



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON *PvNod22*,
UNA PEQUEÑA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE *Phaseolus vulgaris* L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIÓL. CYNTHIA GEMALIT MARTÍNEZ CENTENO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. CLAUDIA DÍAZ CAMINO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. LUIS CÁRDENAS TORRES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. MAYO, 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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 19 del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Claudia Díaz Camino. Agradecemos el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología al proyecto 177207. Así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo otorgado al proyecto IN201412.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Dr. Federico Sánchez Rodríguez por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo y por todas sus enseñanzas.

A mi tutora, Dra. Claudia Díaz Camino, por todas sus enseñanzas, la paciencia y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial, integrado por la Dra. Liliana Pardo López y el Dr. Luis Cárdenas Torres, por sus comentarios siempre enriquecedores.

Al M. en C. Jonathan Israel Rodríguez López, a la M. en B. Georgina Estrada Navarrete, al M. en B. Juan Elías Olivares Grajales, a la M. en C. Claudia Virginia Dorantes y a la Biól. Elda Patricia Rueda Benítez por su apoyo técnico.

A mi comité evaluador, integrado por: Dra. Gladys Iliana Cassab López, Dr. José Luis Reyes Taboada, Dr. Carlos Amero Tello, Dra. Svetlana Shishkova y Dr. Tomás David López Díaz.

También agradezco a:

A mis padres Leonel y Ángeles, por su apoyo y amor incondicional, por hacerme creer que todos los sueños son posibles; que con perseverancia cualquier meta se alcanza, y que la honestidad, la humildad y el respeto son los valores más importantes; a mis hermanitas Mimí y Paty, la alegría de mi vida.

A Dan, por todo su amor y apoyo durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos de siempre: Jimena, Vale, Omar, Nidis, Víctor y Edgar.

A todas las personas del Laboratorio 19 del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM: Jonás, Juan, Geo, Gabriel, Alexxa, Claudita, Nefty, Xóchitl, Ale, Pablo, Lucio, Ezequiel, Chandru y al colado del laboratorio vecino, Ramcés, por convertirse en mi segunda familia, los quiero.

*Dedico esta tesis con todo el amor a Leonel,
Ángeles, Mimi y Paty, las cuatro luces que
siempre me han iluminado.*

SÍNTESIS

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, a través de la interacción simbiótica que se establece entre diversas plantas leguminosas con bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, induce condiciones estresantes en la planta hospedera (Van Loon *et al.*, 1998). Una estrategia común en los seres vivos que les permite contender con el estrés ambiental es la síntesis de chaperonas moleculares, proteínas ubicuas dentro de las células que contienden con la desnaturalización de otras proteínas provocada por diversos tipos de estrés (Timperio *et al.*, 2008; Hofmann, 2009). Dentro de este diverso grupo de proteínas se encuentran las pequeñas proteínas de choque térmico (o sHsps), que a diferencia de las proteínas de choque térmico de alto peso molecular (HSPs), no requieren de la hidrólisis de ATP para realizar su función biológica (Liberek *et al.*, 2008). Se ha propuesto que estas proteínas interaccionan con péptidos no nativos con la finalidad de prevenir su agregación y, posteriormente, transferirlos a la maquinaria proteica que finalmente los replegará (Lee *et al.*, 2000; Liberek *et al.*, 2008).

En este trabajo nos hemos planteado identificar a las proteínas que interaccionan con la sHsp Nodulina 22 (*PvNod22*) y así establecer una hipótesis sobre su participación en un proceso biológico. El gen *Pvnod22* fue aislado en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez del Instituto de Biotecnología de la UNAM a partir de una librería de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) derivada de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Negro Jamapa) inoculadas con uno de sus simbioses naturales, *Rhizobium etli* cepa CE3 (Mohammad *et al.*, 2004). El transcrito *Pvnod22* también se acumula en polen y bajo condiciones de estrés oxidativo y de estrés por calor en la planta (Mohammad *et al.*, 2004; Rodríguez-López *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* la función de chaperona molecular de la proteína *PvNod22* recombinante y se propone que esta proteína reside en el retículo endoplasmático (RE) (Rodríguez-López *et al.*, 2014). Durante este trabajo de maestría, se empleó el método de purificación de proteínas por afinidad en columna para tratar de obtener a los interactores de *PvNod22*, sin embargo, esta estrategia no fue favorable para resolver los objetivos del proyecto. No obstante, se logró establecer un protocolo de purificación y re-naturalización de la proteína *PvNod22* recombinante. Otra aportación del presente

trabajo fue la obtención una construcción para expresión en planta, que posiblemente permitirá la captura de los interactores directamente del complejo de proteínas formado *in vivo*.

