el que la señal sólo provendría de los aminoácidos aromáticos (Johnson, Xue et al. 2012), tirosina y fenilalanina en el caso de esta proteína.

Como se observa en la Figura 8, hay tres puntos isodicroicos los cuales indican cambios en la estructura de la proteína. También se observa una banda alrededor de los 280 nm la cual proviene de una ó más tirosinas, y adicionalmente se observa una banda alrededor de los 294 nm, la cual podría provenir de la forma fenolato de la tirosina (Georgakopoulou, Moller et al. 2009). La intensidad de dicha banda disminuye conforme se incrementa la temperatura, posiblemente debido a que el cromóforo está cambiando a un ambiente menos restringido; es decir, a una conformación en la que tiene más movilidad, ya que la región en la que está ese cromóforo estaría perdiendo estructura con el incremento de la temperatura. Alternativamente, la porción de fenolato disminuyó debido a que la alta temperatura promueve una reducción en las interacciones electrostáticas, las cuales son las responsables de mantener a la tirosina en forma de fenolato. La región implicada en estos cambios podría ser la secuencia de los residuos 25-32 (PYVKYKDL), una región en la que se predice la formación de estructura secundaria, ya que contiene aminoácidos que podrían estar formando alguna estructura local (como un tipo de núcleo hidrofóbico); así como, la tirosina 29 que al encontrarse entre dos lisinas, éstas podrían favorecer un cambio en su pKa y con ello promover la formación del fenolato.

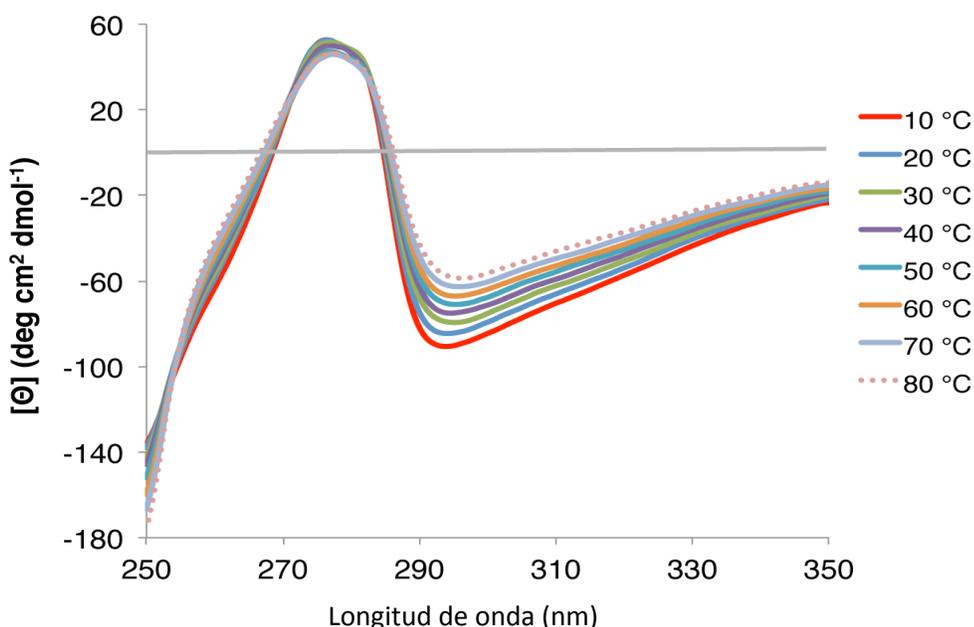


Figura 8. Espectros de DC en UV cercano a diferentes temperaturas de la proteína rPvLEA6.

Termografía incrementando y disminuyendo la temperatura

Se realizó otra termografía con DC para analizar si los cambios inducidos en la proteína rPvLEA6 por la temperatura son reversibles. La temperatura se incrementó cada 10°C, empezando de 10 hasta llegar a 80 °C, y al llegar a 80 °C, se disminuyó la temperatura hasta 10 °C, variando la temperatura cada 10°C; la Figura 9 muestra el resultado. Como se observa, la señal de DC a 220 nm tanto en el incremento como en la disminución de la temperatura dan la misma señal de DC, lo que indica que la conformación de la proteína rPvLEA6 después de subir y bajar la temperatura es la misma; es decir, los cambios inducidos por la temperatura son reversibles. La señal de DC a 197 nm es más ruidosa, por lo que los puntos no caen exactamente igual en el incremento y disminución de la temperatura.

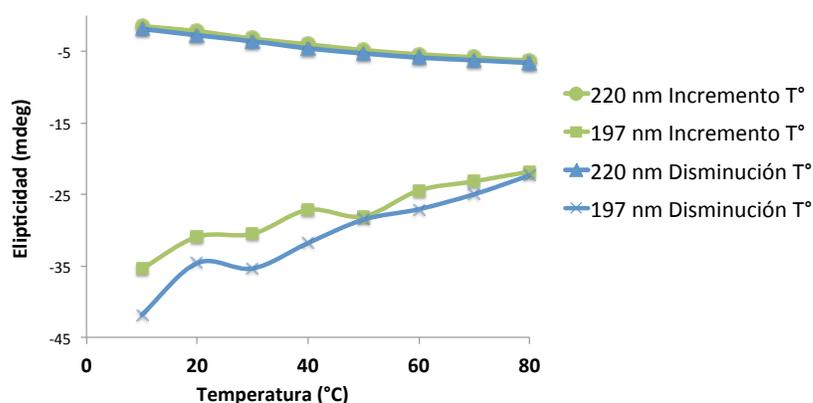


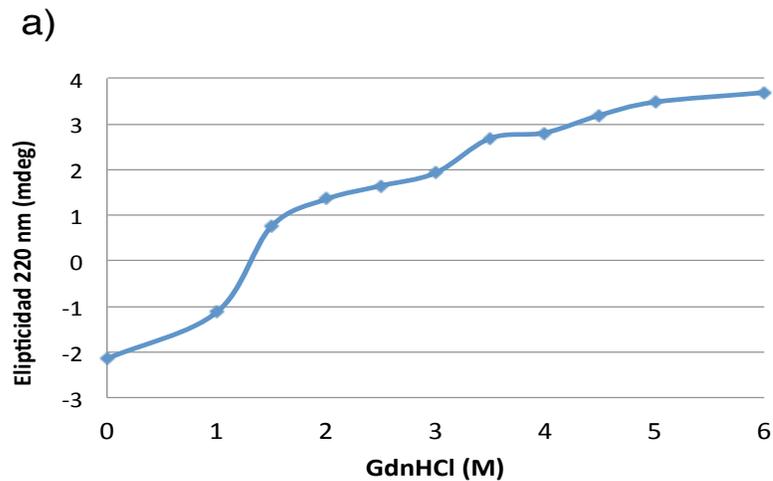
Figura 9. Gráfica de la señal de DC a 197 y 220 nm a diferentes temperaturas.

Siendo la proteína PvLEA6 desordenada, interesa saber qué tipos de estructura local puede adquirir, ya que ésta se ha relacionado con sitios de unión a otras proteínas (Mohan, Oldfield et al. 2006, Sugase, Dyson et al. 2007). Por lo tanto, se perturba a la PvLEA6 con diversos agentes: GdnHCl, SDS, pH, TFE, para explorar las posibles conformaciones accesibles a la proteína. En las siguientes secciones se muestran los resultados.

Efecto del GdnHCl en la proteína rPvLEA6

Con el propósito de analizar la estructura de la proteína rPvLEA6, se realizó DC en presencia de cloruro de guanidinio (GdnHCl), el cual comúnmente se usa para desnaturalizar proteínas globulares. Cabe hacer notar que se ha determinado que el GdnHCl induce un estado desnaturalizado que contiene hélices PPII (Tiffany and Krimm 1973, Park, Shalongo et al. 1997).

Los espectros de DC y la señal de DC a 220 nm de la proteína rPvLEA6 en presencia de diferentes concentraciones de GdnHCl se muestran en la Fig. 10. El aumento en la señal de DC a 220 nm indica que el GdnHCl también induce la formación de hélices PPII en la proteína rPvLEA6.



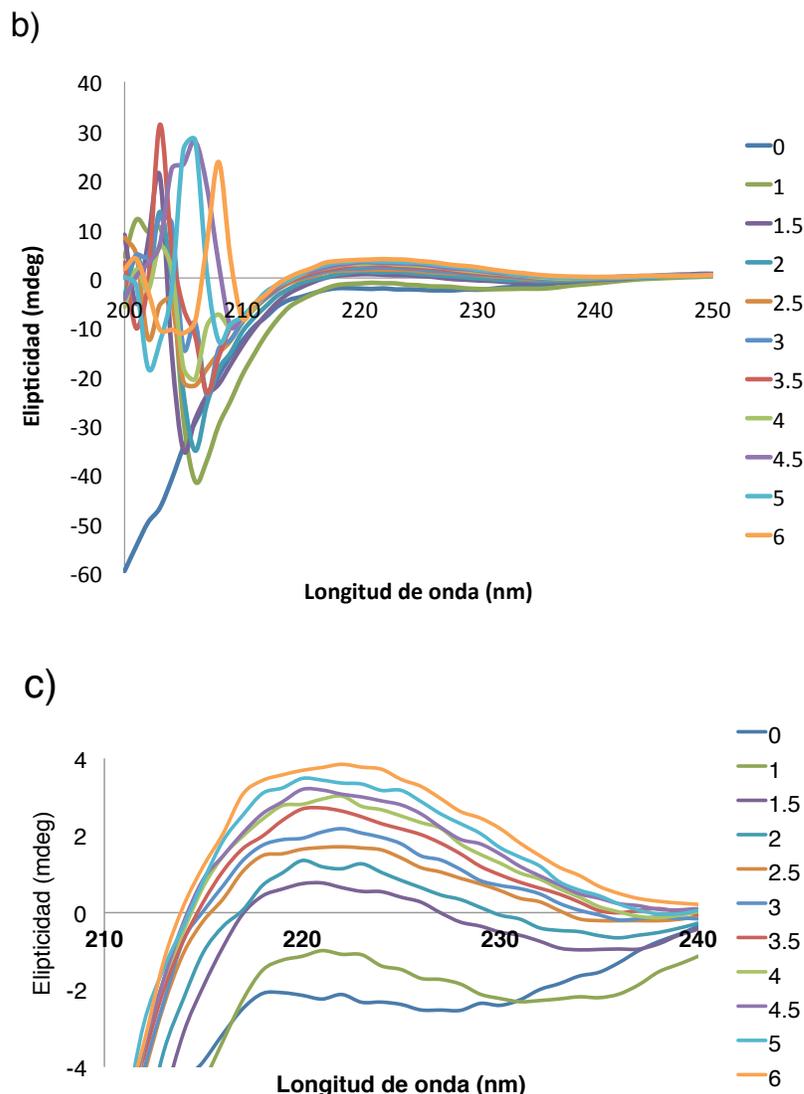


Figura 10. a) Cambios en la señal de DC a 220 nm por titulación de la proteína rPvLEA6 con GdnHCl. b) Espectros de DC de la proteína rPvLEA6 en presencia de diferentes concentraciones de GdnHCl (concentración Molar). c) Acercamiento de la zona de 210-240 nm.

Efecto del SDS en la estructura secundaria de la proteína rPvLEA6

Puesto que se ha observado que el SDS induce la formación de α -hélices en algunas proteínas LEA (Ismail, Hall et al. 1999, Soulages, Kim et al. 2002), se llevó a cabo un análisis por espectroscopia de DC en presencia de SDS (en forma de micelas). Los espectros de DC de UV lejano de la proteína rPvLEA6 con diferentes concentraciones de SDS se muestran en la Figura 11. El aumento de la señal negativa alrededor de 205 y 220 nm indica que el SDS induce la formación de α -hélices en la proteína rPvLEA6, de forma similar a lo que sucede con otras proteínas LEA de los grupos 1, 2 y 3 (Soulages, Kim et al. 2002, Soulages, Kim et

al. 2003, Shih, Hsieh et al. 2010). En presencia de 4% SDS, la proteína rPvLEA6 formó 5-12% de α -hélices de acuerdo al análisis que se realizó con en el servidor Dichroweb.

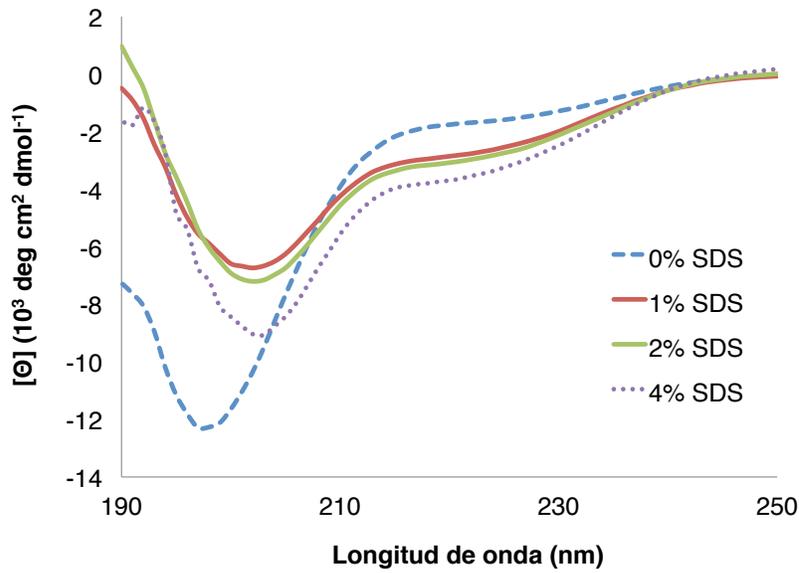


Figura 11. Efecto del incremento en la concentración de SDS en el espectro de DC de UV lejano de la proteína rPvLEA6. Todas las concentraciones de SDS están por arriba de la concentración micelar crítica (8 mM, 0.23%), es decir la proteína PvLEA6 estaría interactuando con micelas de SDS.

Efecto del pH en la estructura secundaria de la proteína rPvLEA6

Para analizar si la carga de los aminoácidos favorecían alguna conformación particular se realizó DC en diferentes pHs (Fig. 12). La estructura de la proteína rPvLEA6 se mantuvo igual en los diferentes pH probados (pH 5.7-8). Esto se podría deber a que sus diferentes aminoácidos cargados, tanto ácidos como básicos, se mantienen igualmente cargados en los diferentes pHs probados, posiblemente porque la proteína es altamente desordenada por lo que no hay suficientes interacciones entre los aminoácidos para modificar su pKa.

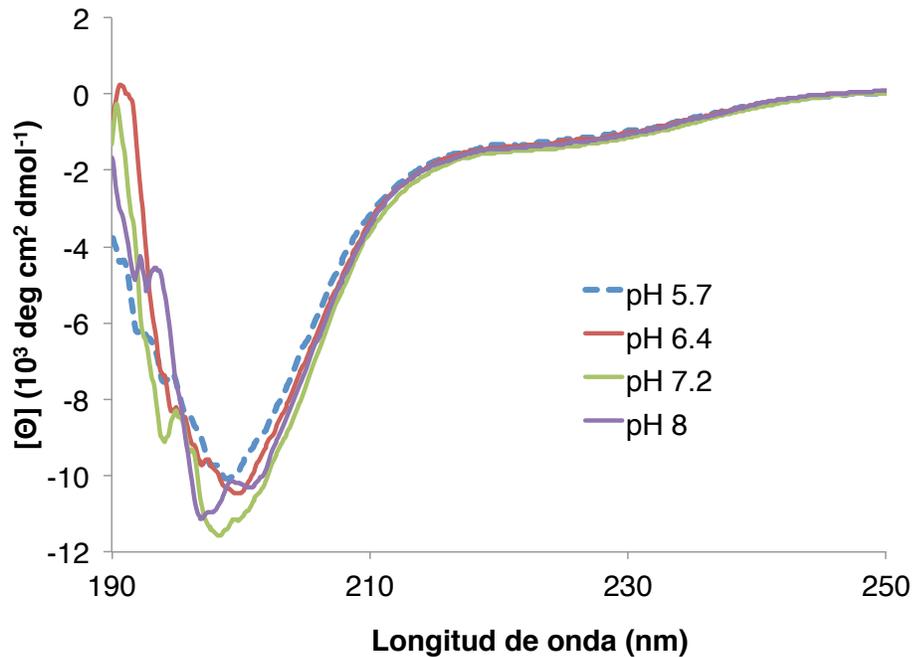


Figura 12. Espectros de DC de la proteína rPvLEA6 a diferentes pHs.

Análisis de formación de α -hélices con TFE

El trifluoroetanol (TFE) es un co-solvente que induce la formación de α -hélices dependiendo de la capacidad intrínseca de las proteínas para formarlas (Reiersen and Rees 2000). Esta estrategia ha permitido determinar que algunas proteínas LEA u otras PIDs tienen la capacidad de formar α -hélices (Soulages, Kim et al. 2003, Mouillon, Gustafsson et al. 2006),

Para conocer el potencial de formar α -hélices de la proteína PvLEA6 se llevaron a cabo experimentos de DC en presencia de diferentes concentraciones de TFE (Fig. 13). Los resultados mostraron que cuando se agrega 20% de TFE, el mínimo a 198 nm, característico de una proteína desordenada disuelta en solución acuosa, disminuye y se desplaza a aproximadamente 200 nm; en tanto que la señal alrededor de 220 nm resulta más negativa. Conforme se aumenta la concentración de TFE los espectros se parecen más a los característicos de proteínas que forman α -hélices; es decir, con dos mínimos, uno alrededor de 208 nm y otro aproximadamente a 220 nm, y una señal positiva a 190 nm. Los espectros obtenidos en presencia de 60 ó 90% de TFE son muy parecidos, lo que indica que la proteína casi alcanza su capacidad máxima para formar α -hélices con 60% de TFE. Se estimó que la proteína rPvLEA6 en presencia de 60% y 90% de TFE forma 40% y 42% de α -hélices (Dichroweb, base de datos 7), respectivamente.

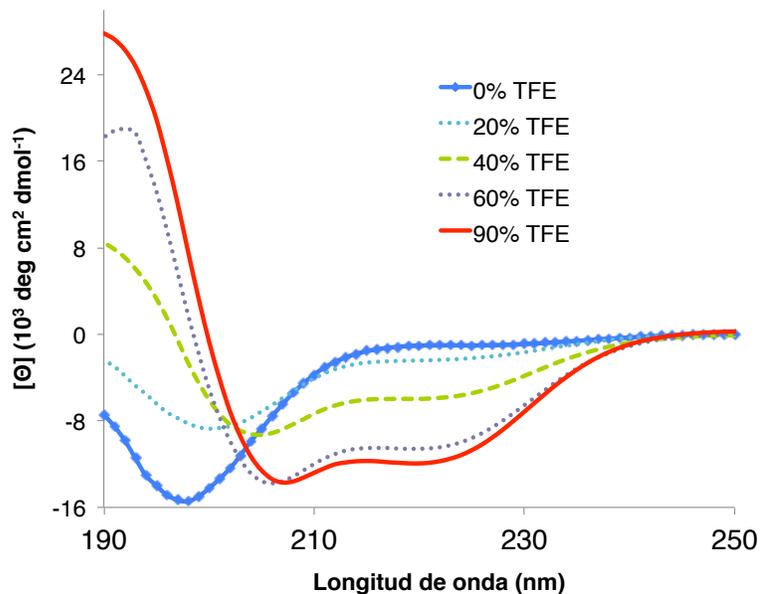


Figura 13. Espectros de DC de la proteína rPvLEA6 en presencia de diferentes concentraciones de TFE. La proteína en presencia de 60% y 90% de TFE forma 40% y 42% de α -hélices, respectivamente.

Efecto de la alta osmolaridad o el amontonamiento molecular en la estructura de la proteína rPvLEA6

Cuando la planta sufre déficit hídrico también aumenta la osmolaridad de la célula. Para simular alta osmolaridad se usó glicerol, un osmolito natural que se acumula en varios organismos en condiciones de déficit hídrico. Al utilizar este compuesto se llegan a obtener potenciales osmóticos de -91 a -270 bares. Esto es comparable con los niveles de osmolaridad que se alcanzan en las semillas maduras, es decir deshidratadas, los cuales pueden ser de -110 a -1500 bares.

La Figura 14 muestra los espectros de DC de la proteína rPvLEA6 con diferentes concentraciones de glicerol. Conforme se incrementa la concentración de glicerol, el mínimo a 200 nm disminuye y se recorre hasta 204 nm, adicionalmente la señal a 220 nm se hace más negativa, indicando formación de α -hélices. El análisis con Dichroweb de estos datos estima de 14-17% de estructura α -hélice en presencia de 87% de glicerol. Estos niveles de estructuración son comparables a los obtenidos para otras proteínas LEA, como Lti29 y Lti30 (Mouillon, Eriksson et al. 2008), aunque hay proteínas LEA que adquieren mayor nivel de estructuración como es el caso de Cor47 (Mouillon, Eriksson et al. 2008) y AtLEA4-5 que adquiere hasta 46% de α -hélice (Cesar Cuevas, datos no publicados).

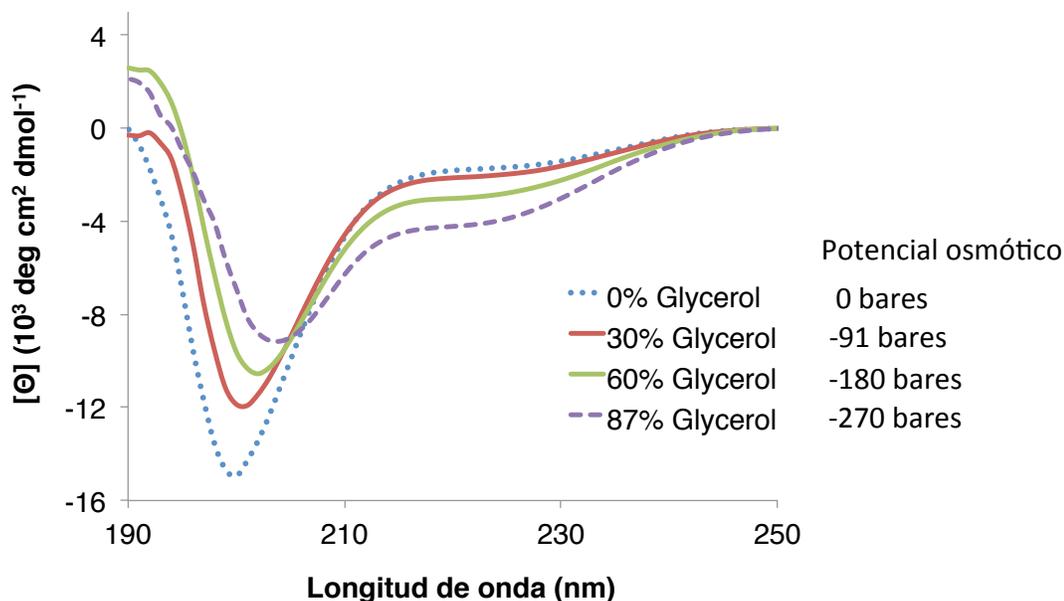


Figura 14. Espectros de DC de la proteína rPvLEA6 en presencia de diferentes concentraciones de glicerol.

La proteína PvLEA6 se expresa en condiciones de déficit hídrico, situación en que se incrementa el amontonamiento molecular del citoplasma. Por ello, se decidió probar si condiciones de amontonamiento molecular promueven la estructuración de la proteína rPvLEA6. Para simular amontonamiento molecular se utilizó PEG-6000 (polietilenglicol de peso molecular 6000 Da) (Mouillon, Eriksson et al. 2008), el cual es un polímero de alto peso molecular. Las distintas soluciones con PEG probadas presentaron potenciales osmóticos de -7.6 a -16.7 bares, niveles comparables a los potenciales osmóticos que presentan las plantas en condiciones de déficit hídrico, los cuales son de -3.5 bares o menores.

La Figura 15 muestra los espectros de DC en presencia de diferentes concentraciones de PEG. En ausencia de PEG, la proteína presentó un espectro característico de una proteína desordenada (como se describe en la Figura 6 de este escrito); sin embargo, conforme se incrementan las concentraciones de PEG, el mínimo a 198 nm se desplaza a cerca de los 205 nm y se empieza a formar un mínimo alrededor de los 225 nm, la presencia de estos dos mínimos indicó que la proteína rPvLEA6 forma α -hélices; de acuerdo al análisis con el servidor Dichroweb, la proteína rPvLEA6 forma de 12-16% de α -hélices en presencia de 66% de PEG. Estos niveles de estructuración en amontonamiento molecular son comparables a los obtenidos para la proteína LEA Lti30 (Mouillon, Eriksson et al. 2008), aunque hay proteínas LEA que presentan mayor nivel de estructuración, como son Cor47 (Mouillon, Eriksson et al. 2008) y AtLEA4-5 (Cesar Cuevas, datos no publicados).

La capacidad de estructurarse de la proteína PvLEA6 en presencia de amontonamiento molecular como se describe arriba, indica que esto podría suceder bajo condiciones en las que el agua disponible disminuye y que en consecuencia induce un aumento en el amontonamiento molecular.

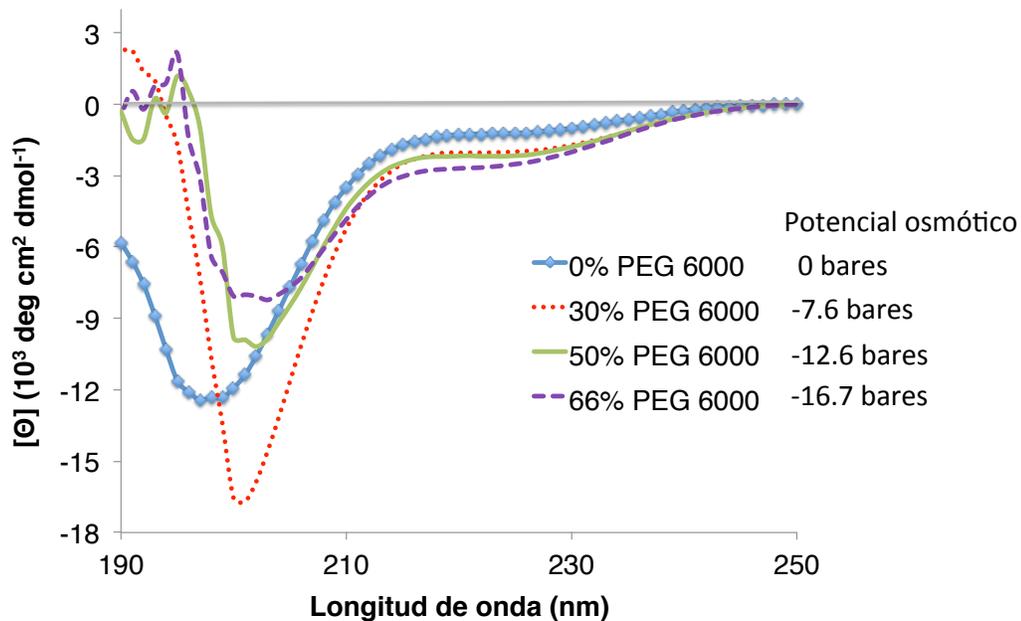


Figura 15. Espectros de DC en presencia de PEG-6000.

Se probó un PEG con una masa molecular menor, como lo es el PEG-3350, para determinar si al ser una molécula más pequeña que el PEG-6000 inducía diferentes niveles de estructuración. Como se observa en la Figura 16, en presencia de 58% PEG-3350, el mínimo a 198 nm disminuye y se desplaza hacia aproximadamente 204 nm, en tanto que la banda alrededor de 225 nm mostró valores más negativos; ambas características indicaron que bajo estas condiciones la proteína, aunque en bajo porcentaje, forma α -hélices, de manera similar a lo producido por el PEG-6000. El análisis con Dichroweb indicó un 8-11% de formación de α -hélices.

Para analizar el efecto combinado del amontonamiento molecular y la alta osmolaridad, se obtuvo el espectro de la proteína rPvLEA6 en presencia de 58% PEG y 12% glicerol; sin embargo, se observaron pocos cambios en relación a los observados con sólo PEG-3350.

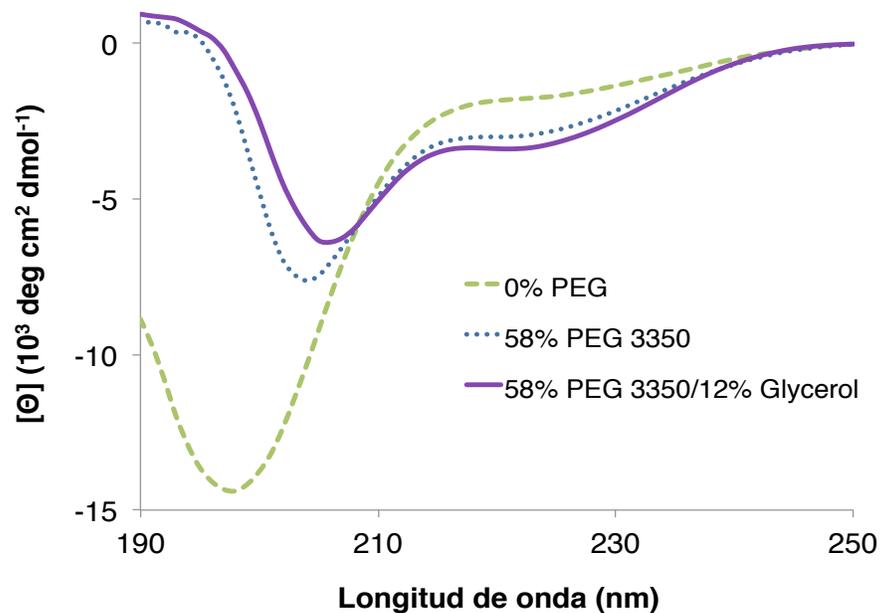


Figura 16. DC de la proteína rPvLEA6 en presencia de 58% de PEG-3350 y en presencia de 58% de PEG-3350 con 12% de glicerol.

También se realizó DC con otros agentes que producen amontonamiento molecular, como son PEG-4000, -8000 y Ficol-70 (Fig. 17), los PEGs causaron cambios similares al PEG-3350, lo que indica que moléculas que varían de peso molecular de 3350-8000 inducen cambios similares en la proteína rPvLEA6, cuyo peso molecular es de aproximadamente 9 kDa. Sin embargo el Ficol-70 (peso molecular de 70 kDa), una molécula con un peso molecular de aproximadamente 10 veces mayor que el de la proteína PvLEA6 y el de los PEGs probados, prácticamente no causó cambios en la estructura de la proteína, sugiriendo que solutos de muy alto peso molecular no producen amontonamiento molecular a la proteína PvLEA6 (Minton 2000, Minton 2005).

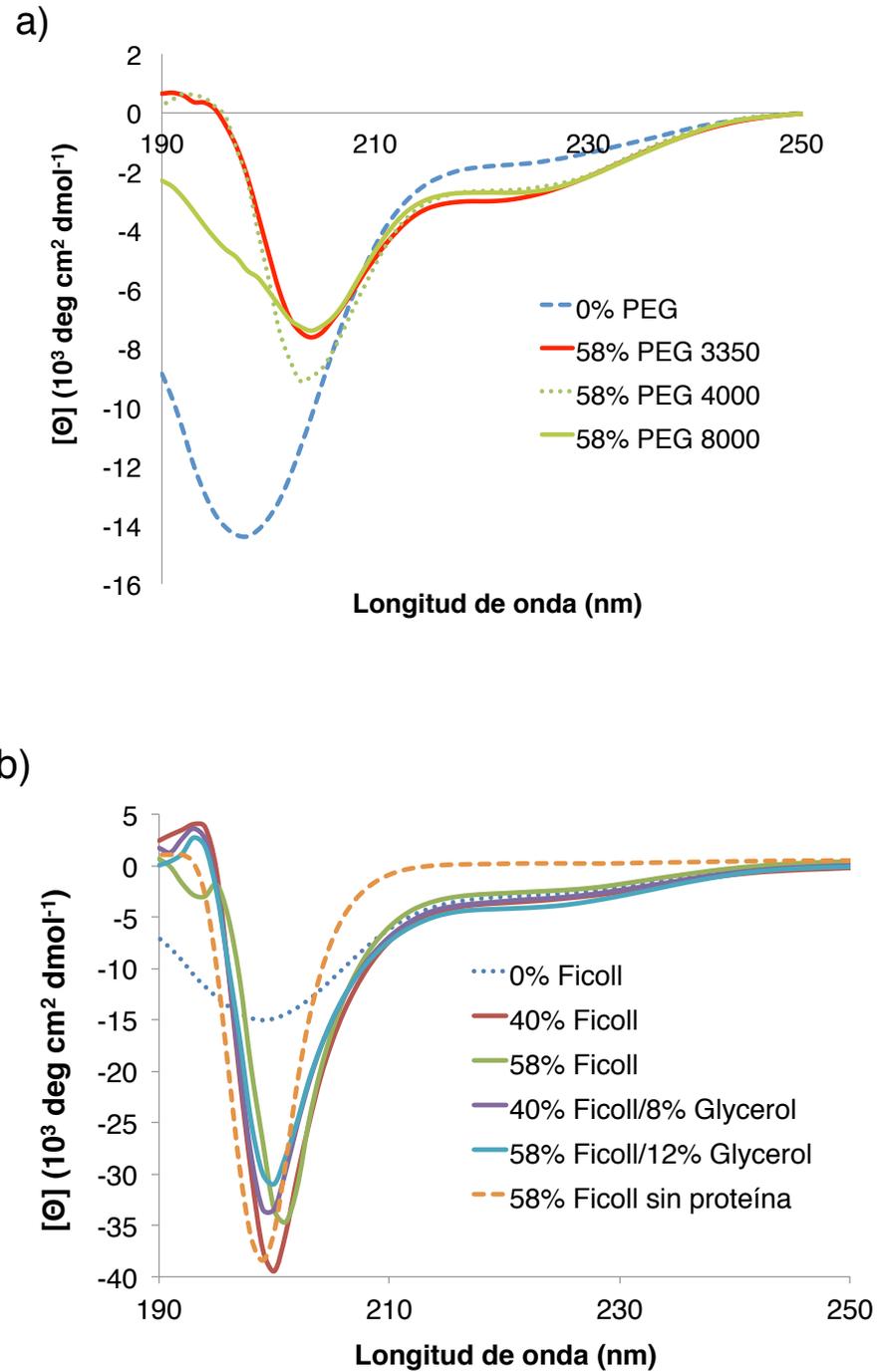


Figura 17. Espectros de DC de la proteína rPvLEA6 en presencia de a) PEGs de diferente peso molecular y b) diferentes concentraciones de Ficoll o Ficoll/Glicerol.

Análisis de la proteína PvLEA6 recombinante por RMN de 1D y 2D

Para corroborar los resultados obtenidos por DC se realizó un análisis de RMN de 1D (1 dimensión). Como se aprecia en la Fig. 18 se obtuvo poca señal de la proteína en la región de 6.4-8.4 ppm, indicativa de que la proteína se encuentra desordenada en solución.

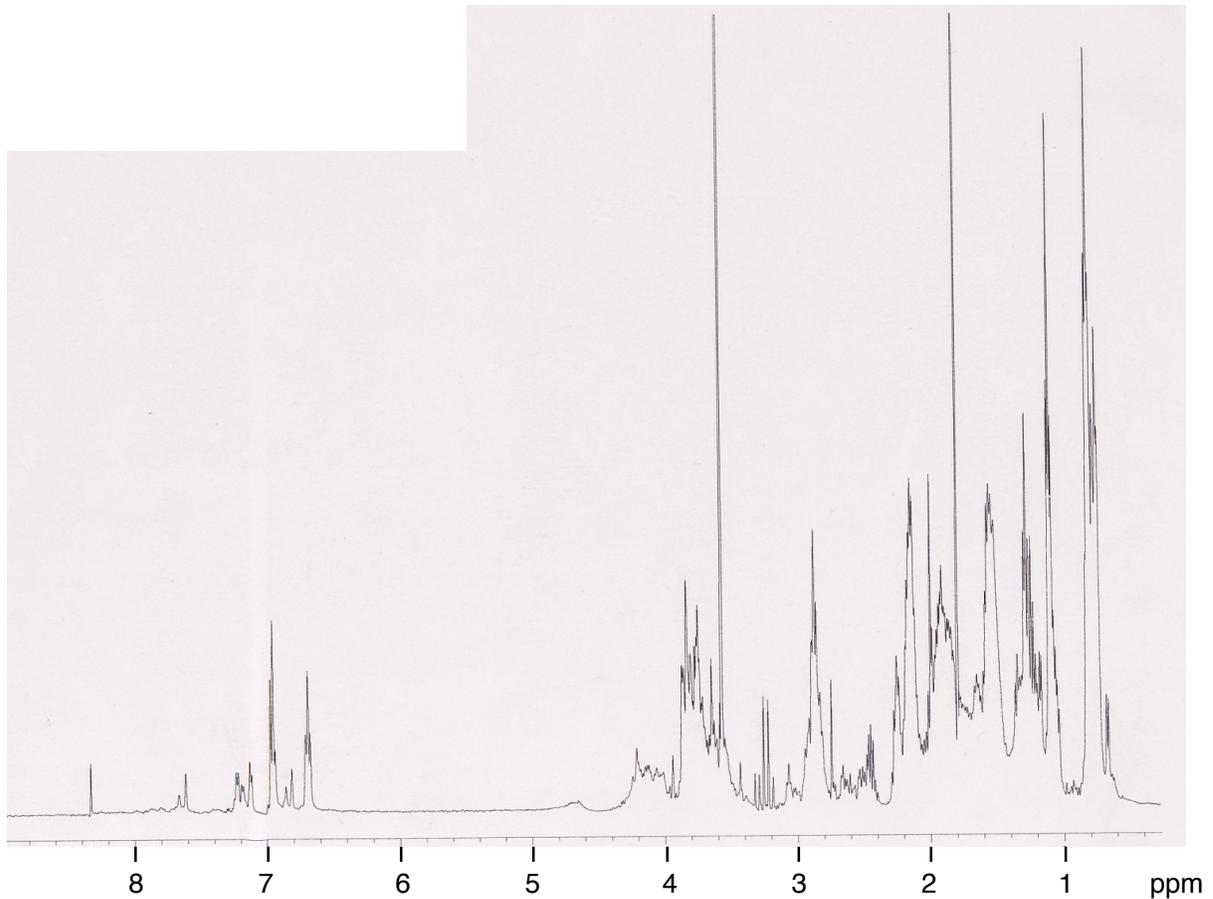


Figura 18. Espectro de RMN en 1D de la proteína rPvLEA6. Se utilizó 5% de agua deuterada.

Para tratar de obtener más información de la estructura de la proteína PvLEA6, se realizó un análisis por RMN de 2D. Como se observa en la Fig. 19, se obtuvo poca señal de la proteína PvLEA6 igual que en el caso del análisis de RMN de 1D, apoyando la idea de que la proteína está altamente desordenada en solución.

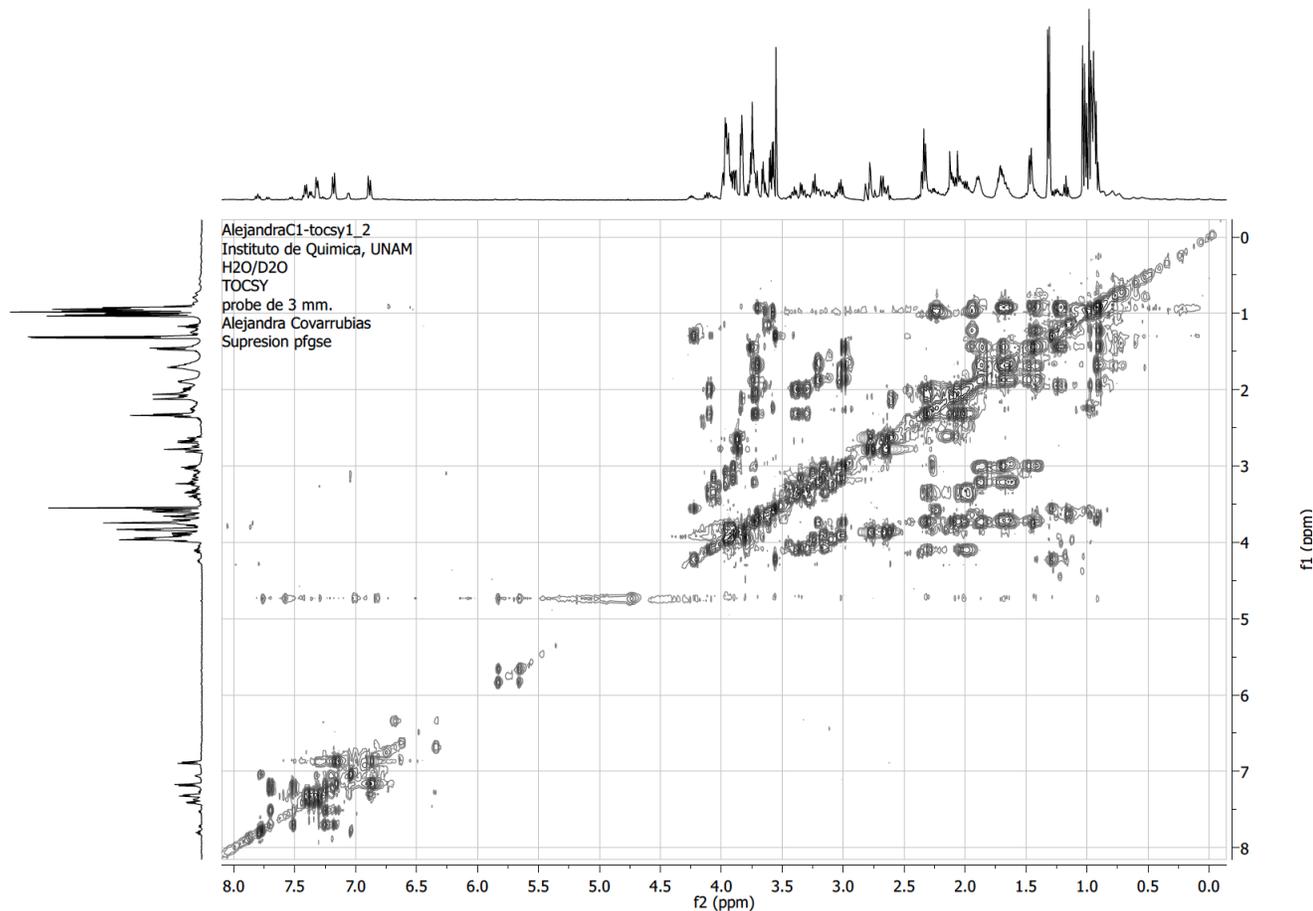


Figura 19. Espectro de RMN en 2D de la proteína rPvLEA6. Se utilizó 5% de agua deuterada.

Análisis de la proteína rPvLEA6 marcada con ^{15}N por RMN

Dado que los resultados de DC en presencia de TFE, PEG o glicerol indicaron que la proteína PvLEA6 tiene regiones que se pueden estructurar, es de interés conocer estas zonas para determinar su participación en la función de esta proteína. Con tal fin, se inició la caracterización de la proteína PvLEA6 marcada con ^{15}N con RMN 2D usando el método HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), en colaboración con el Dr. Carlos Amero del CIQ (Centro de Investigaciones Químicas, UAEM).

El espectro de RMN en 2D de la proteína PvLEA6 marcada con ^{15}N en solución (amortiguador K-fosfatos pH 8) presentó poca dispersión de la señal (agrupada en la región de 7.7-8.5 ppm en la dimensión del ^1H), indicando que la proteína se encuentra mayoritariamente desplegada (Fig. 20a); en tanto que en presencia de 62% de TFE (Fig. 20b), la señal se dispersó más (se obtuvieron señales por arriba de 8.5 ppm) indicando la

obtención de algún nivel de estructura secundaria en la proteína PvLEA6, consistente con los resultados previos de DC.

Para definir con precisión las regiones involucradas en esta ganancia de estructura se debe marcar la proteína con ^{15}N y ^{13}C para poder asignar las señales del espectro de RMN a los aminoácidos implicados.

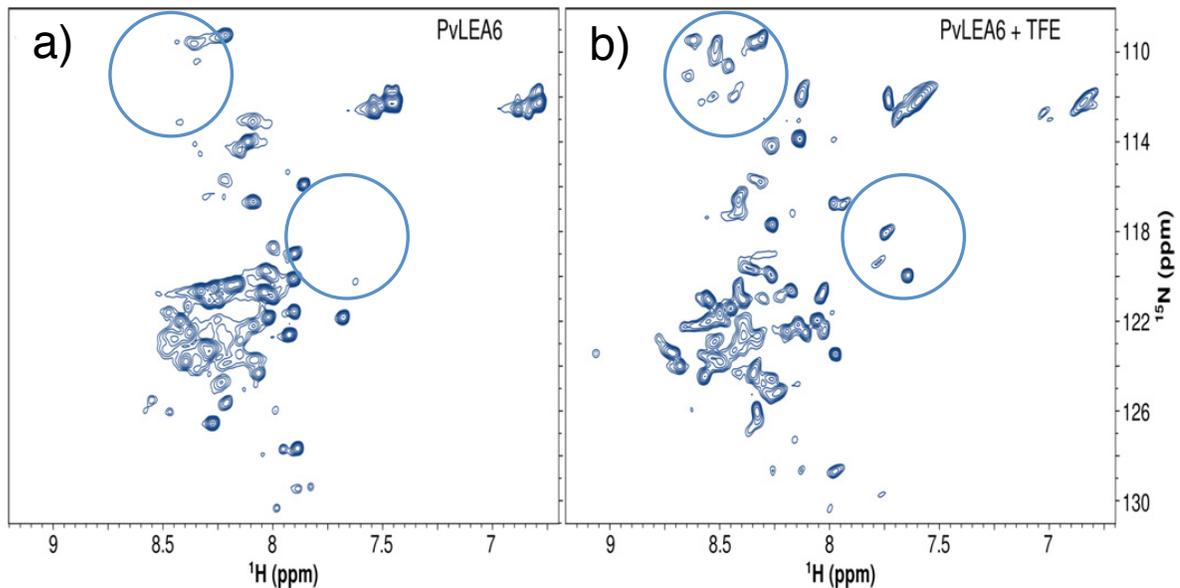


Figura 20. Espectro correlacionado de RMN de 2D ^1H - ^{15}N de la proteína rPvLEA6 en (a) amortiguador KH_2PO_4 pH 8 y (b) 62% TFE. El incremento en la dispersión de la señal en 62% TFE es consistente con un plegamiento parcial de la proteína. Los círculos muestran regiones en las que se dispersa la señal en presencia de TFE.

ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS

El análisis previo de los patrones de acumulación de la proteína PvLEA6 de semilla o bien de diferentes regiones de plántulas de frijol sugirió la formación de oligómeros de esta proteína (Colmenero-Flores, Moreno et al. 1999). Estas observaciones, así como el hecho de que algunas chaperonas como las proteínas pequeñas de choque térmico (sHSPs) actúan como oligómeros, motivaron un estudio más detallado de este fenómeno.

En un primer análisis por electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS se observó que la proteína PvLEA6 recombinante pura es capaz de formar oligómeros. La

Figura 21 muestra un resultado típico de este tipo de experimentos, en donde se detecta el monómero que migra aberrantemente con una masa molecular aparente de aproximadamente 14 kDa, una característica de muchas de las proteínas desordenadas; sin embargo, también se observaron dos bandas adicionales que migran más lentamente que el monómero, las cuales de acuerdo a su migración podrían corresponder a la asociación del monómero en dímero (23.7 kDa) y trímero (36.6 kDa). La masa molecular de los oligómeros también sería aparente, debido a la naturaleza no estructurada del monómero. Como se puede apreciar en la Fig. 21, la forma mayoritaria que se muestra en estos geles desnaturizantes corresponde al monómero, con una proporción aproximada de 6:1 (monómero a dímero).

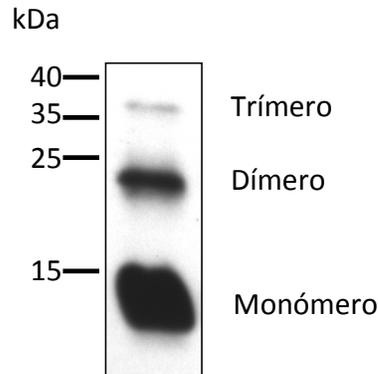


Figura 21. La proteína PvLEA6 recombinante analizada en un SDS-PAGE y revelada con anticuerpos específicos anti-PvLEA6 por experimentos tipo Western.

Entrecruzamiento de la proteína rPvLEA6

Con la finalidad de analizar la capacidad de asociación de la proteína PvLEA6, se realizaron experimentos de entrecruzamiento fotoinducido de proteínas no modificadas (Fancy and Kodadek 1999). Este método no requiere la modificación previa de las proteínas ni la adición de agentes entrecruzadores, con lo que sólo se permite la unión covalente entre tirosinas o tirosinas con lisinas de polipéptidos que están interactuando muy cercanamente, es decir formando oligómeros. Los resultados obtenidos mostraron que en efecto la proteína se puede asociar como dímero y trímero pero también puede llegar a formar complejos con una elevada masa molecular, aunque no tan alta como para impedir o limitar su entrada al gel, aún después de largos tiempos de entrecruzamiento (Fig. 22, carriles 2 – 5). Estos resultados son consistentes con la idea de que esta proteína es capaz de formar oligómeros.

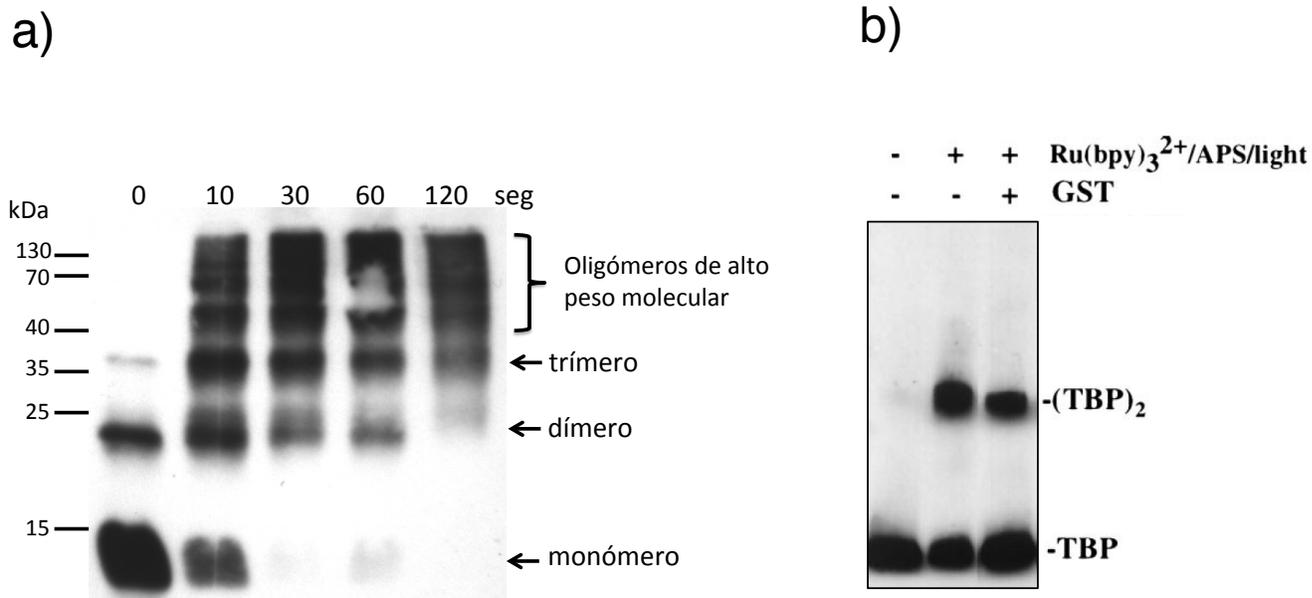


Figura 22. a) Muestras del entrecruzamiento de la proteína rPvLEA6, analizadas por SDS-PAGE y posteriormente reveladas con anticuerpos específicos anti-PvLEA6 por experimentos tipo Western. El tiempo de exposición a la luz se muestra en la parte superior del gel. b) Control negativo del ensayo de entrecruzamiento (imagen tomada del artículo de Fancy and Kodadek 1999). La proteína TBP se conoce que forma dímeros en solución, por lo que al someterse al entrecruzamiento y analizarse por SDS-PAGE se observa tanto el monómero (TBP) como el dímero ((TBP)₂). Se sabe que las proteínas TBP y GST no se asocian, por lo que al realizarse el entrecruzamiento en presencia de GST no se observan más bandas, lo que indica que la proteína TBP no se entrecruzó con la GST y prueba que el método no entrecruza proteínas que no interactúan.

Separación por FPLC de la proteína rPvLEA6

Para corroborar la observación obtenida por entrecruzamiento, la proteína rPvLEA6 se separó por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) usando una columna de filtración en gel. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y por experimentos tipo Western (Fig. 23); como se observa, la proteína se separó en monómero, dímero y trímero, probando nuevamente la capacidad de la proteína PvLEA6 para formar oligómeros.

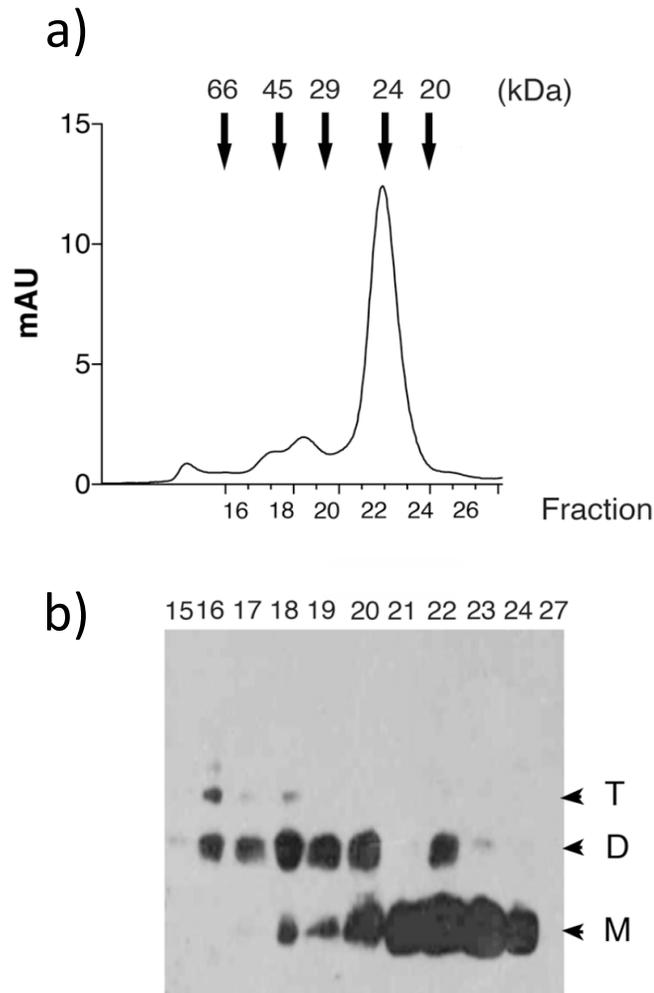


Figura 23. Separación por FPLC de la proteína rPvLEA6. a) Cromatograma de FPLC (las flechas en la parte superior indican la posición en la que eluyeron los marcadores de peso molecular), b) Análisis por experimentos tipo Western de algunas fracciones obtenidas de la cromatografía de FPLC. M: monómero, D: dímero y T: trímero.

Determinación del peso molecular de los oligómeros

Para conocer con mayor precisión la masa molecular de los oligómeros formados por la proteína PvLEA6, la proteína recombinante se entrecruzó y se analizó por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en la Unidad de Proteómica del IBt. Los resultados obtenidos mostraron que las masas moleculares correspondientes a las bandas denominadas como dímero y trímero, realmente correspondían a tales oligómeros con una masa molecular de 17,781 kDa y 26,799 kDa, respectivamente (Fig. 24).