ÍNDICE GENERAL

Portada	i
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
Síntesis	1
Índice general	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Lista de abreviaturas y símbolos	7
Introducción	11
Especies reactivas de oxígeno	14
EROs durante la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	15
Retículo endoplasmático	15
Estrés en el retículo endoplasmático	16
Proteínas de choque térmico	17
Pequeñas proteínas de choque térmico	18
Función de las sHsps	18
Estructura de las sHsps	19
Motivos conservados en las sHsps	22
Mecanismo de acción de las sHsps	22
sHsps en plantas	24
Antecedentes	28
Hipótesis	33
Objetivos	33
Material y métodos	34
Resultados	52
Discusión	66
Conclusiones	71
Perspectivas	72
Literatura citada	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de nodulación.	13
Figura 2. Organización estructural típica de una sHsp.	20
Figura 3. Hipótesis del mecanismo de acción de las sHsp.	23
Figura 4. Co-localización de Nodulina 22 con los marcadores específicos para ER y aparato de Golgi.	29
Figura 5. Fenotipo foliar observado en plantas silenciadas en la expresión de <i>Pvnod22</i> de frijol mediante el sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).	31
Figura 6. Perfil de proteínas del proceso de purificación y re-naturalización de <i>PvNod22</i> a partir de cuerpos de inclusión formados en <i>E. coli</i> y re-solubilizados en 8 M de urea.	52
Figura 7. Perfil de proteínas obtenidas por un proceso de purificación de <i>PvNod22</i> en 4 M de urea, e imidazol como agente eluyente, en una solución no ácida.	53
Figura 8. Rendimiento de purificación de <i>PvNod22</i> .	54
Figura 9. Migración de <i>PvNod22</i> en gel.	54
Figura 10. Perfil electroforético de posibles interactores de <i>PvNod22</i> .	55
Figura 11. Perfil de elución de proteínas de hoja de frijol, en presencia de Ca ²⁺ , estrés por calor y estrés oxidativo, unidas a <i>PvNod22</i> .	56
Figura 12. Representación de la etiqueta TAP.	58
Figura 13. Amplificación del gen <i>Pvnod22</i> sin codón de paro.	58
Figura 14. Amplificación del gen <i>Pvnod22</i> más sitios <i>attL</i> 1 y 2.	59
Figura 15. Patrón de restricción de la construcción pENTR- <i>pvnod22</i> .	60
Figura 16. Amplificación del fragmento ps más sitios <i>attL</i> 1 y 2.	60
Figura 17. PCR en gradiente del gen <i>Pvnod22</i> .	61
Figura 18. PCR en colonia para corroborar direccionalidad correcta del inserto <i>Pvnod22</i> .	61
Figura 19. Análisis de la construcción pENTR- <i>Pvnod22</i> mediante PCR y restricción.	62

Figura 20. PCR en colonia de clonas con los insertos de interés en el vector binario pEarleyGate 205.	63
Figura 21. Resultados obtenidos tras la amplificación de DNA por PCR para verificar la presencia de las construcciones 35S:Pvnod22: TAP y 35S: PvPs:TAP en <i>A. rhizogenes</i> .	63
Figura 22. Generación de raíces pilosas en frijol mediada por <i>A. rhizogenes</i> y extracción del RNA de las plantas.	64
Figura 23. Verificación de la integridad del cDNA de las plantas transgénicas de frijol mediante PCR punto final.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Estímulos que inducen la expresión de sHsp en plantas.	26
Tabla II. Concentración final de antibióticos adicionados al medio.	36
Tabla III. Oligonucleótidos empleados en las diversas reacciones de PCR.	46
Tabla IV. Resultados de secuenciación de proteínas provenientes del ensayo de interacción.	57

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS EMPLEADOS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACD	Dominio del cristalino alfa
APS	Persulfato de amonio
ASC	Ascorbato
ATG	Codón de inicio (adenina, timina, guanina)
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
Cl,II,etc.	Clase citosólica (de la I a la VI)
C	Carboxilo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CP	Clase del cloroplasto
CRI	Región consenso uno
CRII	Región consenso dos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Clase del retículo endoplasmático
ERAD	Degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático
ERO(s)	Especies reactivas de oxígeno
<i>et al.</i>	Y otros
Fc	Fracción cristalizable
GPXs	Glutación peroxidasas
GSH	Glutación
G-V-L	Glicina, valina y leucina
HSP(s)	Proteína(s) de choque térmico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRES	Sitio de entrada interno del ribosoma
L.	Linneo
LB	Caldo de lisogenia o medio Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en secuencia continua
M	Clase Mitocondrial
N	Amino