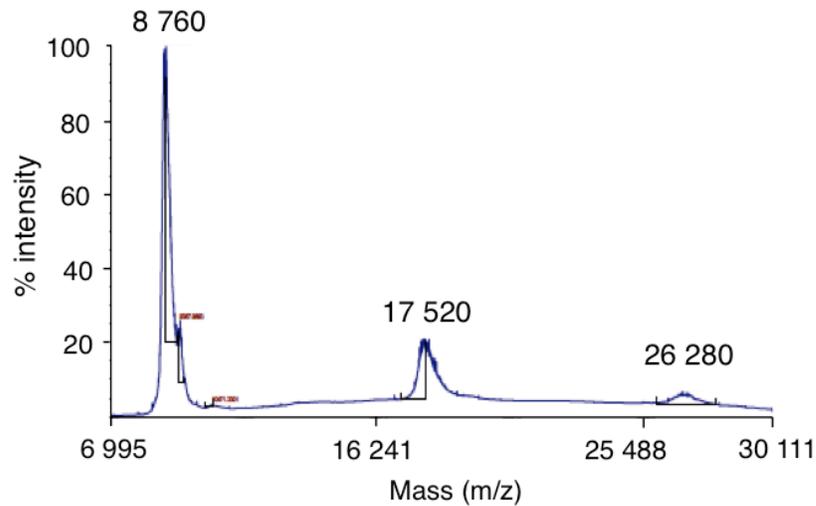


Figura 24. Masas moleculares del monómero, dímero y trímero determinados por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Efecto de la urea en la estabilidad de los oligómeros

Para determinar si los oligómeros formados por la proteína PvLEA6 son estabilizados por interacciones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno, la proteína rPvLEA6 se resolvió en geles de SDS-PAGE con o sin urea 6M (Fig. 25). La presencia de urea en el gel no afectó la formación del dímero, sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas ó los puentes de hidrógeno no participan de manera importante en la formación de los oligómeros.

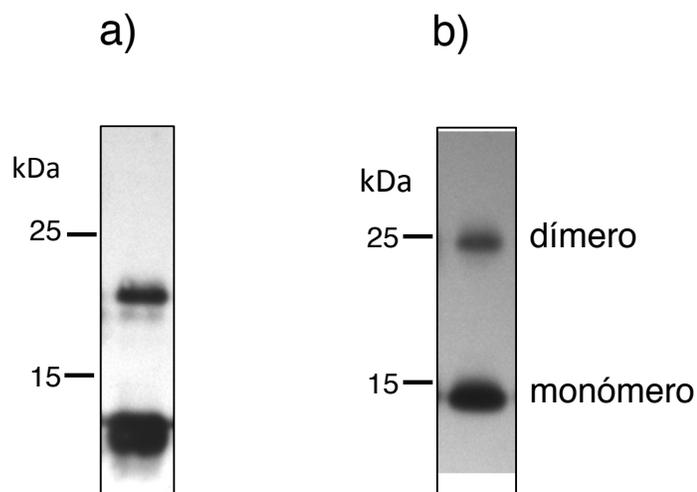


Figura 25. Análisis por geles de SDS-PAGE con o sin urea 6M de la proteína rPvLEA6. a) Gel sin urea y b) Gel con urea. Los geles se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos anti-PvLEA6.

Hidrólisis ácida y análisis por espectrometría de masas de los aminoácidos y de los péptidos de la proteína rPvLEA6

Dado que los oligómeros que forma la proteína rPvLEA6 son resistentes al SDS, DTT y a la urea, estos podrían estabilizarse a través de enlaces covalentes entre las tirosinas, los cuales son enlaces que se pueden formar sin enzimas, sólo por condiciones oxidantes (Souza, Giasson et al. 2000). Para determinar esto, se realizó una hidrólisis ácida de la proteína en condiciones anaeróbicas para que sólo se rompiera el enlace peptídico, y si dos tirosinas estaban haciendo un enlace covalente, estas permanecerían juntas después de la hidrólisis.

El producto de la hidrólisis se analizó por espectrometría de masas (Fig. 26). Se obtuvieron todos los aminoácidos (algunos no se observan porque se descomponen en aminoácidos más pequeños), incluyendo las tirosinas, que componen a la proteína lo que indica que la hidrólisis fue completa, pero no se obtuvieron moléculas de masa molecular correspondiente a dos tirosinas unidas. Esto se podría deber a que los aminoácidos no están formando enlaces covalentes entre sus cadenas laterales o a que el tratamiento de la hidrólisis ácida llegó a romper dichos enlaces.

Para descartar que durante la hidrólisis ácida se rompieron los enlaces entre las tirosinas, la proteína se separó en un gel de SDS-PAGE y la banda correspondiente al dímero se escindió para analizarse por espectrometría de masas. Para esto, primero la proteína se digirió por proteólisis enzimática y, posteriormente, se determinó la masa molecular de los péptidos por espectrometría de masas, en donde se esperaba observar péptidos unidos, es decir, moléculas con la masa que correspondiera a la suma de dos péptidos unidos. Sin embargo, sólo se obtuvieron los péptidos individuales sin estar unidos por tirosinas o por algún otro tipo de enlace (Tabla 2), indicando que los oligómeros no se estabilizan a través de enlaces covalentes.

En la literatura se reportó que una proteína llamada β -glicosidasa forma un dímero resistente al SDS, en donde se observó que la interface interacciona desfavorablemente con el SDS y que el dímero es estabilizado a través de interacciones polares (Gentile, Amodeo et al. 2002). La proteína PvLEA6 al ser muy hidrofílica se podría estar comportando de forma similar, interaccionando poco con el SDS y formando los oligómeros a través de interacciones electrostáticas y puentes salinos.

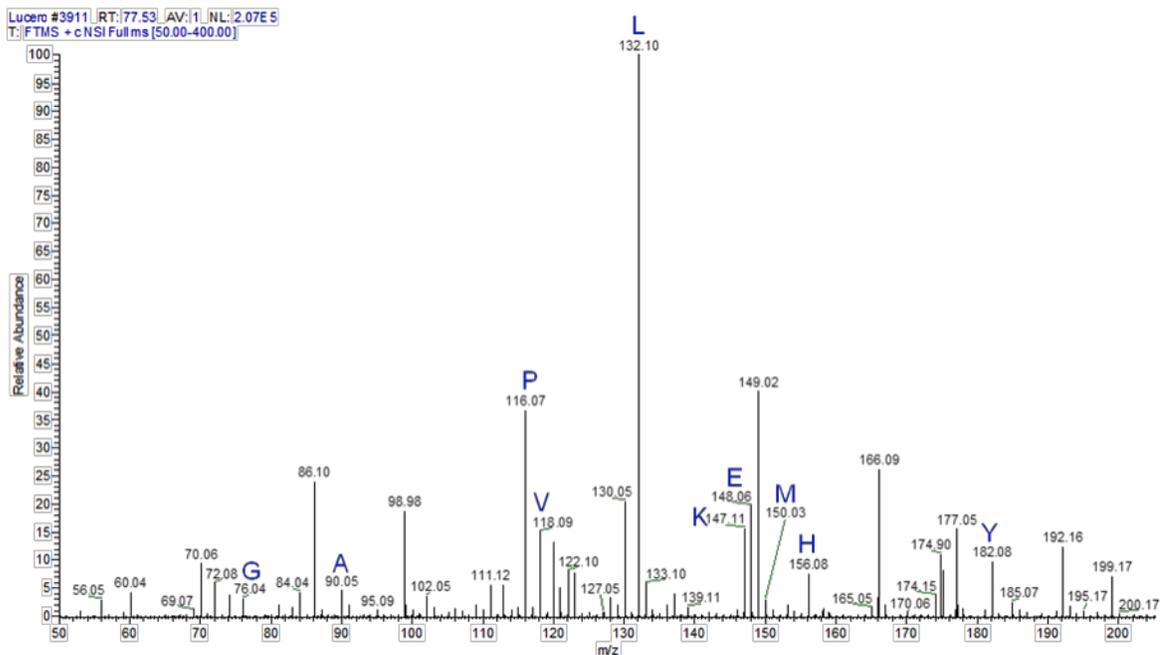


Figura 26. Análisis por espectrometría de masas del producto de la hidrólisis de la proteína rPvLEA6.

Sequence	# PSMs	# Proteins	#Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCorr	Probability	Charge	MH+[Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
KTSESEQGK/VNLEGLPTEDSPYVK	26	2	1	024439		0.0000	623	0.00	3	254826853	-364	1061
YKDLEDYKQQGYGTQGHQEPK	20	2	1	024439		0.0000	605	0.00	3	251216745	-259	1994
TESEQGVNLEGLPTEDSPYVK	32	2	1	024439		0.0000	513	0.00	2	242017583	-290	815
GAGATEAPTLSGAAPSSK	12	2	1	024439		0.0000	495	0.00	2	162279949	-163	2020
VNLEGLPTEDSPYVK	6	2	1	024439		0.0000	424	0.00	2	166083611	-410	2176
SQATGTGATNHK	20	1	1	024439		0.0000	359	0.00	2	117256096	-386	828
GAGATEAPTLSGAAPSSKSQATGTGATNHK	4	1	1	024439		0.0000	325	0.00	3	277634214	-275	1602
QQGYGTQGHQEPK	12	2	1	024439		0.0000	264	0.00	2	145767314	-252	1579

Tabla 2. Análisis por espectrometría de masas de los péptidos obtenidos del dímero de la proteína rPvLEA6 resistente a SDS.

Análisis de la fuerza iónica en la estabilidad de los oligómeros

Como se mencionó anteriormente, algunos oligómeros resistentes al SDS son estabilizados a través de interacciones polares, por lo que se decidió probar el efecto de la sal (NaCl) en la formación de los oligómeros. La proteína rPvLEA6 se entrecruzó en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Como se observa en la Figura 27, la sal interfiere con las interacciones entre los monómeros, evitando la formación eficiente de los oligómeros, indicando que las interacciones electrostáticas y los puentes salinos juegan un papel importante en la estabilidad de éstos.

Estos resultados son consistentes con la composición de los aminoácidos de la proteína PvLEA6, ya que contiene el 28% de aminoácidos cargados (13% con carga positiva y 15% con carga negativa), de tal manera que es posible que una de las fuerzas que estabilicen a sus oligómeros sean interacciones electrostáticas. Por otro lado, estas observaciones también sugieren que estas propiedades en la proteína rPvLEA6 le permitan no sólo formar homo-oligómeros sino también hetero-oligómeros quizá como parte de un mecanismo de protección de otras proteínas en la célula.

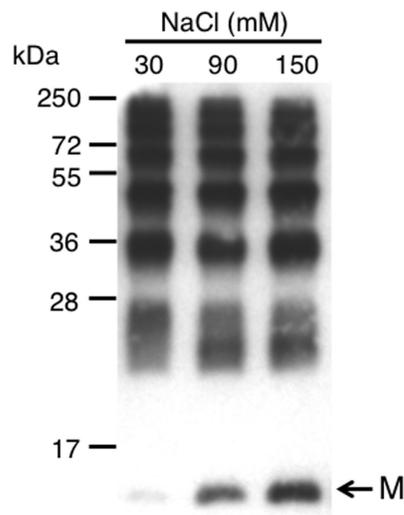


Figura 27. Entrecruzamiento de la proteína rPvLEA6 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Las muestras se analizaron en SDS-PAGE y se revelaron con anticuerpos específicos anti-PvLEA6 por experimentos tipo Western. M: monómero.

Análisis de la estructura de la proteína rPvLEA6 en su forma oligomérica

Puesto que existe la observación que ciertas PIDs son capaces de adquirir una estructura estable al interactuar con otra proteína (Sugase, Dyson et al. 2007), decidimos determinar si existía algún cambio en la estructura de la proteína PvLEA6 cuando se encontraba en forma oligomerizada. Para tal fin, la proteína rPvLEA6 se entrecruzó (Fig. 28a) y se analizó por DC (Fig. 28b). Los resultados mostraron que el espectro de la proteína entrecruzada (CL) es similar al de la proteína no entrecruzada (no CL, es decir el monómero); esto es, la proteína en su forma oligomérica se mantiene mayoritariamente desordenada.

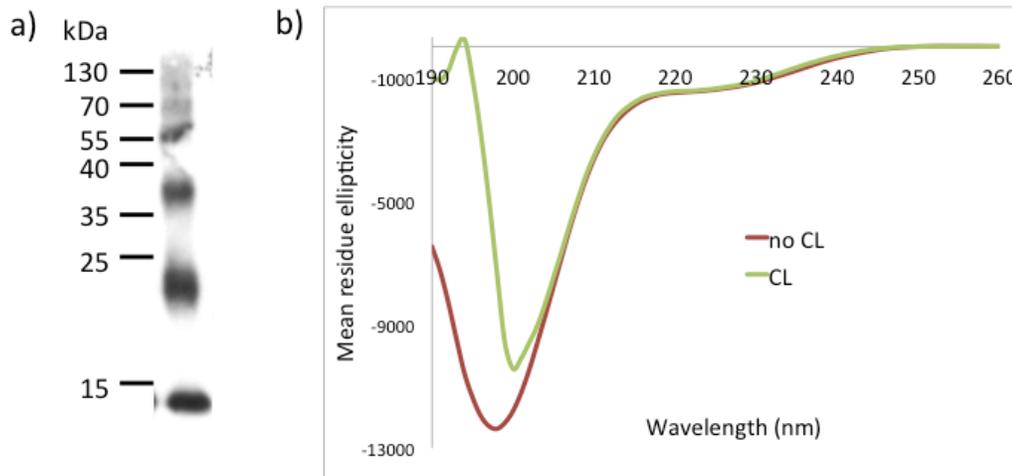


Figura 28. a) Análisis por experimentos tipo Western de la proteína rPvLEA6 entrecruzada que se sometió al análisis por DC, b) DC de la proteína PvLEA6 no entrecruzada (no CL) y entrecruzada (CL).

Medición de la constante de disociación del dímero de la proteína rPvLEA6.

Con la finalidad de tener una idea de la estabilidad de los oligómeros de la proteína rPvLEA6, en colaboración con el Dr. Enrique García del Instituto de Química de la UNAM, se determinó la constante de disociación (K_d) del oligómero por Calorimetría de Dilución Isotérmica.

La inyección de alícuotas de una solución proteica concentrada en la celda calorimétrica produjo calor endotérmico, indicativo de disociación del homo-oligómero. La línea sólida en la isoterma de disociación corresponde al mejor ajuste de un modelo de disociación de dímero, indicando la formación predominante del dímero (Fig. 29). Las mediciones, realizadas en triplicado a 30 °C, produjeron una $K_d=60 \pm 20 \mu\text{M}$ y $\Delta H_d=1 \pm 0.3 \text{ kcal/mol}$. Esta información permitió el cálculo de los siguientes parámetros termodinámicos para la formación del dímero: $\Delta G_a= -5.9 \text{ kcal/mol}$, $\Delta H_a= -1 \text{ kcal/mol}$ y $T\Delta S_a= 4.9 \text{ kcal/mol}$, indicando una interacción de baja afinidad y favorecida entrópicamente.

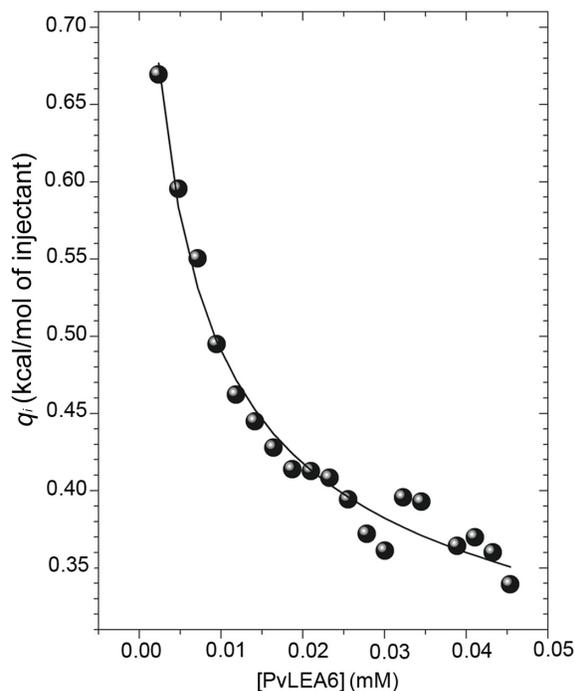


Figura 29. Isotherma de disociación calorimétrica de la proteína rPvLEA6.

DISCUSIÓN

El desorden estructural en las proteínas se reconoce como una propiedad involucrada en muchas funciones importantes en organismos de diferentes reinos de la vida (Tompa 2012). De las muchas PIDs predichas en plantas (95 en Arabidopsis) muy pocas han sido caracterizadas estructural y/o funcionalmente (Pazos, Pietrosemoli et al. 2013, Sun, Rikkerink et al. 2013). En este trabajo se investigaron las características estructurales de la proteína rPvLEA6, mostrando, como se había predicho que contiene alto grado de desorden.

El análisis del efecto de la temperatura en el espectro de DC mostró que la proteína rPvLEA6 sufre una transición estructural, y la presencia de un punto isodicroico indicó que esta proteína en solución acuosa está en equilibrio entre dos estados conformacionales, un fenómeno también observado en otras proteínas LEA del grupo 1 (GmD-19) y grupo 2 (GmDHN1) (Soulages, Kim et al. 2002, Soulages, Kim et al. 2003). De acuerdo a los cambios observados en las señales del espectro, una conformación podría ser desordenada con algunas regiones formando hélices PPII y otras regiones menores formando estructura beta, y la otra estructura podría ser desordenada con algunas regiones formando estructuras beta y otras regiones menores formando hélice PPII, es decir, la diferencia entre las dos conformaciones consiste en la proporción de hélices PPII a estructuras beta (Park, Shalongo

et al. 1997, Shi, Olson et al. 2002, Shi, Chen et al. 2005, Kjaergaard, Norholm et al. 2010). Que la proteína PvLEA6 presente dos estados conformacionales en solución muestra la alta flexibilidad de esta proteína. Estos estados conformacionales se podrían presentar *in vivo*.

Las proteínas en la célula están en condiciones de amontonamiento molecular el cual se incrementa cuando las células están en condiciones de déficit hídrico. En este trabajo se mostró que la proteína rPvLEA6 adquiere un grado de estructura secundaria en condiciones de alta osmolaridad inducida con glicerol y de amontonamiento molecular inducido con PEG. Aunque los cambios observados fueron entre 12-20% de formación de α -hélice, estos pocos cambios conformacionales fueron reproducibles en experimentos independientes, sugiriendo que estos niveles de helicidad podrían jugar un papel importante *in vivo*. En presencia de TFE la proteína PvLEA6 llegó a formar 40% de α -hélice, lo cual correlaciona con lo predicho por diferentes programas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. La región que se predice que se estructura es una región altamente conservada (aminoácidos 20-40), esto sugiere que esta región necesita estructurarse para que la proteína realice su función.

El SDS podría estar cambiando la estructura de la proteína por interacción directa con ésta, dado que la presencia de sólo 1% de SDS promueve cambios en la conformación de la proteína PvLEA6, a diferencia del glicerol y del PEG, de los que se necesita más del 30% de solutos para inducir la formación de estructura secundaria. Esto indica que el glicerol y el PEG cambian la conformación de la proteína debido más bien a que inducen una alta osmolaridad ó amontonamiento molecular en el medio, más que por interacción directa.

Muchas proteínas en la célula modulan su función por la asociación de sus unidades monoméricas. Algunas de éstas son activas como oligómeros, y otras son activas como monómeros (Gunasekaran, Tsai et al. 2004). En este trabajo se mostró que la proteína rPvLEA6 puede formar oligómeros, siendo el dímero la asociación mayoritaria. La abundancia de aminoácidos cargados y polares en la proteína PvLEA6 sugiere que las interacciones polares y los puentes salinos juegan un papel principal en la estabilidad del dímero, lo cual fue consistente con la disminución de la oligomerización al incrementar la fuerza iónica de la solución. La unión a través de interacciones electrostáticas hace dispensable la presencia de agua, dado que estas interacciones a diferencia de las interacciones hidrofóbicas se pueden dar aún en condiciones sin agua. La interacción de la proteína PvLEA6 con sus moléculas blanco también podría ser a través de interacciones electrostáticas.

La interacción entre dos monómeros de PvLEA6 altamente flexibles sugiere un proceso dinámico, donde las interacciones transitorias podrían ser las responsables de la

formación del oligómero de la proteína PvLEA6. La K_d determinada de 60 μM para la formación del dímero soporta dicha idea, indicando una afinidad baja y una interacción transitoria entre los monómeros de la proteína rPvLEA6 (Perkins, Diboun et al. 2010).

La interacción de la proteína PvLEA6 con sus moléculas blanco podría tener una afinidad similar a la que presenta el homo-dímero, es decir una afinidad baja la cual podría incrementarse con el incremento de amontonamiento molecular que sucede cuando la planta sufre déficit hídrico. Al regresar la planta a condiciones normales de hidratación, el amontonamiento molecular disminuye, con lo que la afinidad entre la proteína PvLEA6 y su blanco disminuiría, llevando a que el complejo se disocie rápidamente y la molécula blanco pueda continuar realizando su función. La afinidad por sus moléculas blanco podría variar, teniendo más afinidad por unos blancos que por otros.

En el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias se determinó que la proteína PvLEA6 forma los oligómeros *in vivo* (datos de Marina Battaglia), y esto podría indicar que la formación de oligómeros está implicada en la función que realiza la proteína PvLEA6 en la célula. La proteína PvLEA6 se podría unir como dímero a su molécula blanco.

CONCLUSIONES

La proteína rPvLEA6 es desordenada en solución y se encuentra en equilibrio entre dos conformaciones.

La proteína rPvLEA6 puede formar hasta un 41% de α -hélices en presencia de TFE lo que muestra un potencial intrínseco para adoptar este tipo de estructura.

Condiciones que inducen una reducción en el agua disponible en la solución como el glicerol, o bien que aumentan el amontonamiento molecular, condiciones presentes bajo déficit hídrico, promueven la formación de α -hélices (12-20%) en la proteína rPvLEA6.

La proteína rPvLEA6 forma oligómeros de diferentes tamaños *in vitro*, siendo los dímeros los más abundantes, los cuales presentan una $K_d=60 \pm 20 \mu\text{M}$, indicando

interacciones de baja afinidad. Este tipo de interacciones semejan asociaciones transitorias como las que presentan otras PIDs.

La inhibición de la oligomerización con NaCl indica que una de las fuerzas que participan en la estabilización de los oligómeros son interacciones electrostáticas.

PERSPECTIVAS

- Realizar DC de la proteína PvLEA6 a diferentes temperaturas en presencia de amontonamiento molecular, para determinar si se observa el equilibrio entre dos conformaciones que se observó en solución (sin amontonamiento molecular) o si se favorece una de las dos conformaciones.
- Determinar las regiones de la proteína con mayor capacidad de estructurarse, esto realizando RMN 2D de la proteína marcada con ^{15}N y ^{13}C .
- Mutar las zonas con mayor capacidad de formar hélices, para determinar si se necesita de que estas zonas se plieguen, para reconocer al blanco y protegerlo.
- Analizar si los oligómeros de la proteína PvLEA6 se estructuran en amontonamiento molecular.
- Determinar a través de que aminoácidos ocurren las interacciones proteína-proteína en la formación de los oligómeros.
- Realizar la calorimetría en presencia de PEG.
- En el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias se encontró que la proteína PvLEA6 puede unir Fe(III) (datos de Marina Battaglia), por lo que sería interesante determinar como la unión del Fe(III) modifica la estructura de la proteína y las interacciones proteína-proteína en la formación de oligómeros.
- En el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias se encontró que la proteína PvLEA6 permite que la cepa BX04 de *E. coli*, la cual es una cuádruple mutante en proteínas con actividad de chaperona de RNA, se recupere mejor de un choque de frío (datos de Lucero Rivera, Inti Arroyo y Darinka Méndez). Por lo tanto sería de utilidad determinar que función está realizando la proteína PvLEA6 en esta cepa y después determinar si esta función es la que realiza en la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de la proteína PvLEA6

Obtención del cultivo de células que sobre-expresan la proteína de fusión (Inteína-PvLEA6).

100 ml de LBamp (LB con 100µg/ml de ampicilina), se inocularon con 20 µl de bacterias en LB/glicerol (LB:glicerol 80%, 1:1, congeladas a -20°C). El cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C, con 4 ml de cultivo se inocularon 100 ml de LB, se incubó 2 h 25 min, llegó a OD_{600nm} 0.76. Con 50 ml de este cultivo se inocularon 150 ml de LB, este cultivo se incubó 1 h 20 min, llegó a OD_{600nm} 0.7 (fase de crecimiento exponencial), posteriormente se le agregó IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 0.5 mM concentración final y se incubó durante 6 h ó 6 h 40 min a 25°C y 200 rpm (revoluciones por minuto), es importante mantener esta agitación, para que la proteína se acumule mucho, si se usa una agitación mayor la proteína se acumula menos.

Preparación del extracto clarificado.

El cultivo de células expresando la proteína recombinante se centrifugó durante 10 min a 6000 rpm, para obtener la pastilla de células; ésta se resuspendió en amortiguador de lisis (20 mM Na-fosfato pH 8, 500 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 20 µM PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride)), con la siguiente proporción: 4 g de pastilla de células se resuspendió en 50 ml del amortiguador; las células se lisaron por sonicación (9-17 ciclos de: 30 s sonicación (amplitud 60), 1-3 min. en hielo). Posteriormente, el lisado celular se centrifugó durante 30 min a 13 000 rpm (en rotor JA-20), se obtuvo el sobrenadante y se guardó a -20°C.

Purificación de la proteína PvLEA6 en columna o batch

Purificación en columna

La purificación se realizó con el kit IMPACT-CN (New England Biolabs). El protocolo consiste en hacer pasar lentamente (1 ml/10 min) el extracto clarificado, en una columna con resina de quitina (equilibrada previamente con 10 vol. de buffer columna), se usó 1 ml de resina por cada 10 mg de proteína en el extracto. Posteriormente se lava la resina con más de 10 volúmenes de amortiguador de columna (20 mM Na-fosfato pH 8, 500 mM NaCl), el amortiguador se pasa con un flujo de ~1.3 ml /min. Después se hacen pasar 3 volúmenes de amortiguador de corte (20 mM Na-fosfato pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM DTT (Dithiothreitol)), con un flujo de 1.3-1.5 ml/min, durante aproximadamente media hora, se detiene el flujo en la columna y se incuba durante 43-62 h a 25°C. Al término de la incubación, la proteína PvLEA6

se eluye de la columna con 3-6 volúmenes de amortiguador K-fosfatos 10 mM, pH 8 con flujo 1 ml/min.

Purificación en batch

La resina se equilibró en batch de la siguiente forma: la resina se agitó durante 10 min con 3 vol. de buffer columna, posteriormente se retiró el buffer por decantación, este lavado se repitió 3 veces.

A la resina en batch (tubo falcon de 50 ml) se le agregó el extracto clarificado (1 ml de resina por cada 10 mg de proteína en el extracto), la resina se incubó con el extracto durante toda la noche a 4 °C y con agitación.

Posteriormente la resina se puso en la columna para lavarse y continuar con la purificación como se describe arriba.

Diálisis

La solución proteica se colocó en membrana de diálisis (Spectra/Por dialysis membrane, Daigger) de tamaño de corte de poro de 3.5 kD. Aproximadamente 50 ml de solución proteica se dializaron con 2 L de amortiguador K-fosfatos 1 mM, con agitación, a 4 °C o temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados, el primero y el último se hicieron durante toda la noche, y los otros tres durante 3-4 h.

Concentración de la proteína PvLEA6

La proteína PvLEA6 se concentró por liofilización, solo se disminuyó el volumen, esto se evitó la pérdida total del líquido, porque si se pierde todo el líquido la proteína se queda pegada en el plástico del tubo, con lo que se recupera poca proteína al tratar de resuspenderla.

Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Las mediciones de DC (Dicroísmo circular), se realizaron en un espectropolarímetro de DC (modelo J-715, Jasco) usando una celda de 0.1 cm de longitud de paso óptico, sobre el intervalo 190-260 nm o usando una celda de 1 cm de longitud de paso óptico, sobre el intervalo 250-350 nm. La temperatura fue controlada por un controlador de temperatura Peltier (modelo PTC-4235, Jasco). Los espectros de DC fueron adquiridos cada 1 nm con dos segundos de tiempo promediado por punto y un paso de banda de 1-nm. La velocidad de lectura fue 20 nm/min. Los espectros se promediaron por cuadruplicado, excepto en el caso

de la termografía en la que se cambió la temperatura cada 2 °C, en donde solo se realizó un espectro para cada temperatura.

Las muestras se mezclaron y se incubaron a la temperatura de realización del espectro, mínimo 30 min antes de la captura del espectro de DC. Adicionalmente las muestras se incubaron a la temperatura de realización del espectro durante 3-5 min en el compartimento de la celda del espectropolarímetro previo a la realización de éste.

La concentración de la proteína fue aproximadamente 0.3 mg/ml para el DC en UV lejano ó 2 mg/ml para el DC en UV cercano.

Fluorometría

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un LS50B espectrofluorómetro (Perkin Elmer, Norwalk, CT) equipado con un termostato en el compartimento de la celda, usando una celda de 1 cm de longitud de paso óptico, sobre el intervalo 280-600 nm. La concentración de la proteína fue aproximadamente 200 µg/ml.

Ensayo de Western-blot

Western-blot usando fosfatasa alcalina

Las proteínas que se separaron por SDS-PAGE al 10 ó 15 % se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) en cámara semiseca durante 2 h a 250 mA, para lo cual se utilizó buffer de transferencia (glicina 0.19 M, Tris 25 mM, metanol 20%, pH final 8.3). La transferencia se verificó por tinción reversible utilizando reactivo rojo de Ponceau (0.2 % rojo Ponceau y 5 % ac. acético). Posteriormente, la membrana se incubó con bloqueador (PBS-leche 5%, PBS: NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4; leche descremada en polvo) durante 1-2 h a temperatura ambiente con agitación oscilatoria. En seguida se decantó el bloqueador y se incubó con el primer anticuerpo, anti-PvLEA-18, diluido en bloqueador 1:2000, durante toda la noche a 4°C con agitación oscilatoria.

Con la finalidad de eliminar el anticuerpo que se hubiese pegado inespecíficamente, se incubó con PBS con agitación oscilante durante 10 min., se decantó el PBS, y este lavado se repitió tres veces. Dado que el primer anticuerpo se obtuvo de conejo, el segundo anticuerpo que se utilizó fue anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina. La membrana

se incubó con el segundo anticuerpo diluido 1:5000 en bloqueador, durante 2 h a temperatura ambiente con agitación oscilante.

Como en el caso anterior, para quitar el pegado inespecífico del segundo anticuerpo, se incubó con amortiguador de fosfatasa (Tris-Cl 0.1 M pH 9, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 5 mM) con agitación oscilante durante 10 min., este lavado se repitió tres veces. Para revelar la membrana, ésta se incubó con la solución de sustratos BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/cloruro de tetrazolio nitroazul, zymed) recién preparada y se dejó hasta que apareció el color, cuando fue evidente el revelado y empezó a aparecer señal inespecífica, la reacción se detuvo lavando con agua miliQ estéril.

Western-blot usando peroxidasa

Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham-GE Healthcare Life Sciences, USA), lavadas con TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.6 y 0.1% Tween 20), bloqueadas con 5% de leche descremada (en TBST) e incubadas con el anticuerpo anti-PvLEA6 (1:1000 o 1:2000 en TBST) durante 1-1.5 h. Las membranas fueron lavadas (3 lavados cada uno de 4-5 min.) e incubadas con el anticuerpo secundario (1:30 000 en TBST) (anti-rabbit horse radish peroxidase, Zymed-Life Technologies Co., USA) durante 1-2 h a temperatura ambiente, lavadas con TBST (3 lavados cada uno de 4-5 min.) y reveladas con sustratos de peroxidasa del kit Supersignal West Pico Chemiluminiscent (Pierce Biotechnology, USA and Thermo Fisher Scientific Inc.). Las membranas fueron expuestas a films de rayos X (Kodak, México).

Cuantificación de proteína por el método de microensayo de Bradford

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: a 800 µl de solución proteica se le adicionó 200 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad Protein Assay, dye reagent concentrate, BIO-RAD), se agitó y después de mínimo 5 min a temperatura ambiente, se leyó la Abs_{595nm} (Spectrophotometer, Beckman). Para realizar la curva estándar se prepararon muestras con 2-10 µg de proteína BSA (Bovine Serum Albumin).

Cuantificación de proteína por el método de Lowry

En el día del ensayo se preparó la solución CuSO₄- K-tartrato- Na₂CO₃, que consiste de 1.96% de solución de CuSO₄ al 2%, 1.96% de solución de K-tartrato al 4% y 96.08% de solución Na₂CO₃ (3% de Na₂CO₃ en 0.1M NaOH).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: se mezclaron 200 µl de la solución proteica, y 1 ml de solución CuSO₄-K-tartrato-Na₂CO₃, después de 10 min a

temperatura ambiente se adicionó 100 μ l de reactivo Folin (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2N, sigma) diluido 1:1 con agua, y se agitó vigorosamente 10 s. Después de 30 min a temperatura ambiente se leyó la Abs_{650nm} (Spectrophotometer, Beckman). Para realizar la curva estándar se prepararon muestras con 10-100 μ g de proteína BSA.

Cuantificación de proteína con rojo Ponceau S

Soluciones

Solución TCA: TCA (trichloroacetic acid) al 30%

Solución I: rojo Ponceau S al 4%

Solución II: 2% de sol. I y 98% de sol. TCA

Las muestras se prepararon de la siguiente manera, de acuerdo al artículo de Pesce et al. (Pesce and Strande 1973): se mezcló 500 μ l de solución proteica, con 50 μ l de la solución II, esta mezcla se incubó 10 min. en hielo. Posteriormente se centrifugó 10 min a velocidad máxima en microcentrífuga (Eppendorf), se descartó el sobrenadante. Al precipitado rojo se le agregó 1 ml de NaOH 0.2M, se mezcló y se leyó la Abs_{560nm} (Spectrophotometer, Beckman). Para realizar la curva estándar se prepararon muestras con 10-100 μ g de proteína BSA.

Determinación del coeficiente de extinción para Abs_{280nm}

El cálculo del e (coeficiente de extinción) para Abs_{280nm} , se realizó por el cambio de la Abs_{280nm} de las tirosinas, dependiendo de su exposición al solvente, para lo que se prepararon dos muestras de proteína, una con y otra sin urea.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: 70 μ l de solución proteica con una concentración aproximada de 1.6 mg/ml (calculada por Abs_{280nm} , utilizando $e=0.68$ (calculado a partir de la secuencia de aminoácidos con ProtParam de ExPasy <http://web.expasy.org/protparam/>), se disolvió en 630 μ l de amortiguador K-fosfatos 10 mM o urea 8 M, se incubaron 1 h a 25°C, después se les leyó la Abs_{280nm} (Spectrophotometer, Beckman). De la muestra se calculó el e suponiendo que todos los aminoácidos estaban expuestos al solvente al estar la proteína completamente desnaturalizada, dado que se conoce el e para cada aminoácido, se realizó la suma del e de cada aminoácido que contiene la proteína PvLEA6.

Hidrólisis ácida

La proteína (150 µg) se puso dentro de un tubo de vidrio y se liofilizó en un speed vac (SAVANT), este tubo se puso dentro de una cámara de vidrio. Dentro de la cámara de vidrio se puso 200 µl de HCl 6N, a la cámara se le hizo pasar nitrógeno, después se hizo vacío, esto se repitió 3 veces. La cámara se quedó con vacío y se incubó a 110 °C durante 24 h. El producto de la hidrólisis se liofilizó en un speed vac, posteriormente se analizó por espectrometría de masas.

Marcaje de proteína con ^{15}N

El marcaje de la proteína se realizó básicamente como se indica en Marley et al (Marley, Lu et al. 2001). Se creció un litro de cultivo a 37 °C (216 rpm) a una OD_{600} 0.7, se obtuvo la pastilla centrifugando durante 25 min a 5100 rpm, se lavó con solución de sales y se resuspendió en 250 ml de medio mínimo (el cual contenía el doble de glucosa de lo que indica el artículo de Marley, para tratar de incrementar la expresión de la proteína recombinante), se incubó durante 1 h a 37 °C (230 rpm) para la recuperación de las células y posteriormente se agregó IPTG 0.5 mM concentración final, se continuó la incubación a 37 °C durante 4 h.

Espectroscopia de NMR

Los espectros de NMR en 1D y 2D usando proteína no marcada, se realizaron usando un equipo de 500 MHz Varian Inova con una sonda de 3 mm de tres núcleos. Los experimentos se obtuvieron con supresión de agua DPGSE para todos los casos. Se empleó una ventana espectral de 8000 Hz tanto en detección directa como indirecta. Los experimentos en 2D se obtuvieron 2048 puntos complejos en la dimensión directa y 512 en la indirecta. El TOCSY tuvo un tiempo de mezclado de 80 ms. Se usó 5% de agua deuterada.

Los espectros de NMR usando proteína marcada con ^{15}N , se realizaron en un Espectrómetro de 700 MHz (Agilent VNMR-S), equipado con una sonda criogénica de tres canales y gradientes en el Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM). Espectros de NMR bidimensionales correlacionados en 1H-15N de la proteína PvLEA6 fueron tomados en H₂O y 70% TFE a 298K. Los datos fueron procesados y analizados con NMRPipe (Delaglio, Grzesiek et al. 1995) y CARI (Keller 2004).

Entrecruzamiento con Rutenio

La proteína PvLEA6 se mezcló con buffer de entrecruzamiento (KHPO4 o NaHPO4 15 mM pH8 con o sin NaCl 150 mM), en un volumen de 8 µl, posteriormente se le agregó 1 µl de rutenio (Ru(bpy)₃Cl₂) 12.5 mM, al agregarse el rutenio la muestra se trató en penumbra, posteriormente se agregó 1 µl de persulfato de amonio 25 ó 0.25 mM, se mezcló pipeteando e inmediatamente después se expuso a luz blanca (usando un foco de 75 watts como fuente) filtrada por 2.5 cm de agua durante 0-150 s. Al terminar la exposición a la luz, para detener la reacción de entrecruzamiento se agregó 1 volumen de Laemli 2X con el doble de SDS y β-mercaptoetanol (Tris pH 6.8 125 mM, SDS 8%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 20% y bromofenol blue 0.02%) ó 2 µl de β-mercaptoetanol.

Calorimetría de dilución isotérmica

La disociación del homodímero de la proteína PvLEA6 fue caracterizada usando Calorimetría de dilución isotérmica usando un microcalorímetro MicroCal™ iTC₂₀₀ (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). Antes del experimento la proteína fue dializada extensivamente (3 lavados, cada lavado con 1000 volúmenes de buffer KHPO4 10 mM pH8, el último lavado se dejó toda la noche). Se inyectó en forma secuencial, alícuotas pequeñas de una solución con alta concentración proteica (0.47-0.63 mM de monómero) en la celda del calorímetro (cargada con el buffer del último lavado de la diálisis). De acuerdo a un modelo simple de disociación de dímero (Velazquez-Campoy, Leavitt et al. 2004), el calor medido después de la adición de la inyección i^{th} de volumen dV_i en la celda del calorímetro sería

$$q_i = \Delta H_{disc} [P_2]_{syr} dV_i - \Delta H_{disc} ([P_2]_i - [P_2]_{i-1}) \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) + q_{dil} \quad (1)$$

donde ΔH_{disc} es la entalpia de disociación del dímero, $[P]$ y $[P_2]$ son las concentraciones molares del monómero y dímero, respectivamente y q_{dil} es el calor de dilución de la proteína. La concentración del dímero en la celda de reacción, $[P_2]_i$, y en la jeringa, $[P_2]_{syr}$, están relacionadas a la correspondiente concentración de monómero, $[P_T]$, a través de la constante de disociación:

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_{disc}^{1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \quad (2)$$

Donde K_{disc} es la constante de disociación en equilibrio. ΔH_{disc} y K_{disc} fueron determinadas usando rutinas de regresión no-lineal implementadas en Origin 7.0 (OriginLab, Co., Northampton, MA, USA).

Espectrometría de masas

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados en la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM. La muestra secuenciada fue previamente reducida con ditioneitol (DTT), alquilada con yodoacetamida y digerida en gel con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS compuesto de un cromatograma líquido de micro-flujo con divisor (1/20) (Accela, Thermo-Fisher Scientific Inc.), y un espectrómetro de masas (LTQ-Orbitrap Velos; Thermo-Fisher Scientific Inc.) con un sistema de ionización nano-spray. La cromatografía líquida fue realizada con un gradiente de 10 - 100% de solvente B (acetonitrilo/0.1% ácido acético) durante 120 min en una columna capilar (PicoFrit Proteoep 2 C18 75 μm ID \times 50 mm; New Objective Inc., Woburn, MA, USA) con un flujo de 0.4 ml/min.

Para determinar la masa molecular del monómero de la proteína PvLEA6, la muestra fue purificada por HPLC (Agilent Technologies 1200) equipado con una columna Vydac C18 usando un gradiente lineal de 0 - 60% de acetonitrilo/0.1% ácido trifluoroacético. Subsecuentemente, la muestra fue inyectada en el mismo sistema LC-MS descrito arriba. La masa molecular fue calculada usando el software Xcalibur (Thermo-Fisher Scientific Inc.).

Espectrometría de masas por MALDI-TOF

Se realizó MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry) usando un equipo MALDI-TOF/TOF™ 4800 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA). Para este análisis, las muestras fueron co-cristalizadas con una matrix orgánica de ácido sinapínico (50% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético). Este estudio fue realizado usando modo lineal, 4000 disparos de laser, y un tiempo de retraso de 1500 ns. Resolución de masa: 12, 000, señal/ruido: 20. Las calibraciones internas y externas fueron realizadas usando las mezclas de calibración 3 y 5, respectivamente (Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA).

Capítulo 2: Determinación de actividad de chaperona de RNA en la proteína PvLEA6

INTRODUCCIÓN

Algunas funciones de proteínas intrínsecamente desordenadas

Dado que se predice y en algunos casos se ha demostrado que las proteínas LEA, presentan un alto porcentaje de desorden en su estructura, en seguida presento información concerniente a las PIDs.

El estudio de proteínas con regiones desordenadas o proteínas completamente desordenadas ha permitido asignarles algunas funciones (Tompa 2005). Algunos ejemplos se enumeran a continuación:

- **Cadenas entrópicas:** funcionan como resorte molecular. Ejemplo: dominio PEVK de titina.
- **Chaperonas de RNA o de proteínas:** pliegan moléculas de RNA o proteínas en su estructura funcional. Ejemplo: proteína de respuesta a frío (Csp) de *Bacillus subtilis*.
- **Eectoras:** modulan la actividad de su molécula blanco. Ejemplo: PKI inhibe a la proteína quinasa dependiente de AMPc.
- **Ensambladoras:** ensamblan complejos proteicos. Ejemplo: Caldesmon, involucrado en la polimerización de actina.
- **Secuestradores:** guardan o neutralizan ligandos pequeños. Ejemplo: Caseína, inhibe la precipitación de fosfato de calcio en la leche. desor

Proteínas desordenadas que unen ácidos nucleicos

Durante la caracterización de las proteínas intrínsecamente desordenadas, se encontró que varias de estas podían unir ácidos nucleicos. En la mayoría de los casos las proteínas desordenadas sufren una transición de desorden a orden al unir el DNA o RNA. En seguida se presentan algunos ejemplos:

Proteínas con regiones desordenadas que unen DNA:

Proteína represora de Trp: es una proteína mayoritariamente estructurada, pero contiene algunas regiones desordenadas, una de estas regiones se ordena en una hélice al unirse al DNA (Sandhu and Dash 2007).

Mlh1: esta proteína contiene una región desordenada que une dos dominios globulares terminales. Se ha determinado que la región desordenada es necesaria para la unión al DNA (Plys, Rogacheva et al. 2012).

HMGI(Y): esta proteína contiene tres dominios de unión a DNA, que interactúan con el surco menor del DNA. Se ha observado por RMN que esta proteína es completamente desordenada y se estructura al unirse al DNA (Huth, Bewley et al. 1997).

Proteínas con regiones desordenadas que unen RNA:

RNAsa E: contiene una región estructurada y una desordenada, en la región desordenada contiene motivos ricos en arginina que unen el RNA.

Proteína ribosomal S15: contiene varias regiones con alta flexibilidad (molten globule) que se vuelven estructuradas cuando interactúan con el RNA para formar la subunidad ribosomal 30S.

GRP (Glycine Rich Proteins) clase IV: son proteínas con regiones ricas en glicina que contienen motivos para unir RNA.

APN (activation protein N of phage lambda): esta proteína en solución se encuentra completamente desordenada, pero la región que une RNA sufre una transición de desorden a orden cuando interactúa con el RNA.

Algunas de las proteínas que unen ácidos nucleicos presentan alto contenido de aminoácidos cargados y glicinas; dado que las proteínas LEA también presentan estas características, existe la posibilidad de que algunas de ellas sean capaces de unirse a ácidos nucleicos. Evidencia de ello ha sido reportada para algunas proteínas LEA, como es el caso de las proteínas LEA del grupo 7 o proteínas ASR (Abscissic acid Stress and Ripening), las cuales se han localizado en núcleos y citoplasma, y se ha determinado su unión a ciertas regiones de DNA, de tal forma que se ha sugerido que están involucradas en modular la expresión genética así como la topología del DNA (Carrari, Fernie et al. 2004, Kalifa, Gilad et al. 2004). También se ha demostrado que una proteína LEA (de un nuevo grupo de proteínas LEA) de trigo, une DNA de doble cadena (Sasaki, Christov et al. 2014). El análisis computacional de una proteína LEA del grupo 1 predice que ésta tiene similitud con proteínas que unen DNA o RNA (Rajesh and Manickam 2006, Wu, Gong et al. 2013).

Se conoce poco sobre los efectos que la baja disponibilidad de agua ejerce sobre los ácidos nucleicos, como por ejemplo el cambio de la forma B a la forma A del DNA inducido por la baja disponibilidad de agua; sin embargo, es posible imaginar que así como estos cambios afectan la estructura y función de las proteínas, también pudieran afectar la

organización, estructura y función de los ácidos nucleicos, DNA o RNA. También es posible que proteínas con las propiedades de las hidrofílicas y, entre ellas las proteínas LEA, al unirse al DNA o RNA puedan protegerlo de los efectos dañinos de este estrés y/o actuar como moduladores de sus funciones, modulando la expresión de genes o la topología de la cromatina, como se menciona arriba.

CHAPERONAS DE RNA

Aunque la mayoría de las chaperonas de RNA descritas a la fecha son proteínas globulares, se han reportado algunas que presentan altos niveles de desorden estructural, o bien, regiones desordenadas. En seguida se mencionan algunas de sus funciones y de sus características.

Existen varias definiciones de una chaperona de RNA, y en seguida se muestran algunas:

- Una chaperona de RNA es una proteína que facilita rearrreglos conformacionales de moléculas de RNA que están incorrectamente plegadas para generar estructuras activas (Russell 2008).

- Una chaperona de RNA promueve el plegamiento del RNA al aflojar la estructura de RNA incorrectamente plegado o impidiendo su formación (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

- Una chaperona de RNA es una proteína que une de forma transitoria y no específica RNA y arregla conformaciones incorrectamente plegados (Rajkowitsch, Chen et al. 2007).

Se han propuesto los siguientes mecanismos de acción para las chaperonas de RNA:

- ❖ Rompen interacciones RNA-RNA y aflojan estructuras de RNA (Rajkowitsch, Chen et al. 2007).
- ❖ Unen y estabilizan intermediarios de cadena sencilla (Russell 2008).
- ❖ Rompen contactos, en un proceso que consume energía. Este mecanismo se propone para las proteínas DExD/H-box, las cuales son ATPasas (Russell 2008).
- ❖ Para las chaperonas de RNA que pertenecen al grupo de las PID, se ha propuesto que éstas le transfieren entropía al RNA para que se despliegue, y así pueda adoptar una conformación adecuada a la función que deba realizar (Tompa and Csermely 2004).

Varias proteínas se han caracterizado con la actividad de chaperona de RNA, algunas de las cuales contienen altos porcentajes de desorden, en tanto que otras son estructuradas.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de chaperonas de RNA que contienen altos porcentajes de desorden y de algunas que son estructuradas:

Chaperonas de RNA con altos porcentajes de desorden:

- La proteína de **nucleocápside p7 (NCp7)** del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), hace los siguientes arreglos de ácido nucleico: dimerización del RNA viral, unión del primer de tRNA al RNA genómico para iniciar transcripción reversa, ruptura de estructuras en el templado durante transcripción reversa y desplazamiento de la hebra nueva de DNA negativa, para continuar la transcripción reversa. NCp7 contiene un 48% de desorden (Rein, Henderson et al. 1998, Tompa and Csermely 2004).
- **StpA** de *E. coli* funciona como un regulador transcripcional (Russell 2008). StpA promueve unión de hebras de RNA, desplazamiento de hebras de RNA, así como splicing *trans* y *cis* de los intrones del grupo I (Mayer, Rajkowitsch et al. 2007). StpA contiene un 73.13% de desorden (Tompa and Csermely 2004).
- **CspA** (Cold Shock protein A) y **CspE** (Cold Shock protein E) de *E. Coli*. CspA desestabiliza estructura secundaria de RNA y lo hace susceptible a ribonucleasas (Jiang, Hou et al. 1997). CspE abre dobles cadenas de RNA (Phadtare, Inouye et al. 2002, Phadtare and Severinov 2005). CspE es indispensable para anti-terminación de la transcripción y aclimatación al frío (Phadtare, Inouye et al. 2002). La familia de proteínas CspA tiene actividad de anti-terminación de la transcripción (Bae, Xia et al. 2000). Recientemente se reportó que la expresión constitutiva de la proteína CspA, confirió tolerancia a sequía en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, arroz y maíz. (Castiglioni, Warner et al. 2008). CspA contiene un 22% de desorden (Tompa and Csermely 2004)
- **hnRNPA1** facilita la renaturalización de DNA y de RNA, probablemente uniendo cadenas sencillas y tal vez juntándolas a través de múltiples sitios en la proteína o por multimerización de la proteína (Russell 2008). Las proteínas hnRNP están presentes en el núcleo de las células de mamífero y se piensa que se asocian con RNAs durante su biogénesis (Russell 2008). hnRNPA1 contiene un 35% de desorden (Tompa and Csermely 2004).
- **S12** es una proteína ribosomal que tiene la capacidad de facilitar el splicing de intrones del grupo I *in vitro*, posiblemente promoviendo la estructura terciaria catalíticamente activa (Coetzee, Herschlag et al. 1994, Russell 2008). S12 contiene un 61% de desorden (Tompa and Csermely 2004).

Chaperonas de RNA con estructura definida:

- **Hfq** (Host Factor I) de *E. coli* promueve la unión de RNAs pequeños regulatorios a su RNAm blanco (Russell 2008).
- Proteínas **DExD/H-box**, son ATPasas con alta similitud a helicasas de DNA. Estas proteínas han sido asociadas con transcripción, splicing, biogénesis del ribosoma, exporte, traducción y degradación del RNA. Se ha propuesto que su función es acoplar la energía de hidrólisis de ATP para acelerar transiciones estructurales en el RNA. Se ha mostrado que se activa la hidrólisis de ATP al unir el RNA (Cordin, Banroques et al. 2006, Russell 2008).

ENSAYOS UTILIZADOS PARA PROBAR FUNCIÓN DE CHAPERONA DE RNA

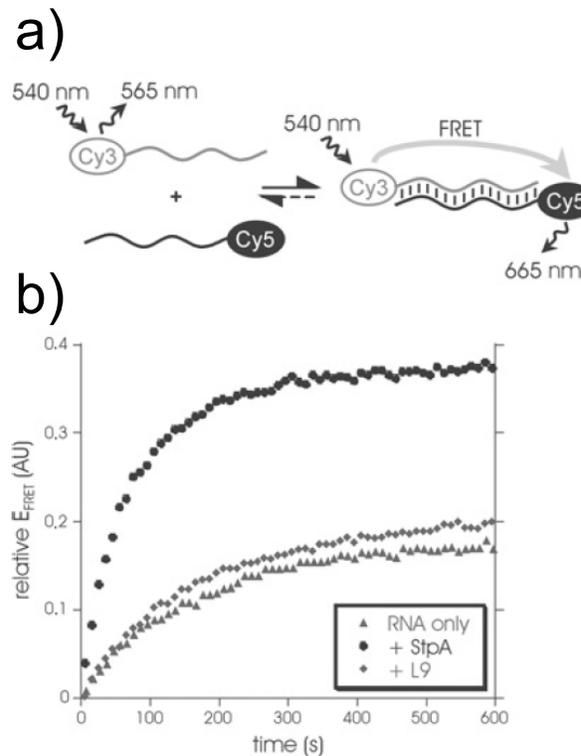
En esta sección se presentan los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se han usado para determinar la actividad de chaperona de RNA.

ENSAYOS *IN VITRO*

Hibridación de cadenas (Fig. 30 a y b): se prueba si la proteína puede incrementar la reacción de hibridación de cadenas de RNA. Se usan RNAs de 21 nt de largo marcados con un fluoróforo: si se forma el dúplex los dos fluoróforos llegan a estar lo suficientemente cercanos para que se produzca fluorescencia por la transferencia de energía por resonancia, mejor conocido como *FRET* (fluorescence resonance energy transfer). Los RNAs se incuban en presencia o ausencia de la proteína a probar para determinar si la presencia de ésta incrementa la reacción de hibridación de las cadenas. La reacción se puede monitorear con una resolución de milisegundos (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

Desplazamiento de cadenas (Fig. 30 c y d): se usa un dúplex de RNA de 21 nt marcado con fluoróforos en los extremos, y una de cadena de RNA complementaria no marcada, la cual funciona como competidor. Se mide la reacción de desplazamiento de cadena en presencia o ausencia de la proteína para determinar si la proteína puede aumentar la reacción (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

RNA annealing



RNA strand displacement

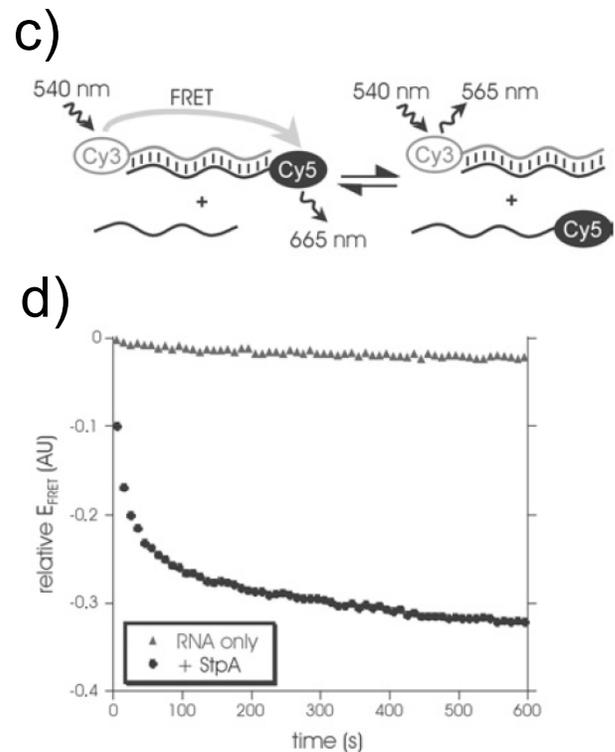


Figura 30. Ensayos para probar actividad de chaperona de RNA. a y b) Ensayo de unión de cadenas de RNA. c y d) Ensayo de desplazamiento de cadena de RNA. Figura modificada de Rajkowitsch, Semrad et al. 2005.