NaOH	Hidróxido de sodio
NF(s)	Factores de nodulación o factores Nod
Ni-NTA	Níquel-ácido nitriloacético
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
P-G	Prolina, glicina
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ProtA	Proteína A
PRXs	Peroxirredoxinas
<i>Pvnod22</i>	Gen Nodulina 22
<i>PvNod22</i>	Proteína Nodulina 22
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PX	Clase del peroxisoma
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
S.O.C	Medio super-óptimo con represión catabólica
SDS	Dodecilsulfato sódico
sHsp(s)	Pequeñas proteínas de choque térmico
TBS-T	Tris Buffer salino – Tritón
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
UTR	Región sin traducir
U	Unidades de actividad enzimática
UV	Luz ultravioleta
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus
V/I/L-X-I/V/L	Valina o isoleucina o leucina, cualquier aminoácido, isoleucina o valina o leucina
var.	Variedad
vol.(s.)	Volumen (es)
WT	Tipo silvestre

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca ²⁺	Calcio
Da	Dalton

f	femto (10^{-12})
Fe	hierro
g	gramos
<i>g</i>	<i>intensidad gravitacional</i>
h	horas
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
k	Kilo (10^3)
KCl	Cloruro de potasio
l	Litro
μ	micro
m	mili (10^{-3})
min	minutos
M	Molar
n	nano (10^{-9})
N ₂	Nitrógeno diatómico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sodio monobásico
NH ₃	Amoniaco
NO ₃ ⁻	Ión nitrato
Mo	molibdeno
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
O ₂ ^{-•}	Anión superóxido
pH	logaritmo negativo del potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
TM	Marca comercial
V	vanadio
V	Voltio
x	por
α	Alfa
β	Beta
μ	Micro (10^{-6})
-	Menos
®	Marca comercial registrada
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius

~

Aproximadamente

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los elementos químicos más importantes para los seres vivos, ya que es componente esencial de moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas. Cerca del 78% de la atmósfera es nitrógeno diatómico (N_2), una forma química incapaz de ser utilizada para la construcción de dichas moléculas. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado por organismos vivos, se requiere de su conversión a amoníaco (NH_3). Este proceso conocido como fijación de nitrógeno se puede dar de manera industrial, a través de la reacción de Haber-Bosch, o de manera biológica gracias a la acción de algunos miembros de la familia de enzimas nitrogenasas (Howard *et al.*, 1996; Oldroyd *et al.*, 2011).

Las nitrogenasas son, generalmente, un complejo enzimático de dos componentes, cada uno de los cuales cuenta con iones metálicos para su función catalítica, dichos iones pueden ser hierro (Fe), molibdeno (Mo) o vanadio (V), siendo las Mo-nitrogenasas las más abundantes en la naturaleza y consecuentemente las mejor estudiadas. Esta enzima se compone de: un heterotetrámero que contiene un conjunto de iones Mo y Fe, de ahí que se le otorgue el nombre de proteína MoFe; y de un homodímero que posee iones Fe, por lo que se conoce como proteína Fe. Ambos componentes contienen conjuntos de hierro y azufre (Fe-S) que son indispensables para la reducción del N_2 en NH_3 (Lee *et al.*, 2014).

La enzima nitrogenasa está presente en bacterias tanto de vida libre como en bacterias que tienen la capacidad de establecer relaciones simbióticas (El término simbiosis [del griego: σύν, syn, 'con'; y βίωσις, biosis, 'vivir'] fue acuñado en 1879 por el botánico alemán Anton de Bary para describir "la vida en conjunción de dos organismos disímiles, normalmente en íntima asociación, y por lo general con efectos benéficos para al menos uno de ellos" [de Bary, 1879; citado por Relman, 2008]) con otros organismos, sobre todo con plantas leguminosas. A estos microorganismos fijadores de nitrógeno se les conoce con el nombre genérico de diazótrofos. Dentro del diverso grupo de los diazótrofos, se encuentran bacterias del Phylum Proteobacteria, entre ellas las pertenecientes al género *Rhizobium*, que establecen exitosas relaciones simbióticas con plantas leguminosas como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Geurts y Bisseling,

2002).

La capacidad de los diazótrofos para usar gas nitrógeno como única fuente de nitrógeno y de participar en simbiosis con plantas leguminosas tiene un profundo impacto agronómico, económico y ecológico, ya que alivia la limitación de nitrógeno en el suelo de ecosistemas naturales y agrícolas (Vance, 2001; Zehr *et al.*, 2003), y ha resultado crucial en la dispersión de las plantas leguminosas alrededor del mundo. Sin embargo, esta simbiosis también incurre en penalizaciones fisiológicas, porque la fijación biológica de nitrógeno es sensible al oxígeno y depende de energía. En consecuencia, este proceso está finamente regulado a nivel transcripcional por sofisticadas redes de regulación que responden a múltiples señales ambientales.