Formación de dúplex extendido acoplado con el corte por ribozima (Fig. 31 a): la dimerización del genoma del VIH es iniciada por la interacción de dos tallos asa complementarios, seguido por la conversión de esta estructura en un dúplex extendido. Esta conversión requiere energía dado que se tiene que abrir el tallo de la estructura tallo-asa. Esta reacción no puede ser detectada a bajas temperaturas a menos que la proteína NCp7 derivada de la proteína de la nucleocapside esté presente. Un ensayo para monitorear cuantitativamente esta conversión se diseñó de tal manera que cuando se forma el dúplex extendido se conforma una ribozima, la cual corta una de las hebras del RNA. La reacción se hace irreversible al cortar una de las cadenas (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

Splicing en cis de intrón tipo I (Fig. 31 b): el *splicing* de un intrón tipo I depende del plegamiento de la cadena de RNA en una conformación tridimensional definida. *In vivo*, algunas proteínas normalmente asisten y promueven el plegamiento del RNA, con lo que la reacción de *splicing* es rápida y eficiente. En contraste, en ausencia de los factores proteicos que asisten esta reacción de *splicing in vitro*, la reacción es lenta e ineficiente debido al plegamiento incorrecto del RNA. Un RNA transcrito *in vitro* a partir del gen de la timidilato

sintasa del bacteriofago T4 se usa para monitorear la reacción de *splicing*, la cual se inicia por la adición de GTP que funciona como co-factor de la reacción de *splicing*. En la ausencia de proteínas, la mayoría de las moléculas de RNA están en una conformación de reacción lenta. La adición de chaperonas de RNA a la reacción, baja significativamente la proporción de moléculas en conformación de reacción lenta e incrementa las moléculas en conformación de reacción rápida (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

Aceleración de la actividad de la ribozima ‘hammerhead’ (Fig. 31 c): otro sistema modelo que permite determinar la actividad de chaperona de RNA de una proteína es la aceleración de la reacción de corte de la ribozima *hammerhead*. En este sistema, la hibridación del RNA sustrato, el desplegamiento de las cadenas de RNA y la liberación del producto de corte son pasos limitantes. La presencia de una chaperona de RNA puede ayudar a la ribozima a superar estas barreras y de esta forma incrementar la velocidad de la reacción. Dado que las velocidades individuales y las constantes de equilibrio para la reacción de la ribozima se conocen bien, este modelo permite determinar si las proteínas chaperonas de RNA participan en la unión o intercambio de cadenas de RNA (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

Splicing en trans de intrón tipo I (Fig. 31 d): de manera similar al ensayo de *splicing* en *cis*, el *splicing in vitro* del intrón del grupo I del gen de la timidilato sintasa se determina a través de un ensayo de *trans-splicing*. La construcción de *splicing* se divide en dos: la construcción H1 consiste en el exón 1 y 131 nt de la parte 5' del intrón, en tanto que la construcción H2 consiste de 147 nt del resto del intrón y una parte del exón 2 (23 nt). Para medir la actividad de chaperona de RNA de una proteína, se combinan ambos RNAs y, la reacción de *splicing in vitro* se inicia por la adición de GTP. La reacción de *trans-splicing* disminuye significativamente a 37°C y, sólo a altas temperaturas (55°C) puede ocurrir eficientemente, sugiriendo que el plegamiento incorrecto disminuye la reacción de *trans-splicing* a bajas temperaturas. La adición de una proteína con actividad de chaperona de RNA favorece el plegamiento correcto y produce un intrón competente para el *splicing*, de tal forma que como resultado se obtiene un incremento en la reacción de *splicing* (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

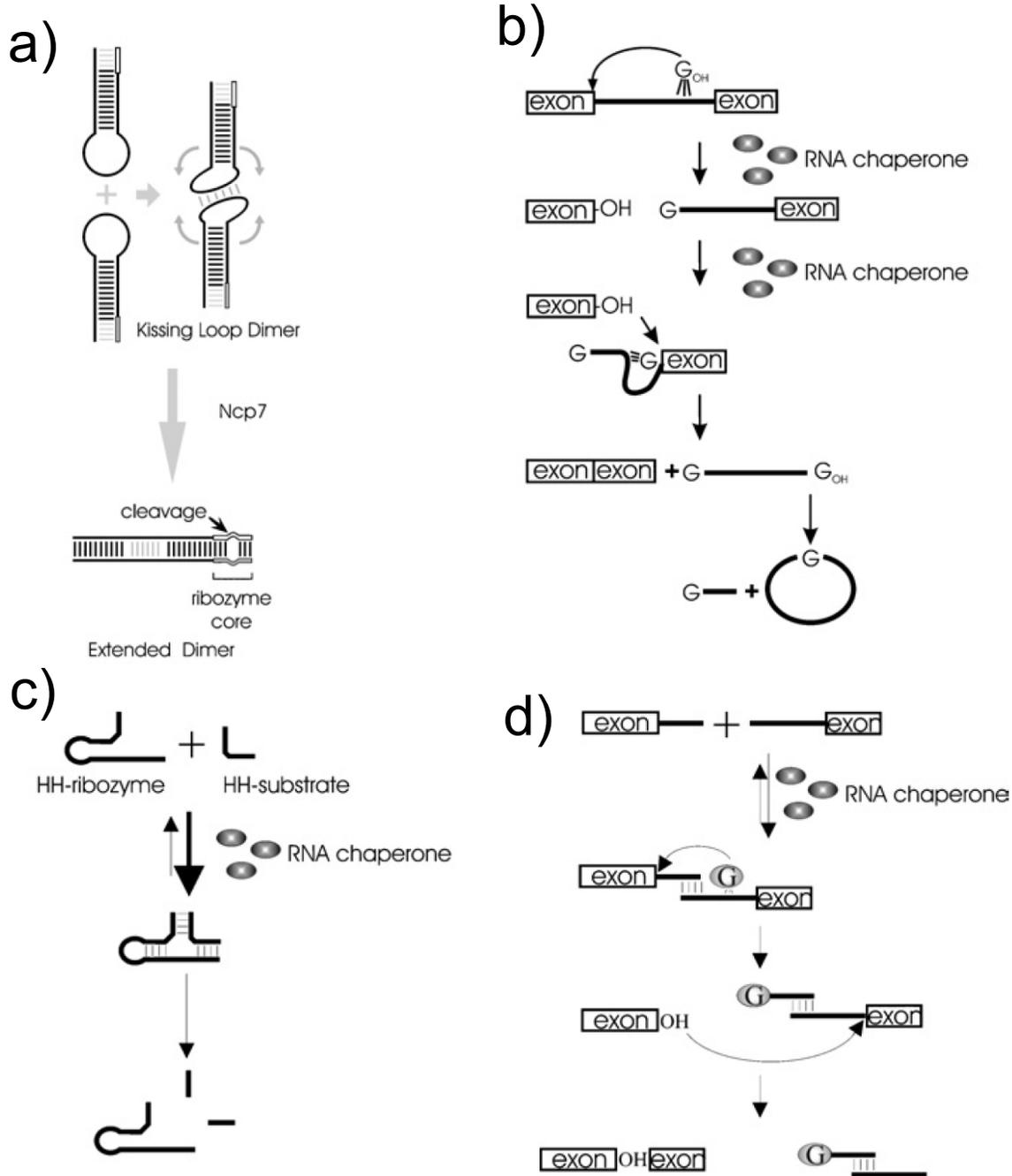


Figura 31. Ensayos *in vitro* para determinar actividad de chaperona de RNA. a) Formación de dúplex extendido acoplado con corte de ribozima. b) *Splicing* en *cis* de un intron tipo I. c) Ensayo de la ribozima *hammerhead*. d) *Splicing* en *trans* de un intron tipo I. Figura modificada de (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005)

ENSAYOS *IN VIVO*

Trampa de plegamiento (Fig. 32 a): el intrón del grupo I del gen de la timidilato sintasa del bacteriófago T4 de *E. coli* realiza *auto-splicing in vitro* y con mayor eficiencia *in vivo*. El intrón se encuentra dentro de un gen que codifica para una proteína; puesto que la transcripción, el *splicing* y la traducción están acoplados, el desacoplamiento de la traducción resulta en un decremento del *splicing in vivo*. Esta disminución en el *splicing* se interpretó como un resultado de la formación de una trampa de plegamiento debida a interacciones entre las secuencias del exón y del intrón que interfieren con el plegamiento del intrón. El plegamiento correcto de estos pre-RNAs atrapados puede realizarse al sobre-expresar genes que codifican para proteínas con actividad de chaperona de RNA en las bacterias con la construcción reportera (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

Ensayo de anti-terminación de la transcripción (Fig. 32 b): una cepa de *E. coli* contiene la construcción conformada por el gen *cat* (codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa) precedido por un terminador (*trpL*) independiente de rho. La transcripción del terminador resulta en la formación de una estructura tallo-asa en el RNA transcrito. La formación de esta estructura en el transcrito causa terminación de la transcripción; en consecuencia, el gen *cat* no se expresa. La proteína con una supuesta actividad de chaperona de RNA se sobre-expresa en la cepa de *E. coli*, de tal manera que si ésta deshace la estructura tallo-asa, tiene como resultado el que la transcripción continúe y que, por tanto, el gen *cat* se exprese. Esto tiene como consecuencia que las bacterias adquieran resistencia a cloranfenicol (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005).

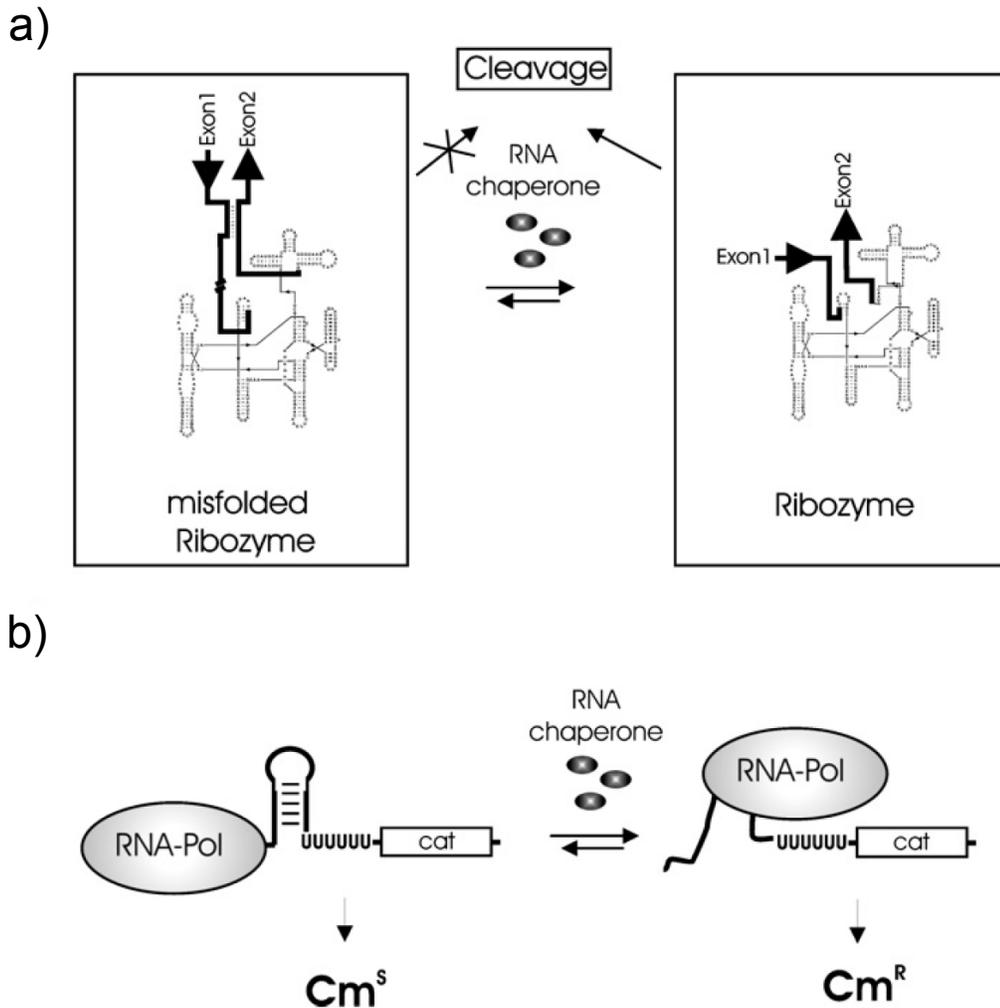


Figura 32. Ensayos para probar actividad de chaperona de RNA. a) Trampa de plegamiento. b) Ensayo de anti-terminación de la transcripción. Figura modificada de (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005)

Ensayo de complementación de una cepa cuádruple mutante en proteínas chaperonas de RNA: la cepa BX04 es una cepa de *E. coli* mutante en los cuatro genes que codifican a las chaperonas de RNA CspA, CspB, CspE y CspG. Esta cepa presenta una disminución en la velocidad de crecimiento a 15°C. Se ha reportado que proteínas con actividad de chaperona de RNA pueden complementar el fenotipo de esta cepa (Nakaminami, Karlson et al. 2006).

ANTECEDENTES

Durante la caracterización funcional de la proteína PvLEA6 se probó si era capaz de proteger la actividad enzimática de la proteína LDH (Lactato Deshidrogenasa) en ensayos de deshidratación parcial *in vitro*, como ocurrió con proteínas LEA de otros grupos (Reyes,

Rodrigo et al. 2005). En las condiciones probadas no fue posible detectar actividad protectora. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales se detectó unión a RNA de esta proteína, sugirieron que la proteína PvLEA6 era capaz de interactuar con RNA, a pesar de que no muestra los dominios típicos descritos como de unión a RNA como se ha observado con otras proteínas (M. Battaglia, datos no publicados). De esta observación, del hecho de que esta proteína es incapaz de prevenir la pérdida de actividad enzimática bajo condiciones de deshidratación parcial *in vitro*, y de los reportes que demuestran que varias chaperonas de RNA contienen altos porcentajes de desorden, propusimos la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

Las proteínas LEA de la familia 6 tienen actividad de chaperona de RNA bajo condiciones de déficit hídrico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína PvLEA6 tiene actividad de chaperona de RNA, utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Determinar si la proteína PvLEA6 une RNA
- II. Determinar y analizar actividad de chaperona de RNA *in vitro*
- III. Determinar actividad de chaperona de RNA *in vivo*

RESULTADOS

La proteína que se utilizó en todos los ensayos *in vitro*, fue la proteína PvLEA6 recombinante pura, caracterizada en el capítulo 1.

Ensayo de retardo en gel nativo

Para determinar si la proteína PvLEA6 tiene la capacidad de unir RNA, se realizó un ensayo de retardo en gel nativo. Se utilizó el RNA 3'NOS (secuencia del 3' UTR del gen NOS (*Nopalina Sintasa*, ver apéndice), dado que en el laboratorio se contaba con este RNA.

Se probaron diferentes proporciones de proteína a RNA, manteniendo la cantidad de RNA constante en todas las muestras. Como control negativo se utilizaron las proteínas lisozima y proteinasa K. Dado que en un ensayo preliminar realizado en el laboratorio parecía que la poli-lisina estaba uniendo RNA y, puesto que en la literatura se ha reportado que la poli-lisina puede unir ácidos nucleicos, esta se utilizó como control positivo. Como amortiguador de unión se usó el amortiguador BB (ver Materiales y métodos). En la Figura 33 se muestra el resultado.

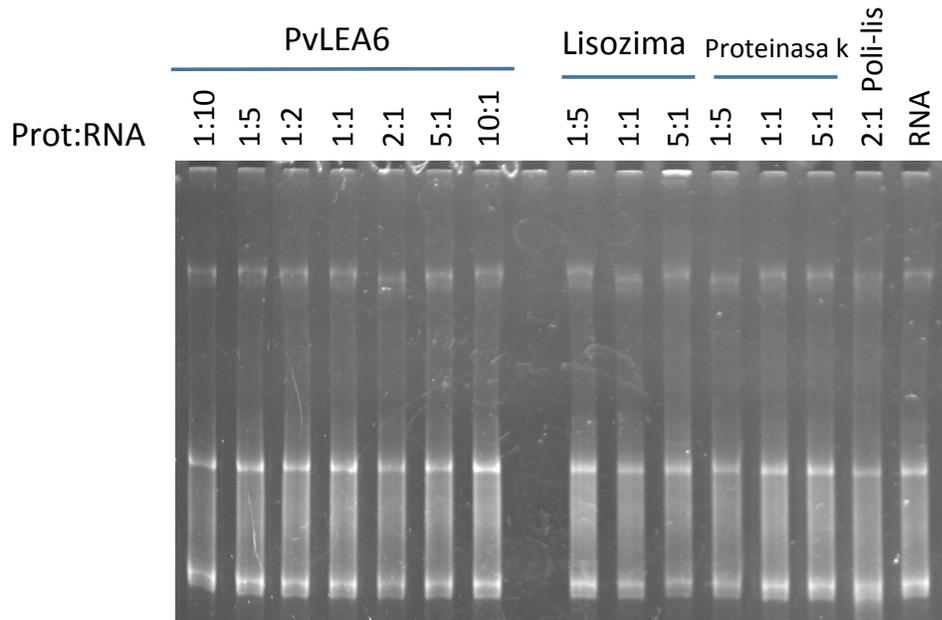


Figura 33. Retardo en gel nativo usando el RNA 3'NOS. El RNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio .

Se observa que la poli-lisina no unió el RNA debido a las siguientes posibilidades: 1) la poli-lisina estaba degradada, 2) la cantidad de proteína que se puso no fue suficiente, 3) no unió este RNA en particular, 4) el ensayo no se realizó correctamente o 5) la resolución del método no permitió detectar el retardo del RNA, es decir que el cambio en la migración del RNA haya sido tan poca que no se alcanza a apreciar claramente en este gel. Puesto que el supuesto control positivo no funcionó como tal, este ensayo no resultó confiable del todo. En la muestra 5:1 (prot:RNA) con lisozima, en el pozo se observa RNA que no entró al gel; esto se podría deber a que la lisozima se precipitó y unió una parte de RNA. Puesto que en el resto de las muestras no se observó retardo en la migración del RNA, se realizaron otros ensayos usando otro amortiguador (el buffer BR, ver Materiales y métodos), el cual también se usa para realizar ensayos de retardo en gel nativo; sin embargo, tampoco se observó retardo (datos no mostrados).

Se consideró que una posible explicación a este resultado podría haber sido el tamaño, ya que el RNA fue de 300 nt, por lo que se realizó el ensayo usando un RNA de 100 nt (transcrito a partir del plásmido pKS, ver apéndice), y se probó el amortiguador BR y el amortiguador BASR1 (ver Materiales y métodos) con o sin zinc. En la Figura 34 se muestra el resultado.

Xu, D., X. Duan, B. Wang, B. Hong, T. Ho and R. Wu (1996). "Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice." Plant Physiol **110**(1): 249-257.

Xue, B., A. K. Dunker and V. N. Uversky (2012). "Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life." J Biomol Struct Dyn **30**(2): 137-149.

Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero (1982). "Living with water stress: evolution of osmolyte systems." Science **217**(4566): 1214-1222.

Zhang, A., V. Derbyshire, J. L. Salvo and M. Belfort (1995). "Escherichia coli protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly in vitro." Rna **1**(8): 783-793.

Zhang, L., A. Ohta, M. Takagi and R. Imai (2000). "Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in Saccharomyces cerevisiae revealed functional divergence among LEA proteins." J Biochem **127**(4): 611-616.

Zimmerman, S. B. and S. O. Trach (1991). "Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli." J Mol Biol **222**(3): 599-620.

En las muestras 1:1000 (RNA:proteína) con proteína PvLEA6 se observa una banda (indicada con la flecha) más intensa que en las muestras con sólo RNA, esto podría deberse a que la proteína PvLEA6 actuara como una chaperona de RNA favoreciendo una conformación en el RNA (dicha conformación migraría en esa banda). La lisozima igual que en el gel anterior, se precipitó y el RNA se quedó en el pozo.

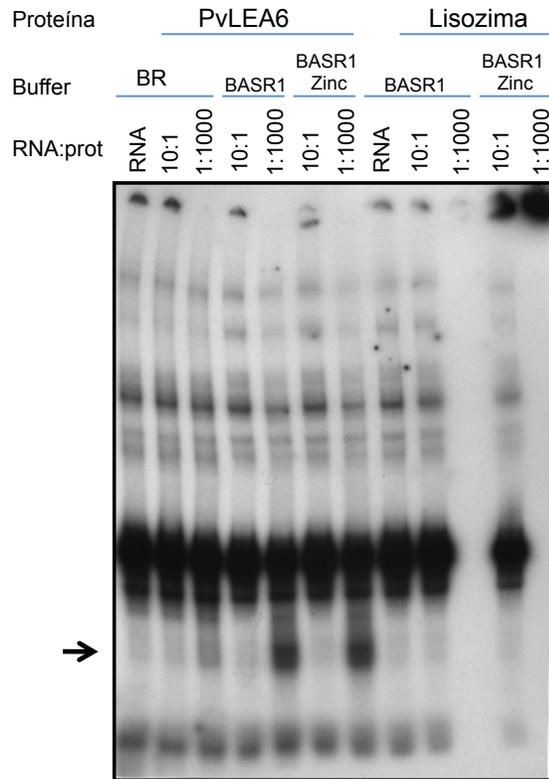


Figura 34. Retardo en gel nativo usando un RNA de 100 nt y los amortiguadores BR y BASR1 con o sin zinc. Se usó RNA marcado radiactivamente.

Para corroborar el resultado de la Figura 34, el ensayo se volvió a realizar usando el buffer BASR1 y probando varias proporciones de RNA:proteína, para ver si se observaba un gradiente en la intensidad de la banda conforme se incrementaba la cantidad de proteína PvLEA6. Como se observa en la Figura 35, todas las muestras con proteína PvLEA6 muestran el mismo patrón que las muestras con sólo RNA; es decir, no se observa una banda que aumente su intensidad conforme se incrementa la cantidad de proteína, sugiriendo que la proteína PvLEA6 no une RNA. La banda mas intensa (indicada con la flecha) que se observó en el gel anterior (Fig. 34), podría deberse a algún contaminante que se encontraba en la solución proteica. Igualmente que en el gel anterior, la lisozima se precipitó y el RNA se quedó en el pozo.

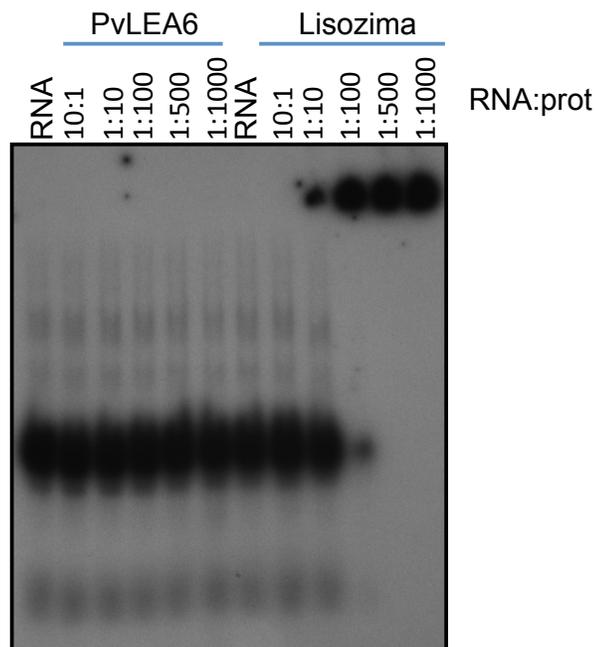


Figura 35. Ensayo de retardo en gel nativo, usando un RNA de 100 nt marcado radiactivamente.

Ensayo de entrecruzamiento con luz UV

Otro método utilizado para determinar la unión a RNA de una proteína es el ensayo de entrecruzamiento con luz UV (ver Materiales y métodos), en el que se utilizó un RNA de 100 nt, y para el que se probaron diferentes proporciones de RNA:proteína. La cantidad de RNA se mantuvo constante en todas las muestras, excepto en la muestra 14, en la que se agregó 5 veces menos de RNA. Después del entrecruzamiento todas las muestras fueron tratadas con RNAsa, excepto la muestra del carril 14. La Figura 36 muestra el resultado, en donde se aprecia que en la muestra de RNA tratado con RNAsa (carril 6) se genera una banda que migra cerca del marcador de 15 kDa, esta misma banda se observa en las muestras que contienen la proteína PvLEA6, la cual desaparece cuando la muestra es tratada con proteinasa K (carril 12). En la muestra con solo RNA (es decir sin proteína PvLEA6) tratado con RNAsa, la misma banda desapareció cuando la muestra se trató con proteinasa K (carril 13), sugiriendo que esa banda corresponde a la RNAsa, la cual tiene un peso molecular de 14 kDa, pero podría estar migrando por arriba de 15 kDa por que está uniendo el RNA.

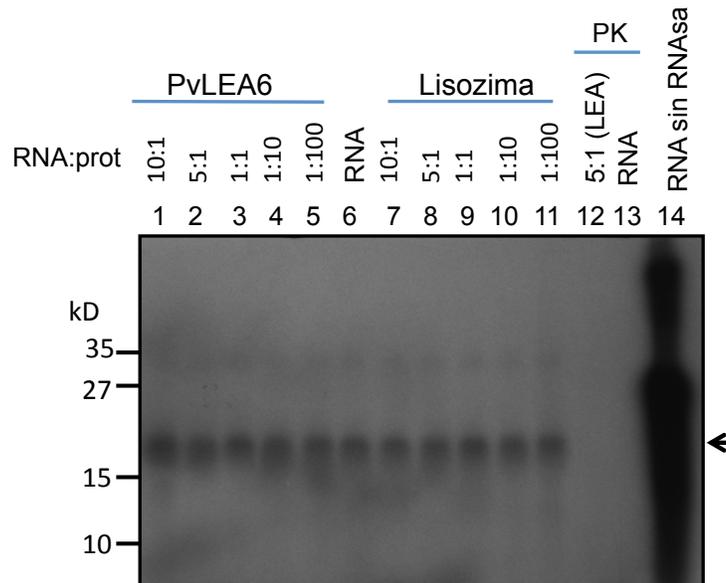


Fig. 36. Ensayo de entrecruzamiento con luz UV. Se usó un RNA de 100 nt, marcado radiactivamente.

Se volvió a hacer el ensayo de entrecruzamiento usando otro RNA (el RNA 3'NOS, aproximadamente 300 nt del 3' UTR del gen NOS, ver apéndice). La cantidad de RNA se mantuvo constante en todas las muestras. En la Figura 37 se muestra el resultado. Igual que en el gel anterior, en la muestra de RNA tratado con RNAsa (carril 8) se observa una banda alrededor de los 15 kDa. Esta banda también se observa en las muestras que contienen proteína PvLEA6 o lisozima, y además esta banda desaparece cuando la muestra es tratada con proteinasa K (carriles 6, 7 y 13). Al poner RNA no marcado radiactivamente (carriles 4, 5, 11 y 12), 5 ó 10 veces más que el RNA marcado radiactivamente, se observa que disminuye la intensidad de la banda, es decir hay competencia entre el RNA marcado y el RNA no marcado radiactivamente; esto también indica que la banda se debe a una interacción entre una proteína que está uniendo RNA y no a un fragmento de RNA solo, es decir sin estar unido a una proteína. Estos resultados al igual que el ensayo anterior sugieren que la banda que se observa es la RNAsa uniendo RNA.

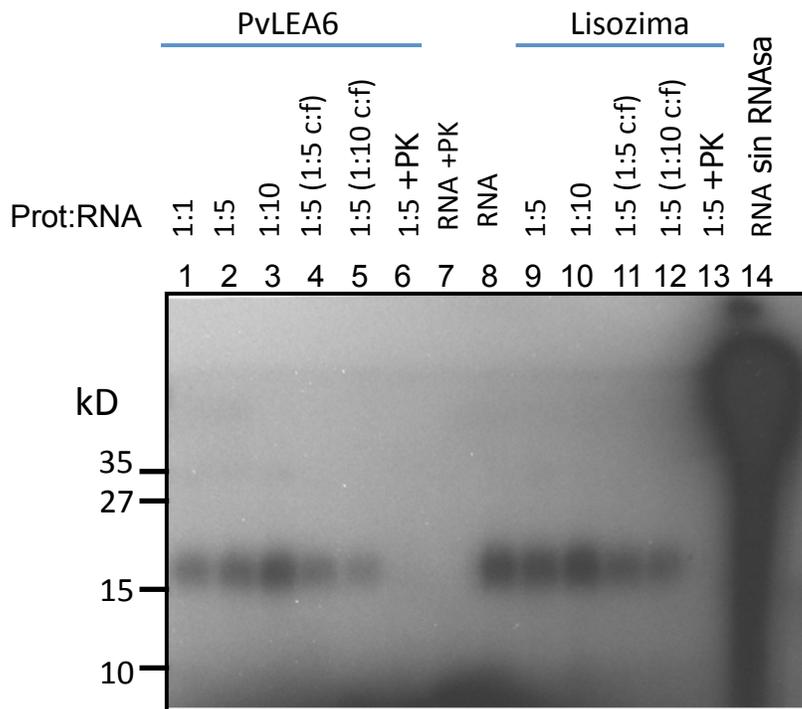


Fig. 37. Ensayo de entrecruzamiento con luz UV, usando el RNA 3'NOS. En la parte superior del gel se muestran las proporciones molares de proteína a RNA. PK: Proteinasa K, c:f proporción molar de RNA radiactivo a RNA no radiactivo

Los resultados de estos ensayos sugieren que en las condiciones que se probaron la proteína PvLEA6 no une RNA, y hace falta probar otras condiciones y otros RNAs. Otra posibilidad es que la PvLEA6 se haya unido al RNA y que el complejo migre a la misma altura que el correspondiente al de la RNAsa debido a que el peso molecular aparente es similar al de la RNAsa; de ser el caso ambas señales quedarían incluidas en la misma banda.

Ensayo de procesamiento en *trans* (*trans-splicing*)

Los intrones de tipo I son ribozimas que se auto-procesan y se ha reportado que algunas proteínas con actividad de chaperona de RNA aumentan el procesamiento de estos intrones (Galloway Salvo, Coetzee et al. 1990, Coetzee, Herschlag et al. 1994). Uno de los ensayos de procesamiento en *trans* (*trans-splicing*) que se ha usado para determinar si una proteína tiene actividad de chaperona de RNA consiste en incubar dos mitades de un intrón tipo I (ver Fig. 38) en presencia o ausencia de la proteína en estudio para determinar si la presencia de la proteína aumenta la reacción de procesamiento en *trans*.

Para el análisis de la reacción de procesamiento en *trans* se obtuvo cDNA (con el oligo 3' exón 2) y se realizó una PCR semi-cuantitativa con los oligos 5' exón 1 y 3' exón 2. En

caso de llevarse a cabo la reacción de procesamiento en *trans* se produciría un fragmento de 560 pb (pares de bases) (Fig. 38).

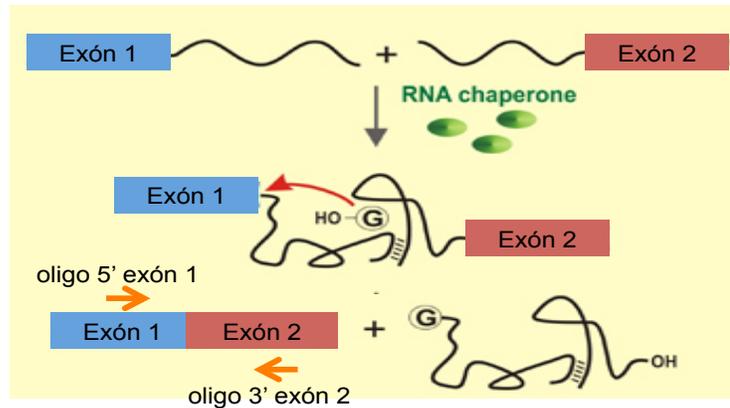


Figura 38. Ensayo de procesamiento en *trans*. La presencia de una proteína con actividad de chaperona de RNA incrementa la reacción de procesamiento en *trans*. Para el análisis de la reacción de procesamiento del RNA se obtuvo cDNA para posteriormente llevar a cabo una PCR con los oligos 5' exón 1 y 3' exón 2 (marcados como flechas naranjas), con los que se amplifica un fragmento de 560 pb si la reacción de procesamiento en *trans* sucede.

Para hacer una semi-cuantificación de la reacción de procesamiento en *trans*, se realizó una PCR semi-cuantitativa, es decir con diferente número de ciclos (Fig. 39), con lo que se determinó que con 20 ó 25 ciclos aún no se satura la señal y es posible observar diferencias entre las muestras. Para realizar la PCR se utilizó 1 μ l de cDNA de la muestra correspondiente al control positivo del ensayo.

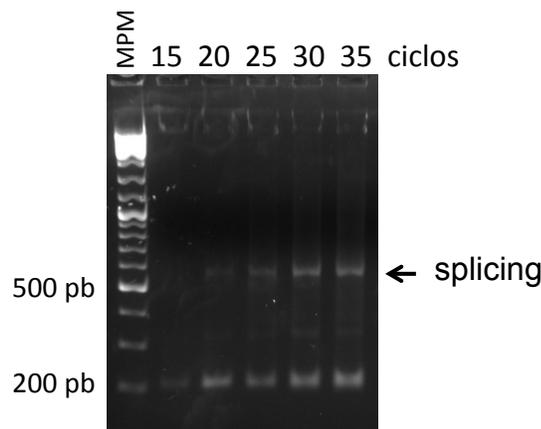


Fig. 39. PCR semi-cuantitativa. Se realizó una PCR con diferente número de ciclos. MPM: marcador de peso molecular. La flecha indica el producto esperado para un procesamiento en *trans* (560 pb).

En el ensayo de procesamiento en *trans*, las muestras con la proteína PvLEA6 y el control negativo se incubaron a 37°C y, el control positivo a 55°C (Fig. 40), dado que se ha mostrado que la reacción se realiza ineficientemente a 37 °C y eficientemente a 55°C

(Galloway Salvo, Coetzee et al. 1990). Las muestras se analizaron con una PCR semi-cuantitativa usando 20 ó 25 ciclos.

En el caso de la muestra correspondiente al control negativo (c(-)) se obtuvo un producto de la reacción de procesamiento en *trans* en cantidades similares a las obtenidas en la muestra control positivo (c(+)), por lo que se pensó en disminuir la reacción de procesamiento en *trans* en el c(-) para tratar de detectar si la presencia de la proteína PvLEA6 aumentaba la reacción de procesamiento en *trans*.

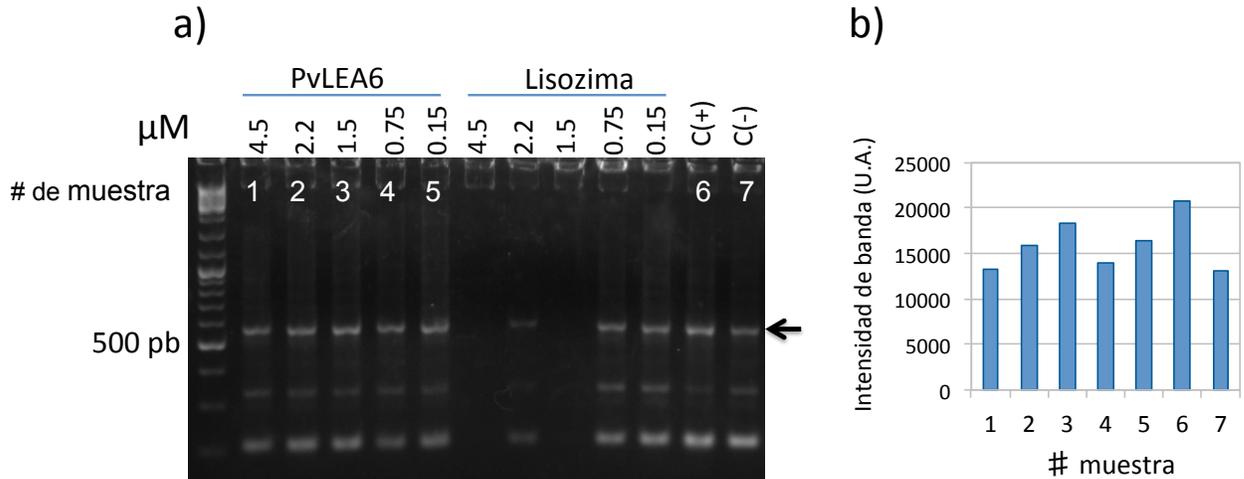


Figura 40. Ensayo de procesamiento en *trans*. a) PCR de las muestras sometidas a procesamiento en *trans*. C(+): reacción de procesamiento en *trans* incubada a 55°C, C(-): reacción de procesamiento en *trans* incubada a 37°C. b) Cuantificación de la intensidad de la banda (con el programa Imagequant) de las muestras de procesamiento en *trans* con la proteína PvLEA6 (muestras 1-5), el control positivo (punto 6 en la gráfica) y el control negativo (punto 7 en la gráfica). La flecha indica el fragmento producido por procesamiento en *trans*, que es de 560 pb.

Se pensó que el control negativo estaba dando señal casi tan alta como el control positivo, debido a que la reacción no se estaba deteniendo completamente después de la incubación a 37 °C, por lo que para tratar de detener la reacción completamente se probó lo siguiente: después de la incubación a 37 °C, la mezcla se transfirió a hielo, posteriormente, se agregó EDTA (0.25 mM concentración final), dado que es necesaria la presencia de Mg²⁺ para que la estructura del intrón sea estable, (Galloway Salvo, Coetzee et al. 1990); la muestra se incubó por 2 min a 78 °C y en seguida se transfirió a hielo para después guardar las muestras a -20 °C. La Figura 41 muestra un resultado característico de estos ensayos de procesamiento en *trans*. Como se observa, el control negativo produjo señal más baja que el control positivo. Las muestras que contuvieron proteína produjeron una señal similar a la del control negativo.

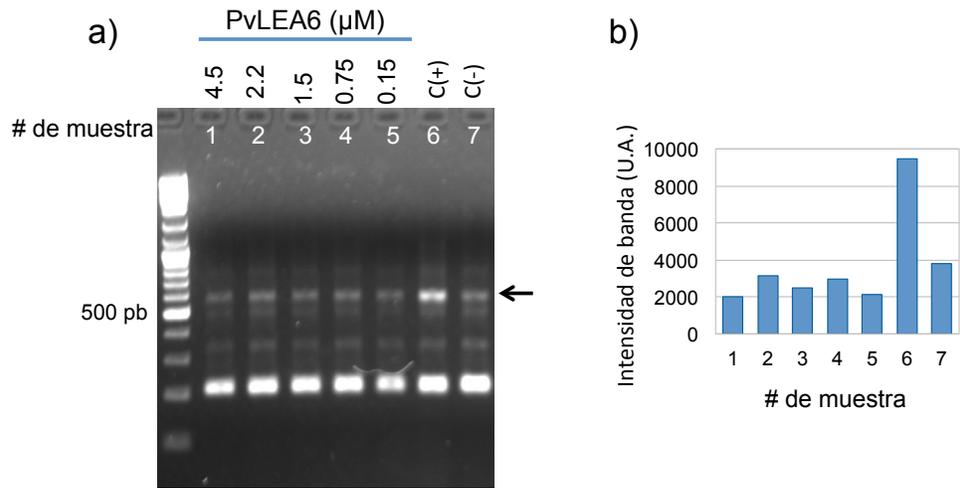


Figura 41. Ensayo de procesamiento en *trans*. a) PCR de muestras de procesamiento en *trans* (la flecha indica el fragmento producido por procesamiento en *trans*). b) Cuantificación de la banda que corresponde al producto de procesamiento en *trans*. U.A.: Unidades arbitrarias.

Dado que en algunos ensayos de procesamiento en *trans*, el control (-) daba señal casi tan alta como el control (+), aún cuando se detenía la reacción como se mencionó anteriormente, pensé que se debía a la estructuración del RNA, por lo que se realizó el ensayo de procesamiento en *trans* con el RNA desnaturalizado y renaturalizado previamente a su uso (ver Materiales y métodos).

Como se observa en la Figura 42, en el control (+) hubo procesamiento, lo que sugiere que el RNA está íntegro y que la mezcla de reacción de procesamiento en *trans* se preparó correctamente. En el control (-) casi no hubo procesamiento, esto se podría haber debido a que al desnaturalizar y renaturalizar, el RNA se conformó en una estructura en la que esta reacción sucede ineficientemente. En las muestras que contienen a la proteína PvLEA6 también se observa muy poca señal, similar al control (-), lo que indica que la presencia de la proteína PvLEA6 no aumenta la reacción de procesamiento en *trans*, al contrario de lo que se ha observado para las proteínas chaperonas de RNA S12 y StpA (Coetzee, Herschlag et al. 1994, Zhang, Derbyshire et al. 1995). La presencia de la proteína LEA tampoco disminuye la reacción de procesamiento en *trans*.

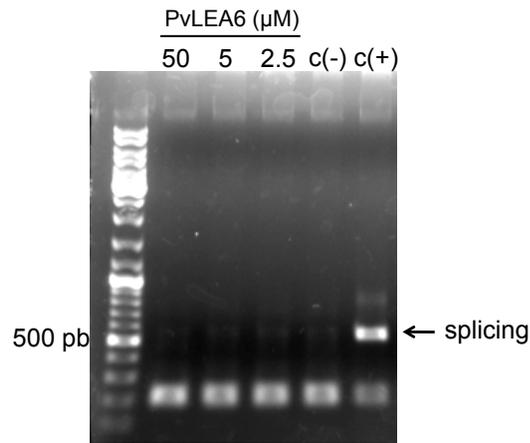


Fig. 42. Ensayo de trans-splicing, desnaturalizando y renaturalizando el RNA previamente a su uso. La flecha indica el producto de trans-splicing.

Los resultados de los ensayos de procesamiento en *trans* también apoyaron el que la proteína PvLEA6 no posee actividad de chaperona de RNA. Sin embargo, puesto que en la literatura se ha reportado que las chaperonas de RNA presentan diferentes mecanismos de acción, es decir, que algunas chaperonas de RNA sólo presentan la actividad para desplazar cadenas de RNA pero no así la de unir cadenas de RNA (Rajkowitsch, Semrad et al. 2005, Rajkowitsch and Schroeder 2007) y viceversa, se decidió probar otro ensayo más.

Ensayo de anti-terminación de la transcripción

Otro de los ensayos utilizados para determinar actividad de chaperona de RNA es el de anti-terminación de la transcripción (Bae, Xia et al. 2000, Nakaminami, Karlson et al. 2006). En este ensayo se utiliza un terminador de la transcripción situado arriba de un gen reportero, en este caso específico se usó el que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) (Fig. 43), de tal forma que si la proteína chaperona de RNA rompe la estructura secundaria que forma el terminador, entonces el gen *cat* se podrá transcribir, y por lo tanto las bacterias que lo contienen mostrarán resistencia al cloranfenicol (Cm). En este ensayo particular, la construcción terminador-*cat* se encuentra en el cromosoma de la cepa de *E. coli* RL211 (Landick, Stewart et al. 1990).

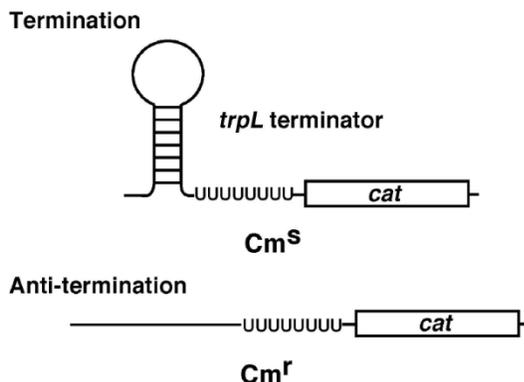


Figura 43. Ensayo de anti-terminación de la transcripción. Un terminador de la transcripción se localiza antes de la región codificante del gen *cat*, de tal manera que si la proteína chaperona de RNA es capaz de desestabilizar el tallo de la estructura secundaria que forma el terminador, el gen *cat* se podrá transcribir, y la cepa mostrará resistencia al cloranfenicol.

La cepa RL211 se solicitó al Dr. R. Landick, quien la construyó, y se sembró en cajas con LB más tetraciclina para su selección. Cabe hacer notar que el crecimiento de esta cepa después de su incubación mostró dos tipos de colonias, unas de tamaño 'normal' y otras de tamaño grande. La cepa se hizo electro-competente como se describe en la sección de Materiales y métodos, y se transformó con los plásmidos pTRC99A:PvLEA6 ó pTRC99A (plásmido vacío, es decir sin algún marco abierto de lectura insertado). En las bacterias transformadas con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 se obtuvieron los dos tipos de colonias (tamaño normal y grande), por lo que se decidió analizar ambos tipos de colonias. En las bacterias transformadas con el plásmido pTRC99A se obtuvieron sólo colonias de tamaño 'normal'.

Los cultivos se crecieron a fase exponencial OD_{550} 0.5-0.7. Posteriormente, todos los cultivos se diluyeron a la misma OD con agua o LB; una parte del cultivo se re-inoculó en LB líquido para extraer RNA y proteína, y otra parte del cultivo se utilizó para hacer diluciones 10^{-1} - 10^{-4} , las cuales se gotearon en cajas con LB solido (Fig. 45). Los cultivos re-inoculados en LB líquido se crecieron a fase estacionaria $OD_{550nm} \geq 1$ (excepto para los cultivos de RL211 transformada con el plásmido pTRC99A, que crecieron a OD_{550nm} 0.5-1.5). De estos cultivos se extrajo RNA para realizar PCR cuantitativo (ver Tabla 3) y, también se extrajo proteína para determinar la expresión de la proteína PvLEA6 (Fig. 44). Como se observa en la Figura 44, la proteína se sobre-expresó en presencia de IPTG (1 mM), y los dos tipos de colonias (tamaño normal y grande) expresan igual a la proteína PvLEA6.

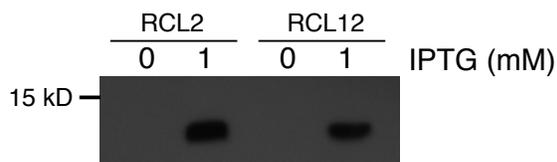


Fig. 44. Experimentos tipo Western utilizando anticuerpos anti-PvLEA6. RCL2: cepa RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 2 (colonias de tamaño

“normal”) y RCL12: cepa RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 12 (colonias de tamaño grande).

Como se observa en la Figura 45, en ausencia de Cm e IPTG, la cepa RL211 crece menos cuando contiene al plásmido pTRC99A (cepa pTRC) ó pTRC99A:PvLEA6 (cepa RCL2), pero en presencia de IPTG ambas cepas crecen en forma similar a la cepa RL211. Esto se podría deber a que el represor Lac I (codificado en el plásmido pTRC99A) al no estar unido a IPTG se une a secuencias reguladoras, evitando la transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias para el crecimiento de la bacteria. En el caso de la cepa RCL12, la cual se seleccionó porque produce colonias grandes, crece aún más que la cepa RL211, probablemente porque esta cepa es más robusta (es decir, al ser más grande, tolera más el estrés impuesto por el cloranfenicol) que la cepa RL211. En presencia de Cm, todas las cepas disminuyeron su crecimiento. Las cepas RCL2 y pTRC disminuyeron su crecimiento aún más que la cepa RL211, quizás por el aumento en la carga metabólica provocado por la residencia de plásmidos de alto número de copias. La cepa RCL2 se comporta de forma similar a la cepa pTRC sugiriendo que la proteína PvLEA6 no fue capaz de desestabilizar el terminador de la transcripción y por lo que no se expresaría el gen *cat*. Este ensayo indica que la proteína PvLEA6 no posee este tipo de actividad de chaperona de RNA. Para confirmar tal resultado se analizaron los niveles del transcrito del gen *cat* por qPCR (PCR cuantitativo) utilizando oligos que amplifican este gen (Tabla 3).

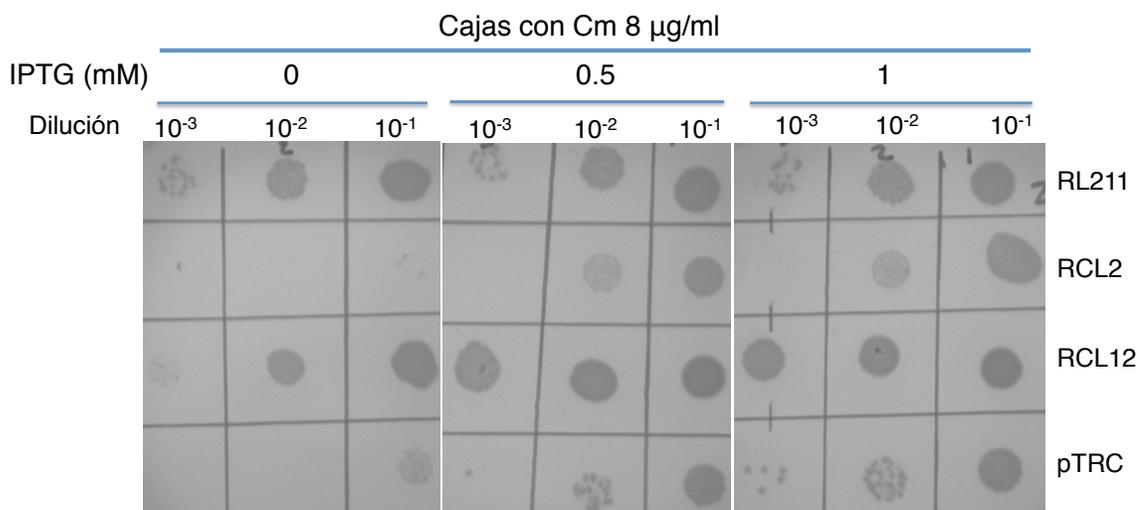
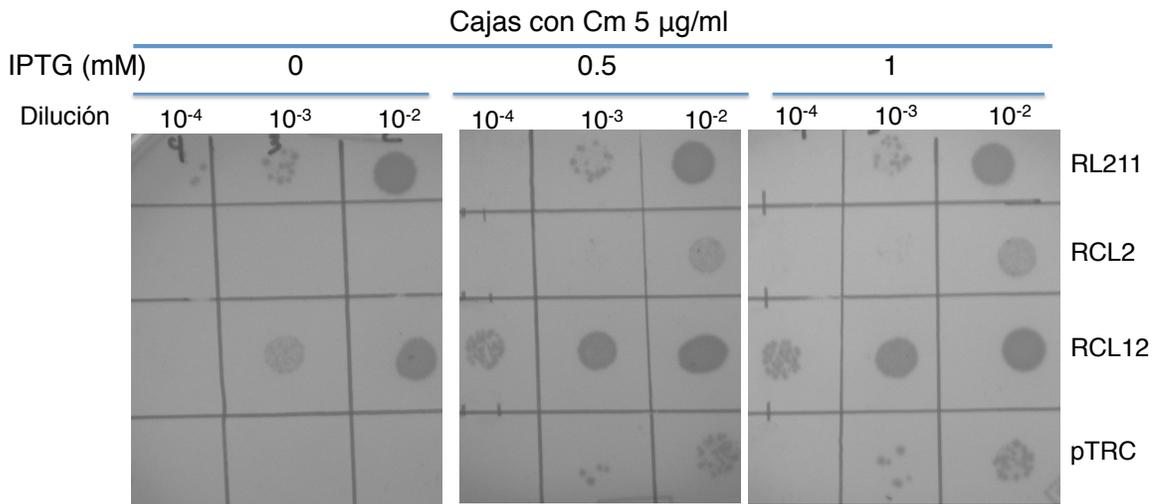
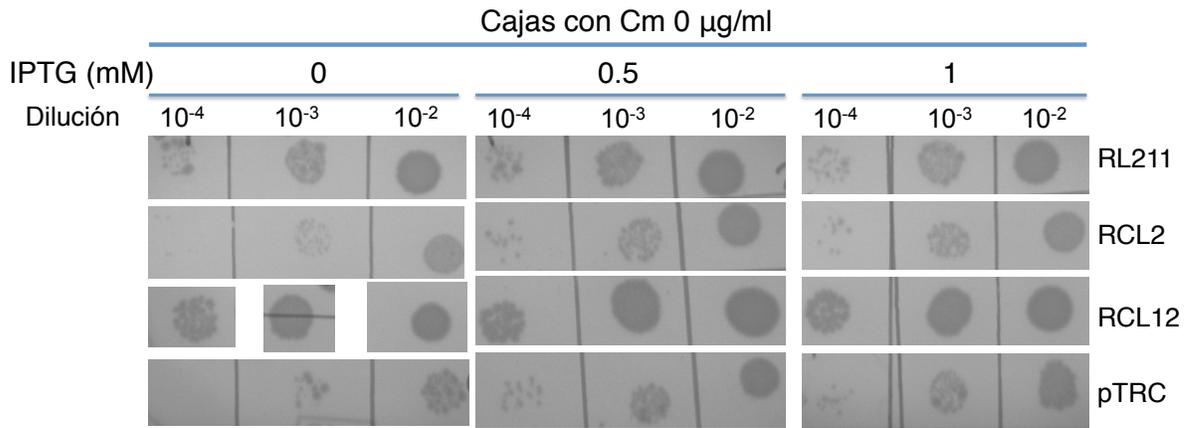


Fig. 45. Ensayo de anti-terminación de la transcripción. RCL2: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 2 (colonias de tamaño normal), RCL12: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 12 (colonias de tamaño grande) y

pTRC: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A. En la caja sin Cm y sin IPTG, las gotas de la cepa RCL12 no quedaron en línea, por lo que la imagen de cada gota se situó separada.

Como se observa en la Tabla 3, las cepas RCL2 y RCL12 (las cuales contienen el plásmido pTRC99A:PvLEA6 que codifica a la proteína PvLEA6) presentan una expresión similar del gen *cat* que las cepas RL211 y pTRC (RL211 transformada con el plásmido pTRC99A). Estos resultados sugieren que la proteína PvLEA6 no está rompiendo la estructura secundaria que forma el terminador de la transcripción, con lo que no se aumenta la expresión del gen *cat*. A este qPCR le faltó el control de RNA tratado con DNAsa, para determinar que lo que se está amplificando proviene de cDNA y no de DNA cromosómico.

	VN: RL211	VN: pTRC
RCL2 Cm 0 IPTG 0	2.23	2.21
RCL2Cm 0 IPTG 1	1.02	1.70
RCL2 Cm 5 IPTG 0	3.16	-----
RCL2 Cm 5 IPTG 1	1.69	3.06
RCL12 Cm 0 IPTG 0	1.26	1.25
RCL12 Cm 0 IPTG 1	0.46	0.77
RCL12 Cm 5 IPTG 1	0.42	0.76
pTRC Cm 0 IPTG 0	1.01	-----
pTRC Cm 0 IPTG 1	0.60	-----
pTRC Cm 5 IPTG 1	0.55	-----

Tabla 3. qPCR del gen *cat*. VN: valor de normalización, RCL2: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 2, RCL12: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 12 y pTRC: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A. Se usó el gen *ihfB* como gen de referencia.

El ensayo se repitió de forma similar y se realizó el control del qPCR de RNA tratado con DNAsa, el cual salió negativo, indicando que la amplificación proviene del cDNA y no de DNA contaminante. Como se observa en la Tabla 4, la expresión del gen *cat* en las cepas RCL2 y RCL12, las cuales contienen el plásmido que codifica a la proteína PvLEA6, es similar a la expresión en la cepa RL211 o la cepa pTRC (cepa RL211 transformada con el plásmido pTRC99A). Esto muestra que la proteína PvLEA6 no influye en la transcripción del

gen *cat* y sugiere que no está deshaciendo la estructura del terminador de la transcripción, que se podría deber a que la proteína no tiene actividad de chaperona de RNA o que sí tiene alguna actividad de las que presentan las chaperonas de RNA pero la función de separar cadenas de RNA no la tiene, como se ha observado para otras chaperonas de RNA que tienen la función de intercambiar cadenas de RNA y no tienen la función de unirlos, es decir, pueden presentar solo una de las actividades que realizan las chaperonas de RNA (Rajkowitsch and Schroeder 2007).