La interacción simbiótica entre plantas leguminosas y *Rhizobium* inicia como un “diálogo molecular” que resulta en la generación de un nuevo órgano en la raíz, el nódulo (Ferguson *et al.*, 2010). Todas las plantas leguminosas secretan de sus raíces compuestos químicos llamados flavonoides que son reconocidos por el (los) producto (s) del gen *nodD* de una cepa infectiva de *Rhizobium*. El reconocimiento de flavonoides induce en la bacteria la transcripción de una serie de genes, denominados *nod*, cuyos productos finales son moléculas específicas de señalización, los factores Nod (NFs), que son secretados a la rizósfera (Brewin, 2002; Limpens y Bisseling, 2003). Los NFs son lipo-quitina-oligosacáridos que actúan como morfógenos en la planta receptora (Stougaard, 2001) y son los responsables de los procesos de iniciación del nódulo, ya que permiten la inducción de la división de las células corticales y la colonización celular, así como la re-organización del crecimiento de la pared celular en células de la epidermis y de los pelos radicales (Brewin, 2002). La entrada de la bacteria se da a través de los pelos radicales y se inicia cuando se enrolla el pelo radical y se lleva a cabo la posterior formación de una estructura tubular conocida como hilo de infección que se extiende hasta la corteza de la raíz (Geurts y Bisseling, 2002., Figura 1). Simultáneamente se llevan a cabo divisiones celulares, principalmente en las células corticales de la raíz, para formar un primordio de nódulo; las bacterias se multiplican en

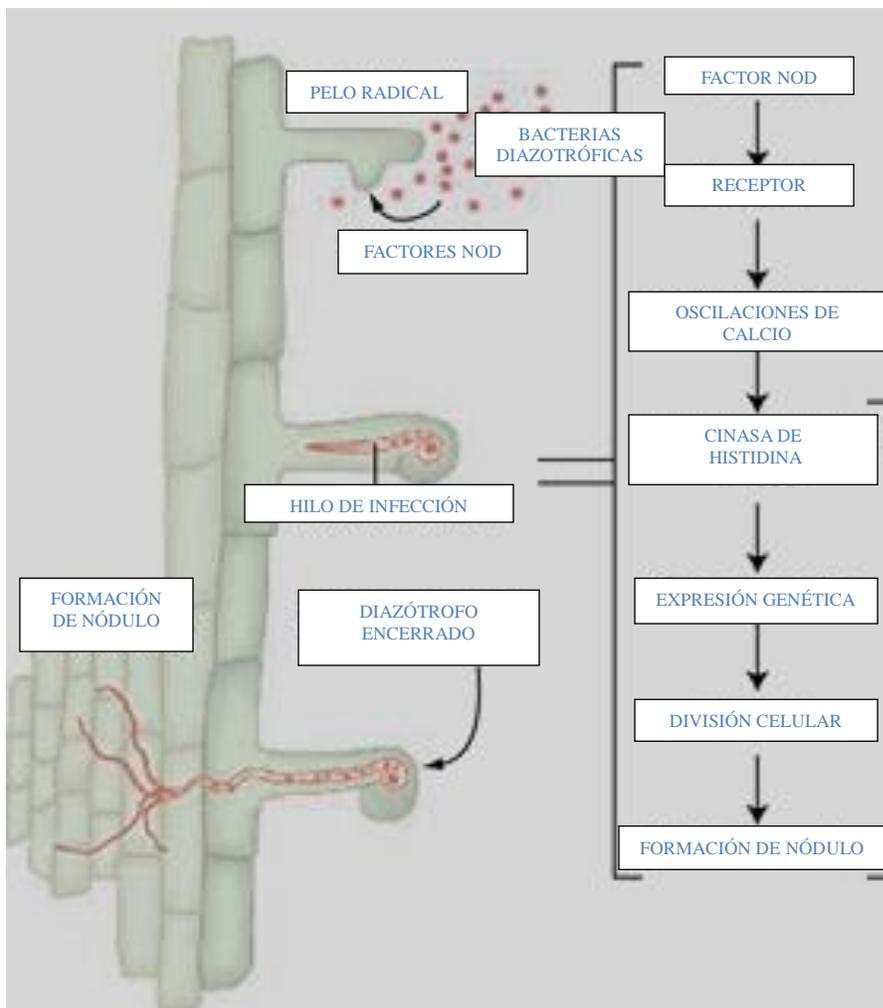


Figura 1. Esquema del proceso de nodulación. La formación del nódulo inicia como un diálogo entre planta y bacteria, a través de la secreción de flavonoides y factores Nod respectivamente, para dar paso a la formación de un hilo de infección. A la par se induce una cascada de señalización que culmina en la formación de un nódulo maduro donde se alojarán bacteroides capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Tomado y modificado de Downie, 2007.

los hilos de infección y posteriormente