	Expresión gen <i>cat</i>	
	VN:RL211	VN:pTRC
RCL2 IPTG 0	1.7	1.8
RCL2 IPTG 1	0.6	1.2
RCL12 IPTG 0	1.2	1.3
RCL12 IPTG 1	0.6	1.2
pTRC IPTG 0	0.9	----
pTRC IPTG 1	0.5	----

Tabla 4: qPCR del gen *cat*. VN: valor de normalización, RCL2: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 2, RCL12: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A:PvLEA6 clona 12 y pTRC: RL211 transformada con el plásmido pTRC99A. Se usó el gen *ihfB* como gen de referencia.

Ensayo de complementación de la cepa cuádruple mutante en la familia de chaperonas de RNA Csp.

Finalmente se probó otro ensayo más para determinar actividad de chaperona de RNA. En éste se utiliza la cepa BX04, una cepa de *E. coli* cuádruple mutante en la familia de chaperonas de RNA Csp A, B, E y G, la cual no crece a bajas temperaturas (15°C) (Xia, Ke et al. 2001). Algunas proteínas con actividad de chaperona de RNA son capaces de complementar este fenotipo (Nakaminami, Karlson et al. 2006). La cepa BX04 se transformó con los plásmidos pTRC:PvLEA6 y pTRC99A (plásmido pTRC99A vacío, es decir sin inserto). En la cepa pTRC:PvLEA6 (cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6) se determinó la expresión de la proteína PvLEA6, para lo cual la cepa se creció a fase exponencial en donde se agregó IPTG a una concentración final de 2 mM. Como se observa en la Figura 46, la proteína PvLEA6 se expresó en presencia de IPTG.

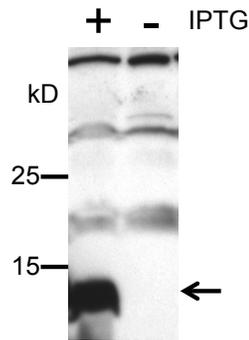


Figura 46. Experimentos tipo Western utilizando el anticuerpo anti-PvLEA6. La flecha indica la banda que corresponde a la proteína PvLEA6. Se usó IPTG 2 mM (concentración final).

Como control del crecimiento, las cepas se incubaron a 37°C (Fig. 47). Todas las cepas crecieron de manera similar.

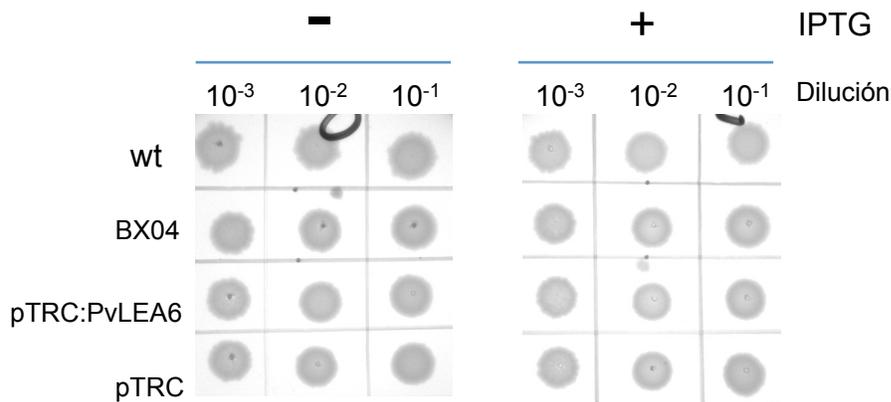


Figura 47. Crecimiento de cepas a 37 °C. IPTG 2 mM.

La cepa BX04 es sensible a bajas temperaturas, por lo que los ensayos de complementación se realizaron incubando a 15 °C. Las diferentes cepas se crecieron durante toda la noche, a la mañana siguiente se re-inocularon y se crecieron a fase exponencial (OD_{600} 0.5-0.6), posteriormente, se realizaron las diluciones 10^{-1} - 10^{-3} y estas se gotearon en cajas con o sin IPTG (2 mM). Las cajas se incubaron a 15 °C durante 7 días después de los cuales sólo se observó crecimiento en la cepa silvestre. Después de este período, las cajas se pasaron a una incubadora estabilizada a 25 °C en donde se mantuvieron por 2.5 días. Como se observa en la Figura 48, en presencia de IPTG, la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 creció mejor que la cepa BX04 transformada o no con el plásmido pTRC99A, sugiriendo que la proteína PvLEA6 está complementando la función de las chaperonas de RNA Csp, o bien que está protegiendo la actividad de otras chaperonas de RNA u otras proteínas que son necesarias para contender con el choque de frío o durante el período de recuperación.

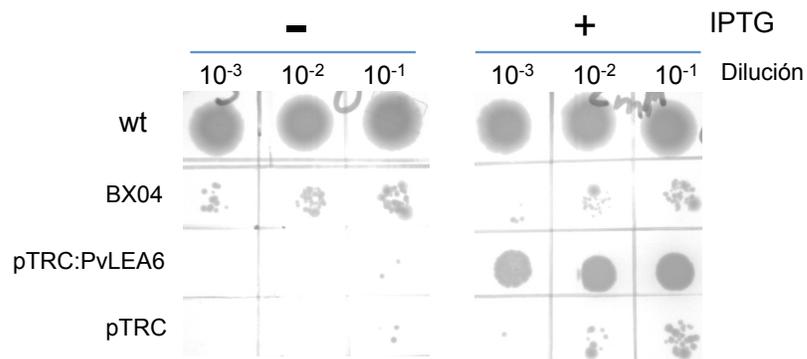


Figura 48. Crecimiento de cepas de *Escherichia coli* K12 a 15 °C durante 7 días y posterior incubación a 25 °C durante 2.5 días. wt: cepa silvestre, BX04: cepa cuádruple mutante, pTRC:PvLEA6: cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 y pTRC: cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC99A vacío. IPTG 2 mM.

Para corroborar el resultado anterior, el mismo ensayo se realizó 7 veces, incubando a 15 °C durante 5 días y, posteriormente, a 25 °C durante aproximadamente 20 h; en estos experimentos se observó que solamente cuando se usaron incubadoras que regulaban con alta precisión la temperatura los resultados fueron reproducibles. La Figura 49 muestra un resultado que se reprodujo al menos tres veces. En ausencia de IPTG, la cepa BX04 crece igual que la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 o pTRC, pero en presencia de IPTG, la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 crece mejor que la cepa transformada con el plásmido pTRC o la cepa BX04 no transformada, confirmando los resultados anteriores.

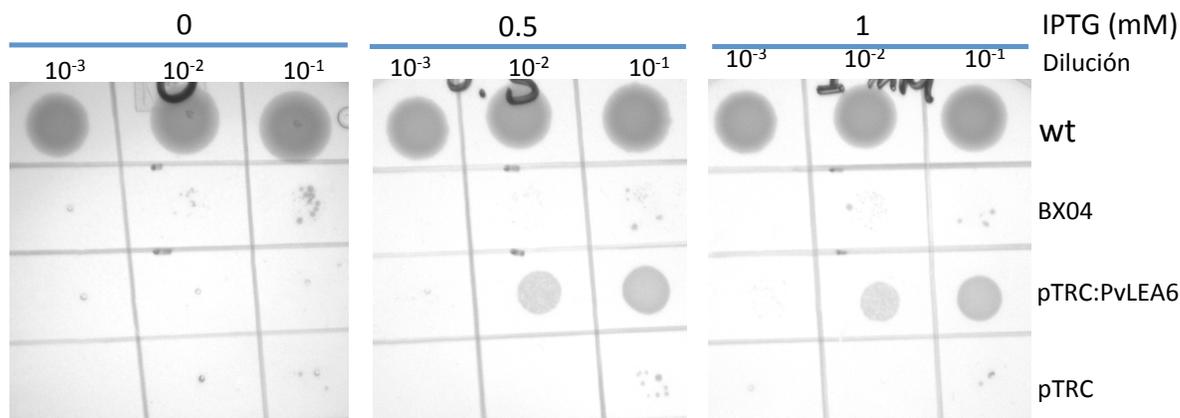


Figura 49. Ensayo de choque de frío y posterior recuperación a 25°C. La cepa BX04 puede crecer después de un choque de frío solamente cuando está transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 y en presencia de IPTG. wt: cepa silvestre, BX04: cepa cuádruple mutante, pTRC:PvLEA6: cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 y pTRC: cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC99A vacío.

DISCUSIÓN

En los ensayos de entrecruzamiento con luz UV y en los de retardo en gel nativo no se detectó que la proteína uniera RNA, esto se podría deber a las siguientes posibilidades: a) la proteína no une RNA, b) une RNAs diferentes a los que se probaron o c) une RNA en condiciones diferentes a las que se probaron.

La presencia de la proteína PvLEA6 no aumentó la reacción de trans-splicing. Esto se podría deber a que la proteína PvLEA6 no tiene actividad de chaperona de RNA, las condiciones en las que se probó el ensayo la proteína PvLEA6 no presenta la actividad de chaperona de RNA, interacciona con secuencias de RNAs diferentes a la del intrón, y/o el método para medir la reacción de trans-splicing tuvo baja sensibilidad como para detectar diferencias entre la muestra control y la muestra con proteína PvLEA6, por lo que se debería medir la reacción de trans-splicing con qPCR para detectar diferencias mínimas.

En el ensayo de anti-terminación de la transcripción, la sobre-expresión de la proteína PvLEA6 en la cepa de *E. Coli* RL211 no indujo mayor expresión del gen *cat*, lo que sugiere que la proteína PvLEA6 no deshizo la estructura secundaria del terminador de la transcripción y que no tiene actividad de chaperona de RNA ó no presenta la actividad de abrir cadenas de RNA.

En el ensayo de recuperación de choque de frío, la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 en presencia de IPTG se recuperó mejor que la cepa BX04 transformada o no con el plásmido pTRC99A. A diferencia de otras chaperonas de RNA, la proteína PvLEA6 no complementó el crecimiento de la cepa BX04 en frío. Esto se podría deber a que la proteína PvLEA6 está realizando la actividad de chaperona de RNA, pero a muy bajos niveles (comparada a la actividad que presentan las proteínas Csp), o podría ser que la proteína PvLEA6 no posea la actividad de abrir cadenas de RNA que es la actividad que realizan las proteínas Csp, pero si podría poseer alguna otra actividad de las que realizan las chaperonas de RNA como la de unir cadenas de RNA. También existe la posibilidad de que la proteína PvLEA6 no sea chaperona de RNA, y que proteja a proteínas u otras moléculas durante el choque de frío, las cuales son necesarias para contender con el choque de frío o durante el crecimiento después del choque de frío.

En el laboratorio se realizó el ensayo de recuperación de choque de frío en la cepa BX04 utilizando otras proteínas LEA (de *Arabidopsis thaliana*), las cuales también confirieron mejor crecimiento durante la recuperación (datos de Inti Arroyo y Darinka Méndez), pero en menor o mayor grado que la proteína PvLEA6, lo que sugiere que las proteínas LEA presentan diferentes mecanismos de acción o tienen diferentes blancos.

Adicionalmente, en el laboratorio se probó que la proteína PvLEA6 protege la actividad enzimática de la proteína lactato deshidrogenasa de ciclos de congelamiento/descongelamiento (datos de Cesar Cuevas) y también se encontró que una línea de *Arabidopsis thaliana* mutante nula en una proteína LEA del grupo 6 mostró

susceptibilidad al crecimiento en frío (datos de Inti Arroyo). Estos datos apoyan la idea de que las proteínas LEA del grupo 6 (incluyendo la PvLEA6) realizan alguna función protectora en frío, que podría ser la protección de algunas proteínas y/o RNAs.

CONCLUSIÓN

La mayoría de los ensayos probados sugieren que la proteína PvLEA6 no realiza la actividad de chaperona de RNA, pero el ensayo de recuperación del choque de frío de la cepa BX04, sugiere que la proteína PvLEA6 realiza la actividad de chaperona de RNA o que protege otras proteínas o moléculas que son necesarias para contender con el choque de frío o durante el crecimiento después del choque de frío.

PERSPECTIVAS

Probar si la proteína PvLEA6 realiza las actividades de unión y desplazamiento de cadenas de RNA usando oligos de RNA marcados con fluoróforo. La mayoría de las proteínas chaperonas de RNA conocidas hasta la fecha realizan una o las dos actividades, por lo que si no se detecta que la proteína PvLEA6 realice una de las actividades esto sugeriría que la proteína PvLEA6 no tiene actividad de chaperona de RNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento del H₂O con DEPC (H₂O_{DEPC})

El agua fue tratada con 0.1% v/v DEPC (diethylpyrocarbonato), durante toda la noche, con agitación; posteriormente, se autoclavó durante 20 min a 120 °C para inactivar las trazas de DEPC.

Preparación de gel acrilamida/tricina

Solución A: Acrilamida:Bisacrilamida 48:1.5%

Solución B: Trizma base 36.34%, SDS 0.3%, pH 8.45

Solución	Separador	Concentrador
Solución A	5 ml	0.4 ml
Solución B	5 ml	1.24 ml
Glicerol 50%	1.6 ml	_____
Agua	3.4 ml	3.36 ml
Persulfato de amonio 10%	50 μ l	60 μ l
TEMED	8 μ l	5 μ l

La electroforesis se realiza con los siguientes amortiguadores:

Amortiguador ánodo: Trizma base 2.422%, ajustar a pH 8.9 con HCl concentrado.

Amortiguador cátodo: Trizma base 1.211%, Tricina 1.792%, SDS 0.1%, el pH queda a aproximadamente 8.2.

Preparación del gel desnaturalizante de poliacrilamida/urea

Se preparó la siguiente solución, la cual queda al 6% de acrilamida.

Cantidad	Sustancia
210 gr	Urea
72.5 ml	Acr:Bis (38:2) %
100 ml	TBE 5X
Llevar a 500 ml	H ₂ O

De esa solución se tomaron 16 ml, y se le agregaron 12 μ l de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine), y 140 μ l de PA (Persulfato de amonio) al 10%.

Obtención del templado para transcripción

Para realizar la transcripción *in vitro* de los RNAs a utilizar, el plásmido pKS (pKS:NOS ó pKS:170), conteniendo la secuencia de interés, se digirió con la enzima de restricción XhoI. La reacción de digestión se extrajo con fenol:cloroformo (F:Cl, 50% Fenol: 50% cloroformo), a la fase acuosa se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5 y se incubó a -20 °C durante toda la noche. Para obtener la pastilla de proteínas, ésta se centrifugó durante

10 min a velocidad máxima en una microcentrifuga Eppendorf a 4 °C; posteriormente, la pastilla se lavó 2 veces con etanol 70%, se secó (no demasiado) para finalmente resuspenderla en H₂O.

Purificación de RNA de gel

A la reacción de transcripción se le agregó amortiguador de carga para electroforesis desnaturizante (TBE 2X, pH 8.3, ficol 13%, urea 7 M, azul de bromofenol 0.01%, xilen-cianol 0.01%) y se separó en un gel desnaturizante de poliacrilamida/urea, el cual se había precorrido durante aproximadamente 30 min; si la muestra se encontraba en un volumen mayor a 100 µl, ésta se corría en un gel sin pozos. Se utilizó TBE 1X como amortiguador de corrida, el gel se corrió a 30 mA (aproximadamente 300 volts) durante 20-35 min hasta que el colorante xilen-cianol llegará a aproximadamente la mitad del gel o el azul de bromofenol llegara a la base del gel (dependiendo del tamaño del RNA).

Si el RNA no contenía [$\alpha^{32}\text{P}$] Uracilo, el gel se tiñó con una solución que contenía BrEt (Bromuro de Etidio) 2 µg/ml durante 15 min. con agitación. Se cortó la banda que contenía al RNA de donde se purificó el RNA con uno de los siguientes protocolos.

Rompiendo el gel de poliacrilamida: un pedazo de gel (aproximadamente 0.6X1.2 cm) que contenía al RNA se puso en un tubo Eppendorf de 0.5 ml que tenía 3 hoyos en la base, este tubo a su vez se puso en un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugó durante 1 min, a velocidad máxima en una microcentrifuga. Al tubo de 1.5 ml que contenía el gel, se le agregaron 0.4-0.8 ml de NaCl 0.4 M, y se incubó 2 h con agitación, a 4 °C; o bien, al gel se le agregaron 0.5 ml de amortiguador de elución de RNA (200 mM Tris pH7.5, 25 mM EDTA pH 8.0, 300 mM NaCl, 2% SDS) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación; posteriormente, se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad en una microcentrifuga y, se tomó el sobrenadante, si no se llegaba a obtener todo el sobrenadante, se volvía a centrifugar. Por cada 0.5 ml de sobrenadante se agregó 1 ml de etanol y se incubó durante 1 h o toda la noche a -20°C. Para obtener la pastilla de RNA se centrifugó durante 20 min. a máxima velocidad en una microcentrifuga a 4 °C, la pastilla se dejó secar al aire (aproximadamente 15 min.) y se resuspendió con H₂O_{DEPC}.

Eluyendo a temperatura ambiente: la banda de gel (máximo de 1x2 cm) se puso en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 0.5 ml de amortiguador de elución de RNA, se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 1 min. y se tomó el sobrenadante. Por cada 0.5 ml de sobrenadante se agregó 1 ml de etanol y se incubó durante mínimo 2 h a -20°C. Para obtener la pastilla de RNA se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad en una microcentrifuga a temperatura ambiente, la pastilla se dejó secar al aire (aproximadamente 15 min) y se resuspendió con H₂O_{DEPC}.

Si el RNA contenía [$\alpha^{32}\text{P}$] Uracilo, el gel se puso sobre un acetato y se envolvió con plástico (plástico para envolver multiusos/film, Reynolds); posteriormente, el gel se expuso durante aproximadamente 30 s y 2-5 min. La banda conteniendo el RNA (máximo de 1x2 cm) se cortó y se colocó en un tubo eppendorf, después se le agregaron 500 µl de amortiguador de

elución (200 mM Tris pH7.5, 25 mM EDTA pH 8.0, 300 mM NaCl, 2% SDS) y se incubó rotando durante toda la noche a temperatura ambiente. Al final de la incubación se tomó el líquido del tubo Eppendorf, se le agregó 1 ml de etanol 100% y se incubó a -20°C, para precipitar el RNA. Para obtener la pastilla de RNA, se centrifugó 15 min a velocidad máxima en una microcentrífuga a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, la pastilla se secó al aire y se resuspendió con H₂O_{DEPC}.

Transcripción *in vitro* de RNA con polimerasa T7

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

Cantidad	Sustancia
1 µg	ADN plasmídico linearizado
10 µl	Amortiguador de transcripción 5X (Fermentas)
5 µl	4 rNTPs (A, G, C, U) 10 mM c/u
5 µl	UTP 1 mM
2 µl	Polimerasa T7 20 U/µl (Fermentas)
1 µl	Ribolock 40 U/µl (Fermentas)
50 µl	H ₂ O _{DEPC}

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2.5 h. Posteriormente se agregaron 2 U de DNAsa (Fermentas) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Después se realizó la extracción de proteínas con Fenol:Cloroformo (1 Fenol: 1 Cloroformo) y, posteriormente, se precipitó con acetato de NH₃: Etanol (1 ActNH₃: 6 Etanol).

Si se quería obtener alta cantidad de RNA se escaló la mezcla de reacción 5 veces (se puso 5 veces más de todas las soluciones). Posteriormente, la reacción se separó por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida/urea y el RNA se purificó del gel como se describió anteriormente.

Transcripción *in vitro* de RNA a gran escala

Esta transcripción se realizó con el paquete T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System. Básicamente se siguió el protocolo sugerido en el manual del paquete comercial; brevemente, se realizó la siguiente reacción de transcripción:

Componente	Volumen
RiboMAX Express T7 2X buffer	10 µl

DNA plasmídico linearizado	1 µg (1-8 µl)
Enzyme mix, T7 Express	2 µl
H ₂ O _{DEPC}	0-7 µl

La reacción de transcripción se incubó durante 2 h a 37°C, posteriormente, se separó en un gel desnaturante de poliacrilamida/urea y el RNA se purificó del gel como se describe arriba.

Transcripción *in vitro* de RNA marcado con [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

Cantidad	Sustancia
1µg	ADN plasmídico linearizado
10 µl	Amortiguador de transcripción 5X (Fermentas)
5 µl	rNTPs (A, G, C) 10 mM c/u
5 µl	UTP 1 mM
2 µl	Pol. T7 20 U/µl (Fermentas)
2 µl (50 pmol)	[$\alpha^{32}\text{P}$] UTP 800Ci/mmol 20 µCi/µl (Perkin Elmer)
1 µl	Ribolock 40 U/µl (Fermentas)
A 50 µl	H ₂ O _{DEPC}

La mezcla de reacción se incubó de 2-2.5 h a 37 °C. Después se le agregó amortiguador de carga 2X (TBE 2X (pH 8.3), 13% ficol, 0.01% azul de bromofenol, 7M urea), para que quedara 1X; posteriormente, la muestra se calentó a 65 °C durante 5-10 min. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida/urea, usando como amortiguador de corrida TBE 1X; el gel se corrió a 20-30 mA, hasta que el colorante del buffer de carga llegara al final del gel.

Cuantificación de marca incorporada

Se realizó una dilución 1:50 de la reacción de transcripción y del RNA radiactivo extraído del gel de acrilamida. Se tomaron 10 µl de la dilución y se le agregaron 3.5 ml de líquido de centelleo, se mezcló la muestra y se midió la emisión de partículas en cpm (cuentas por minuto) en un contador de isotopos radiactivos (Beckman, LS6000SC).

Alternativamente, se tomó 1 μl de la reacción de transcripción o del RNA purificado de gel y se puso en un tubo Eppendorf con 49 μl de H_2O , este tubo se puso en un contador de partículas.

Se obtuvo el número total de cpm para las muestras concentradas, tanto para la de la reacción de transcripción como para la del RNA radiactivo extraído del gel. Dado que se conocía el número de pmol de $[\alpha^{32}\text{P}]$ UTP que contenía la mezcla de reacción, entonces conocíamos el número de cpm que emitían este número de pmol, de esta forma se pudo determinar cuántos pmol de $[\alpha^{32}\text{P}]$ Uracilo contenía la muestra de RNA radiactivo extraído del gel. Conociendo el número de uracilos en el RNA transcrito, se calculó el número de moles de moléculas de RNA.

Ensayo de retardo en gel nativo

Se utilizaron los siguientes amortiguadores de unión:

Amortiguador BB (Binding Buffer)

Solución	volumen	Concentración 5X
HEPES 1M pH7.9	25 μl	50 mM
MgCl ₂ 1M	20 μl	40 mM
DTT 10 mM	5 μl	0.1 mM
EDTA 200 mM pH8	1.25 μl	0.5 mM
Glicerol 80%	312.5 μl	50%
H ₂ O _{DEPC}	136.25 μl	

Amortiguador BR

Componente	Volumen	Concentración 5X
Tris HCl 1M pH7.5	0.2 ml	200 mM
MgCl ₂ 1M	20 μl	20 mM
KCl 5M	100 μl	500 mM
Glicerol 100%	0.5 ml	50%
DTT 1M	100 μl	100 mM
H ₂ O _{DEPC}	80 μl	

Amortiguador BASR1

Componente	Volumen	Concentración 5X
HEPES 1M pH8	50 µl	100 mM
NaCl 5M	12.5 µl	125 mM
Glicerol 100%	250 µl	50%
H ₂ O _{DEPC}	187.5 µl	

Soluciones para el gel nativo

Acrilamida-Bis 16.2%

Componente	Cantidad
Acrilamida	16 g
Bisacrilamida	0.2 g
H ₂ O	Aforar a 100 ml

Buffer TBE 5X (1 litro)

Tris-base	54 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8	20 ml
H ₂ O	Aforar a 1L

Gel nativo 6%

Componente	volumen
Buffer TBE 5X	5 ml
Acrilamida:bis (16:0.2%)	18.7 ml
Agua	26 ml

PA 20%	498 μ l
TEMED	75 μ l
Total	50 ml de gel

Se realizó una mezcla A que contiene por cada muestra: amortiguador de unión 2 μ l, Ribolock 0.1 μ l y RNA. Si el RNA estaba marcado radiactivamente se utilizaron de 0.37-2 picomol, si no estaba marcado radiactivamente se utilizaron 6-18 picomol (0.5 -1.5 μ g).

Se realizó una mezcla B que contiene por cada muestra: proteína 0.037-180 picomol y H₂O_{DEPC}, el volumen de esta se mezcla se ajustó junto con la mezcla A a 10 μ l.

La mezcla A se incorporó a cada muestra de la mezcla B y se incubó alrededor de 30 min, a temperatura ambiente o en hielo. Las muestras no se agitaron ni se centrifugaron.

Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas, el cual se había precorrido durante mínimo 1 hora a 4°C a 10 mA, si era minigel (~9x11x0.15cm), o a 25 mA si era gel grande (~15x18x0.15 cm), las muestras se cargaron a 4 °C (en el cuarto frío) y el gel se corrió en las mismas condiciones durante 2-2.5 h, con amortiguador TBE 0.5X.

Ensayo de entrecruzamiento con luz UV (ultravioleta)

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: proteína 0.1-100 picomol, RNA alrededor de 1 picomol, amortiguador de entrecruzamiento 10X (100 mM Hepes-KOH pH 7.5, 50% glicerol) 2 μ l, sales 20X (200 mM acetato de Mg, 1000 mM acetato de K, 1 mM EDTA) 1 μ l, y se llevó a 20 μ l con H₂O_{DEPC}.

Las muestras se incubaron 10 min a temperatura ambiente, posteriormente, se expusieron a luz UV (los tubos se acostaron sobre hielo y se pusieron a aproximadamente 8 cm de las lámparas), durante 15 min. Posteriormente, se agregaron 2 μ l de RNAsa (10 mg/ml) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Al término de la incubación, a una determinada muestra se le agregaron 2 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 2 μ l de SDS 20%, y se incubaron durante 20-35 min a 37 °C.

A cada muestra se le agregaron 5-10 μ l de amortiguador Laemli 6X (0.35 M Tris-Cl pH 6.8, 10.28% SDS, 30% glicerol, 9.3% DTT, 1.2x10⁻³% azul de bromofenol) y se hirvieron 3 min. Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de acrilamida/tricina, el gel se corrió durante aproximadamente 3 h. a 120 volts, a 4 °C. Después de la electroforesis, el gel se puso sobre papel filtro 3MM y se cubrió con papel celofán, posteriormente, se secó en un secador de geles con un programa en el que se subió la temperatura a 80 °C durante la primera hora y en la segunda hora la mantuvo en 80 °C. Finalmente, el gel seco se expuso a una película Kodak a -70 °C.

Ensayo de trans splicing

Se usaron los RNAs H1 y H2 que son precursores de *trans-splicing* del gen de la timidilato sintasa del bacteriófago T4, el cual contiene un intrón tipo I (Galloway Salvo, Coetzee et al. 1990). Los plásmidos pTZH1 y pTZH2 se digirieron con *Sall* y *HindIII*, respectivamente, para transcribir los RNAs H1 y H2 que resultan con una longitud de 938 y 616 nt (Coetzee, Herschlag et al. 1994). El peso molecular de los RNAs se calculó con la formula: (# nt X 320.5)+159, con este peso molecular se calculó la concentración molar de los mismos. Los RNAs se purificaron de gel.

Para los ensayos se realizaron diluciones de la proteína PvLEA6 o lisozima en amortiguador KHPO₄ 10 mM pH8. En tubos de microcentrifuga se puso proteína o buffer KHPO₄ 10 mM pH8, y se ajusto con agua junto con el volumen de la mezcla de abajo a 10 µl.

Se preparó la siguiente mezcla: 2 µl de buffer trans-splicing 5X (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, spermidina 2 mM, DTT 20 mM), 0.5 µl (20 U) de Ribolock (Fermentas), 1 µl de GTP 1 mM y 20 nM de cada uno de los precursores de trans-splicing (H1 y H2) (Coetzee, Herschlag et al. 1994). Para evitar el *splicing* durante la preparación de la mezcla, se agregó al último uno de los precursores. La mezcla se adicionó a los tubos de microcentrifuga que contenían proteína o amortiguador de KHPO₄ 10 mM pH8 (amortiguador de almacenamiento de la proteína PvLEA6).

La reacción se incubó de 20-30 min a 37°C ó 55 °C. El control negativo fue una muestra sin proteína incubada a 37°C, y el control positivo fue una muestra sin proteína incubada a 55°C, dado que la reacción se realiza ineficientemente a 37°C y eficientemente a 55°C. Las muestras con proteína se incubaron a 37°C.

Posteriormente se realizó extracción de proteínas con fenol-cloroformo ó la reacción se detuvo poniendo la mezcla en hielo. Después se agregó EDTA a concentración final de 0.25 mM (en algunas muestras también se probó agregar tRNA a concentración final de 4.1 µg/µl); posteriormente, se incubó 2 min a 78°C y en seguida se puso en hielo. Después las muestras se guardaron a -20 °C.

Reacción para la síntesis de cDNA

La reacción se realizó de acuerdo al protocolo sugerido por Invitrogen para la enzima superscript III. La reacción se escaló a la mitad; es decir, solo se prepararon 10 µl de reacción. Se usó 2.5 µl de RNA templado (reacción de trans-splicing).

PCR para analizar muestras de reacción de *trans-splicing*

Se usaron los siguientes oligos:

Oligo 5' exón 1 (404 pb río arriba del final del exón 1)

AGCTCGCCTGGAAAGCTTGC

Oligo 3' exón 2 (160 pb río abajo del inicio del exón 2)

AAG CTC TTT AGG TTC ACG CC

Se realizó el siguiente programa de PCR: 94°C durante 3 min, y 20 ó 25 ciclos de: 94°C durante 30 s, 57°C durante 30 s y 72°C durante 30 s.

Ensayo de trans-splicing usando RNA desnaturalizado y renaturalizado

La proteína PvLEA6 en amortiguador KHPO₄ 10 mM pH8 se colocó en tubos de microcentrifuga, y se ajustó con agua a 4.33 µl. A cada muestra se le agregaron 5.67µl de la mezcla de RNA desnaturalizado y renaturalizado (ver abajo). La concentración final de cada RNA fue 20 nM en la reacción (10 µl); después las muestras se incubaron 20 min a 37°C, excepto la muestra control (+) que se incubó a 55°C. Al término de la incubación, para detener la reacción se agregó 1 µl de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM, posteriormente se incubaron 2 min a 75°C y en seguida se pusieron en hielo. Después las muestras se guardaron a -20 °C.

Desnaturalización y renaturalización de RNA:

Se realizó la siguiente mezcla: RNA H1 1.02 µl (58.8 ng/µl) y RNA H2 1.65 µl (34.35 ng/µl). Esta mezcla se incubó 3 min a 95 °C, después se le agregó 0.66 µl de buffer BTSC 5X (Tris pH 7.5 180 mM, DTT 23 mM y MgCl₂ 20 mM), se mezcló pipeteando y se centrifugó 15 s. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. A esta mezcla se le agregó 1.33 µl de amortiguador BTSC 5X y 1 µl de GTP 1 mM.

En la tabla se indica las muestras preparadas para la reacción de trans-splicing usando el RNA desnaturalizado y renaturalizado.

	Muestra	µl proteína PvLEA6 ó amortiguador KHPO ₄ 10 mM pH8	µl H ₂ O	µl de mezcla con RNAs (desnaturalizado y renaturalizado)
1	50 µM proteína	1.23 (PvLEA6 3.56 µg/µl)	3.1	5.67
2	5 µM proteína	1.23 (PvLEA6 356 ng/µl)	3.1	5.67
3	2.5 µM proteína	0.615 (PvLEA6 356 ng/µl)	3.715	5.67
4	C(-)	1.23 amortiguador	3.1	5.67
5	C(+)	1.23 amortiguador	3.1	5.67

Ensayo de anti-terminación de la transcripción

Los cultivos iniciados a partir de una colonia se incubaron durante toda la noche a 37°C en LB (para la cepa RL211) o en LB Ap (para las cepas RL211 transformadas con plásmido). Al siguiente día se midió la OD_{550nm} de los cultivos.

Se inocularon 3 ml de LB o LB Ap (para las cepas transformadas con plásmido) con 150 µl del cultivo crecido durante toda la noche y se incubó a 37 °C hasta que llegaron a una OD_{550nm} 0.5-0.8, en seguida se adicionó IPTG 1 ó 2 mM concentración final y se continuó la incubación hasta que llegaron a una OD_{550nm} 1.2-1.7. Después se hicieron diluciones progresivas 1:10 hasta llegar a 1x10⁻⁵. Las diluciones 1x10⁻⁴ y 1x10⁻⁵ se sembraron en cajas con LB o LB Ap (para las cepas transformadas con plásmido), IPTG 1 ó 2 mM y Cm 0-10 µg/ml. Las cajas se incubaron ~17 h a 37°C y, si no había colonias o estas se veían muy pequeñas, se continuó la incubación a ~22 h.

Ensayo de anti-terminación de la transcripción (goteo en cajas con LB Cm e IPTG)

Las cepas se crecieron durante toda la noche (~14 h) a 37 °C en LB Tc (tetraciclina) 10 µg/ml (cepa RL211) o Tc/Ap (cepa RL211 transformada con plásmido). A la mañana siguiente, se diluyeron a OD₅₅₀ 0.02 y se crecieron hasta OD₅₅₀ 0.5-0.8. Todos los cultivos se llevaron con LB a la misma OD. Una parte del cultivo se utilizó para hacer diluciones 10⁻¹-10⁻⁴, de las cuales se gotearon 5 µl en cajas con LB, Cm (0, 5 ó 8 µg/ml) e IPTG (0, 0.5 ó 1 mM); estas cajas se incubaron a 37°C durante 1-2 días; otra parte del cultivo se utilizó para inocular LB con Cm (Cloranfenicol) 0 ó 5 µg/ml e IPTG 0 ó 1 mM. Estos cultivos se incubaron a 37°C (280-300 rpm) y se crecieron a fase exponencial (OD_{550nm} 0.7) o a fase estacionaria (OD_{550nm} ≥ 1). Posteriormente estos cultivos se utilizaron para extraer proteína o RNA, para su análisis por experimentos tipo western o por qPCR.

Preparación de células electro-competentes de *E. coli*

Se inocularon 3 ml de LB sin antibiótico con una colonia de *E. coli* ER2566 y se incubaron a 37°C toda la noche. Con 2.5 ml de este cultivo se sembraron 500 ml de LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C hasta que llegó a una OD₆₀₀ de 0.66 (Spectrophotometer, Beckman), se enfriaron en hielo 10-15 min, se centrifugaron a 5,000 rpm, a 4 °C durante 10 min (JA-10, Beckman y, la pastilla de células se resuspendió en 5 ml de agua estéril enfriada en hielo. A esta pastilla se adicionaron 500 ml de agua estéril fría y se centrifugó como antes, se descartó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 5 ml de agua estéril fría. Después se adicionaron 250 ml de agua estéril fría, se centrifugó como antes, se descartó el sobrenadante. La pastilla de células se resuspendió en 10 ml de glicerol 10 % estéril y frío, se mezcló bien y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, se centrifugaron a 4800 rpm, a 4 °C durante 10 min (S4180, Beckman), se descartó el sobrenadante y se adicionaron 2 ml de glicerol 10 % estéril. Para alicuotar, los tubos Eppendorf se colocaron en hielo seco, ya que estuvieron fríos, se les adicionaron 40 µl de las células tratadas y se guardaron a -70°C.

Ensayo de choque de frío y recuperación en la cepa de *E. coli* BX04

Para iniciar el cultivo se inocularon con las cepas de interés 3 mL de medio Luria (LB) adicionado con antibióticos de acuerdo al genotipo de la cepa (para la cepa BX04 se puso tetraciclina, 10 µg/ml, y para la cepa BX04 transformada con el plásmido pTRC:PvLEA6 ó pTRC99A se usaron tetraciclina y ampicilina, 10 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente). Como control negativo se usó la cepa BX04 transformada con el vector vacío o sin vector y, como control positivo se usó una cepa silvestre de *E. coli* K-12 (MG1665).

Después del crecimiento durante toda la noche, las cepas se re-inocularon en tubos con LB (3 ml) con antibióticos, usando 20 µl de pre-inóculo para el caso de las cepas que tienen el fondo BX04 y 12 µl para la cepa silvestre. Esta diferencia se debió a que la cepa mutante BX04 tiene una velocidad de crecimiento menor que la cepa silvestre. Estas cepas se incubaron con agitación a 250-280 rpm a 37°C durante 2 horas o hasta que alcanzaron una OD de 0.4-0.5.

Los cultivos se ajustaron a la misma OD con LB o agua, y de estos cultivos se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10 000 (100 µl de cultivo en 900 µl de LB). Estas diluciones se gotearon (5 ó 10 µl) en cajas con LB y LB con IPTG. Para la mayoría de los ensayos se usaron las concentraciones de 10, 25 y 100 µM de IPTG (aunque también se probaron 0.5, 1 y 2 mM).

Las cajas se incubaron a 15°C (incubadora marca: Heraeus Instruments) durante 5 días. Una vez transcurrido este tiempo se cambiaron a una incubadora (New Brunswick Scientific, Excella E25) a 25°C durante 18-22 horas. Finalmente, se fotodocumentaron los resultados.

REFERENCIAS

- Bae, W., B. Xia, M. Inouye and K. Severinov (2000). "Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7784-7789.
- Baker, J., C. Van Dennsteele and L. Dure, 3rd (1988). "Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton." *Plant Mol Biol* **11**(3): 277-291.
- Battaglia, M., Y. Olvera-Carrillo, A. Garcarrubio, F. Campos and A. A. Covarrubias (2008). "The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins." *Plant Physiol* **148**(1): 6-24.
- Boyer, J. S. (1982). *Plant Productivity and Environment*. Science.
- Bravo, L. A., T. J. Close, L. J. Corcuera and C. L. Guy (1999). "Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation." *Physiologia Plantarum* **106**(2): 177-183.
- Bray, E. A. (1997). "Plant responses to water deficit." *Trends in Plant Science* **2**(2): 48-54.
- Carrari, F., A. R. Fernie and N. D. Iusem (2004). "Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story." *Trends Plant Sci* **9**(2): 57-59.

Castiglioni, P., D. Warner, R. J. Bensen, D. C. Anstrom, J. Harrison, M. Stoecker, M. Abad, G. Kumar, S. Salvador, R. D'Ordine, S. Navarro, S. Back, M. Fernandes, J. Targolli, S. Dasgupta, C. Bonin, M. H. Luethy and J. E. Heard (2008). "Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions." *Plant Physiol* **147**(2): 446-455.

Chakrabortee, S., R. Tripathi, M. Watson, G. S. K. Schierle, D. P. Kurniawan, C. F. Kaminski, M. J. Wise and A. Tunnacliffe (2012). "Intrinsically disordered proteins as molecular shields." *Molecular Biosystems* **8**(1): 210-219.

Chen, K., Z. Liu and N. R. Kallenbach (2004). "The polyproline II conformation in short alanine peptides is noncooperative." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15352-15357.

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

Coetzee, T., D. Herschlag and M. Belfort (1994). "Escherichia coli proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones." *Genes Dev* **8**(13): 1575-1588.

Colmenero-Flores, J. M., L. P. Moreno, C. E. Smith and A. A. Covarrubias (1999). "Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings." *Plant Physiol* **120**(1): 93-104.

Cordin, O., J. Banroques, N. K. Tanner and P. Linder (2006). "The DEAD-box protein family of RNA helicases." *Gene* **367**: 17-37.

Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou and F. Sarhan (1998). "Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat." *Plant Cell* **10**(4): 623-638.

Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J Biomol NMR* **6**(3): 277-293.

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

Dure, L. r. (1993). "Structural motifs in LEA proteins." *In TJ Close, EA Bray, eds, Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. American Society of Plant Physiologists:* 91-103.

Fancy, D. A. and T. Kodadek (1999). "Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6020-6024.

Ferreon, A. C., J. C. Ferreon, P. E. Wright and A. A. Deniz (2013). "Modulation of allostery by protein intrinsic disorder." *Nature* **498**(7454): 390-394.

Frye, J. J., N. G. Brown, G. Petzold, E. R. Watson, C. R. Grace, A. Nourse, M. A. Jarvis, R. W. Kriwacki, J. M. Peters, H. Stark and B. A. Schulman (2013). "Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown." *Nat Struct Mol Biol* **20**(7): 827-835.

Galau, G., D. W. Hughes and L. Dure, III (1986). "Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs." *Plant Molecular Biology* **7**(3): 155-170.

Galloway Salvo, J. L., T. Coetzee and M. Belfort (1990). "Deletion-tolerance and trans-splicing of the bacteriophage T4 td intron. Analysis of the P6-L6a region." *J Mol Biol* **211**(3): 537-549.

Gally, J. A. and G. M. Edelman (1962). "The effect of temperature on the fluorescence of some aromatic amino acids and proteins." *Biochim Biophys Acta* **60**: 499-509.

Garay-Arroyo, A., J. M. Colmenero-Flores, A. Garciarrubio and A. A. Covarrubias (2000). "Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit." *J Biol Chem* **275**(8): 5668-5674.

Gentile, F., P. Amodeo, F. Febbraio, F. Picaro, A. Motta, S. Formisano and R. Nucci (2002). "SDS-resistant active and thermostable dimers are obtained from the dissociation of homotetrameric beta-glycosidase from hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* in SDS. Stabilizing role of the A-C intermonomeric interface." *J Biol Chem* **277**(46): 44050-44060.

Georgakopoulou, S., D. Moller, N. Sachs, H. Herrmann and U. Aebi (2009). "Near-UV circular dichroism reveals structural transitions of vimentin subunits during intermediate filament assembly." *J Mol Biol* **386**(2): 544-553.

Giraudat, J. (1995). "Abscisic acid signaling." *Curr Opin Cell Biol* **7**(2): 232-238.

Goyal, K., L. Tisi, A. Basran, J. Browne, A. Burnell, J. Zurdo and A. Tunnacliffe (2003). "Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein." *J Biol Chem* **278**(15): 12977-12984.

Goyal, K., L. J. Walton and A. Tunnacliffe (2005). "LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress." *Biochem J* **388**(Pt 1): 151-157.

Gunasekaran, K., C. J. Tsai and R. Nussinov (2004). "Analysis of ordered and disordered protein complexes reveals structural features discriminating between stable and unstable monomers." *J Mol Biol* **341**(5): 1327-1341.

Huth, J. R., C. A. Bewley, M. S. Nissen, J. N. Evans, R. Reeves, A. M. Gronenborn and G. M. Clore (1997). "The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif." *Nat Struct Biol* **4**(8): 657-665.

Iakoucheva, L. M., C. J. Brown, J. D. Lawson, Z. Obradovic and A. K. Dunker (2002). "Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins." *J Mol Biol* **323**(3): 573-584.

Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E. A. Bray and M. Takagi (1996). "A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **170**(2): 243-248.

Ismail, A. M., A. E. Hall and T. J. Close (1999). "Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea." *Plant Physiol* **120**(1): 237-244.

Jiang, W., Y. Hou and M. Inouye (1997). "CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone." *J Biol Chem* **272**(1): 196-202.

Johnson, D. E., B. Xue, M. D. Sickmeier, J. Meng, M. S. Cortese, C. J. Oldfield, T. Le Gall, A. K. Dunker and V. N. Uversky (2012). "High-throughput characterization of intrinsic disorder in proteins from the Protein Structure Initiative." *J Struct Biol* **180**(1): 201-215.

Kalifa, Y., A. Gilad, Z. Konrad, M. Zaccari, P. A. Scolnik and D. Bar-Zvi (2004). "The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein." *Biochem J* **381**(Pt 2): 373-378.

Keller, R. (2004). *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* CANTINA Verlag.

Kjaergaard, M., A. B. Norholm, R. Hendus-Altenburger, S. F. Pedersen, F. M. Poulsen and B. B. Kragelund (2010). "Temperature-dependent structural changes in intrinsically disordered proteins: Formation of alpha-helices or loss of polyproline II?" *Protein Science* **19**(8): 1555-1564.

Kovacs, D., E. Kalmar, Z. Torok and P. Tompa (2008). "Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins." *Plant Physiol* **147**(1): 381-390.

Landick, R., J. Stewart and D. N. Lee (1990). "Amino acid changes in conserved regions of the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination." *Genes Dev* **4**(9): 1623-1636.

Lisse, T., D. Bartels, H. R. Kalbitzer and R. Jaenicke (1996). "The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state." *Biol Chem* **377**(9): 555-561.

Liyanage, M. R., K. Bakshi, D. B. Volkin and C. R. Middaugh (2014). "Fluorescence spectroscopy of peptides." *Methods Mol Biol* **1088**: 237-246.

Marley, J., M. Lu and C. Bracken (2001). "A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins." Journal of Biomolecular Nmr **20**(1): 71-75.

Mayer, O., L. Rajkowitsch, C. Lorenz, R. Konrat and R. Schroeder (2007). "RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the E. coli protein StpA." Nucleic Acids Res **35**(4): 1257-1269.

Minton, A. P. (2000). "Implications of macromolecular crowding for protein assembly." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 34-39.

Minton, A. P. (2001). "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media." J Biol Chem **276**(14): 10577-10580.

Minton, A. P. (2005). "Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited." Biophys J **88**(2): 971-985.

Mohan, A., C. J. Oldfield, P. Radivojac, V. Vacic, M. S. Cortese, A. K. Dunker and V. N. Uversky (2006). "Analysis of molecular recognition features (MoRFs)." J Mol Biol **362**(5): 1043-1059.

Moreno-Fonseca, L. P. and A. A. Covarrubias (2001). "Downstream DNA sequences are required to modulate Pvlea-18 gene expression in response to dehydration." Plant Mol Biol **45**(5): 501-515.

Mouillon, J. M., S. K. Eriksson and P. Harryson (2008). "Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse." Plant Physiol **148**(4): 1925-1937.

Mouillon, J. M., P. Gustafsson and P. Harryson (2006). "Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments." Plant Physiol **141**(2): 638-650.

Nakaminami, K., D. T. Karlson and R. Imai (2006). "Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 10122-10127.

Oldfield, C. J., Y. Cheng, M. S. Cortese, C. J. Brown, V. N. Uversky and A. K. Dunker (2005). "Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins." Biochemistry **44**(6): 1989-2000.

Oldfield, C. J., J. Meng, J. Y. Yang, M. Q. Yang, V. N. Uversky and A. K. Dunker (2008). "Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners." BMC Genomics **9 Suppl 1**: S1.

Olvera-Carrillo, Y., F. Campos, J. L. Reyes, A. Garcarrubio and A. A. Covarrubias (2010). "Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis." Plant Physiol **154**(1): 373-390.

Olvera-Carrillo, Y., J. Luis Reyes and A. A. Covarrubias (2011). "Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water limiting environments." Plant Signal Behav **6**(4): 586-589.

Park, S. H., W. Shalongo and E. Stellwagen (1997). "The role of PII conformations in the calculation of peptide fractional helix content." Protein Sci **6**(8): 1694-1700.

Pazos, F., N. Pietrosemoli, J. A. Garcia-Martin and R. Solano (2013). "Protein intrinsic disorder in plants." Front Plant Sci **4**: 363.

Perkins, J. R., I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees and C. Orengo (2010). "Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties." Structure **18**(10): 1233-1243.

Pesce, M. A. and C. S. Strande (1973). "A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine." Clin Chem **19**(11): 1265-1267.

Phadtare, S., M. Inouye and K. Severinov (2002). "The nucleic acid melting activity of Escherichia coli CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells." J Biol Chem **277**(9): 7239-7245.

Phadtare, S. and K. Severinov (2005). "Nucleic acid melting by Escherichia coli CspE." Nucleic Acids Res **33**(17): 5583-5590.

Plys, A. J., M. V. Rogacheva, E. C. Greene and E. Alani (2012). "The unstructured linker arms of Mlh1-Pms1 are important for interactions with DNA during mismatch repair." J Mol Biol **422**(2): 192-203.

Rajesh, S. and A. Manickam (2006). "Prediction of functions for two LEA proteins from mung bean." Bioinformatics **1**(4): 133-138.

Rajkowitsch, L., D. Chen, S. Stampfl, K. Semrad, C. Waldsich, O. Mayer, M. F. Jantsch, R. Konrat, U. Blasi and R. Schroeder (2007). "RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases." RNA Biol **4**(3): 118-130.

Rajkowitsch, L. and R. Schroeder (2007). "Coupling RNA annealing and strand displacement: a FRET-based microplate reader assay for RNA chaperone activity." Biotechniques **43**(3): 304, 306, 308 passim.

Rajkowitsch, L., K. Semrad, O. Mayer and R. Schroeder (2005). "Assays for the RNA chaperone activity of proteins." Biochem Soc Trans **33**(Pt 3): 450-456.

Receveur-Brechot, V., J. M. Bourhis, V. N. Uversky, B. Canard and S. Longhi (2006). "Assessing protein disorder and induced folding." Proteins **62**(1): 24-45.

Rein, A., L. E. Henderson and J. G. Levin (1998). "Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication." Trends Biochem Sci **23**(8): 297-301.

Reyes J.L. Rodrigo, C.-F. J. M., Gil J.V., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D., Covarrubias A.A. (2005). "Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro." Plant, Cell and Environment **28**: 709-718.

Reyes, J. L., M.-J. Rodrigo, J. M. Colmenero-Flores, J.-V. Gil, A. Garay-Arroyo, F. Campos, F. Salamini, D. Bartels and A. A. Covarrubias (2005). "Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro." Plant, Cell & Environment **28**(6): 709-718.

Rucker, A. L. and T. P. Creamer (2002). "Polyproline II helical structure in protein unfolded states: lysine peptides revisited." Protein Sci **11**(4): 980-985.

Russell, R. (2008). "RNA misfolding and the action of chaperones." Front Biosci **13**: 1-20.

Saavedra, L., J. Svensson, V. Carballo, D. Izmendi, B. Welin and S. Vidal (2006). "A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance." Plant J **45**(2): 237-249.

Sandhu, K. S. and D. Dash (2007). "Dynamic alpha-helices: conformations that do not conform." Proteins **68**(1): 109-122.

Sasaki, K., N. K. Christov, S. Tsuda and R. Imai (2014). "Identification of a novel LEA protein involved in freezing tolerance in wheat." Plant Cell Physiol **55**(1): 136-147.

Scopes, R. K. (1974). "Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm." Anal Biochem **59**(1): 277-282.

Shi, Z., K. Chen, Z. Liu, A. Ng, W. C. Bracken and N. R. Kallenbach (2005). "Polyproline II propensities from GGXGG peptides reveal an anticorrelation with beta-sheet scales." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 17964-17968.

Shi, Z., C. A. Olson, G. D. Rose, R. L. Baldwin and N. R. Kallenbach (2002). "Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9190-9195.

Shih, M.-D., F. A. Hoekstra and Y.-I. C. Hsing (2008). Late Embryogenesis Abundant Proteins. Advances in Botanical Research. K. Jean-Claude and D. Michel, Academic Press. **Volume 48**: 211-255.

Shih, M. D., T. Y. Hsieh, T. P. Lin, Y. I. Hsing and F. A. Hoekstra (2010). "Characterization of two soybean (*Glycine max* L.) LEA IV proteins by circular dichroism and Fourier transform infrared spectrometry." Plant Cell Physiol **51**(3): 395-407.

Shih, M. D., S. C. Lin, J. S. Hsieh, C. H. Tsou, T. Y. Chow, T. P. Lin and Y. I. Hsing (2004). "Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16." Plant Mol Biol **56**(5): 689-703.

Soulages, J. L., K. Kim, E. L. Arrese, C. Walters and J. C. Cushman (2003). "Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure." Plant Physiol **131**(3): 963-975.

Soulages, J. L., K. Kim, C. Walters and J. C. Cushman (2002). "Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean." Plant Physiol **128**(3): 822-832.

Souza, J. M., B. I. Giasson, Q. Chen, V. M. Lee and H. Ischiropoulos (2000). "Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies." J Biol Chem **275**(24): 18344-18349.

Sugase, K., H. J. Dyson and P. E. Wright (2007). "Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein." Nature **447**(7147): 1021-1025.

Sun, X., E. H. Rikkerink, W. T. Jones and V. N. Uversky (2013). "Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology." Plant Cell **25**(1): 38-55.

Swire-Clark, G. A. and W. R. Marcotte, Jr. (1999). "The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*." Plant Mol Biol **39**(1): 117-128.

Tiffany, M. L. and S. Krimm (1969). "Circular dichroism of the "random" polypeptide chain." Biopolymers **8**(3): 347-359.

Tiffany, M. L. and S. Krimm (1973). "Extended conformations of polypeptides and proteins in urea and guanidine hydrochloride." Biopolymers **12**(3): 575-587.

Tolte, D., M. Jaquinod, C. Mangavel, C. Passirani, P. Saulnier, S. Manon, E. Teyssier, N. Payet, M. H. Avelange-Macherel and D. Macherel (2007). "Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation." Plant Cell **19**(5): 1580-1589.

Tompa, P. (2005). "The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins." FEBS Lett **579**(15): 3346-3354.

Tompa, P. (2012). "Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap." Trends Biochem Sci **37**(12): 509-516.

Tompa, P. and P. Csermely (2004). "The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones." Faseb J **18**(11): 1169-1175.

Tompa, P., C. Szasz and L. Buday (2005). "Structural disorder throws new light on moonlighting." Trends Biochem Sci **30**(9): 484-489.

Velazquez-Campoy, A., S. A. Leavitt and E. Freire (2004). "Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry." Methods Mol Biol **261**: 35-54.

Wentzel, C., J. E. Sommer, R. Nair, A. Stiefvater, J. B. Sibarita and P. Scheiffele (2013). "mSYD1A, a mammalian synapse-defective-1 protein, regulates synaptogenic signaling and vesicle docking." Neuron **78**(6): 1012-1023.

Wolkers, W. F., S. McCready, W. F. Brandt, G. G. Lindsey and F. A. Hoekstra (2001). "Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro." Biochim Biophys Acta **1544**(1-2): 196-206.

Wu, X., F. Gong and W. Wang (2013). "Functional assignment to maize group 1 LEA protein EMB564 within the cell nucleus using computational analysis." Bioinformatics **9**(6): 276-280.

Xia, B., H. Ke and M. Inouye (2001). "Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **40**(1): 179-188.

APENDICE

Secuencia 3' 170 (3' UTR del gen PvLEA6, 170 nt (en negritas), transcrito a partir del promotor T7 en el plásmido pKS y digerido con la enzima XhoI). 293 nt.

**GGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG
GTGCAGGAATTCGATCTCCCTGAATTTACACCACCTCCTACACTGCCCTAATAAAATCT
ATTATTACACGTTTTAAATTTCCATGTACTCTATTCTGCTTTTCTTTTCGATCATGACATG
TTGGCTAAATCCTTTTTTTGTTGTTGCAAATTTAGATATGATGTTGTAGTGCTGATACAA
TGGATCCCCCGGGTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGA**

Secuencia 3' UTR NOS (3' UTR del gen NOS, 263 nt (en negritas), transcrito a partir del promotor T7 en el plásmido pKS y digerido con la enzima XhoI). 317 nt.

**GGGCGAATTGGAGCTCTTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGA
TTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTGAG
CATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGA
GTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGG
ATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGGAATTCGATATCAAGCT
TATCGATACCGTCGACCTCGA**

Secuencia transcrita a partir de plásmido pKS (vacío) digerido con enzima XhoI, a partir del promotor T7. 98 nt.

**GGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG
GCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACC**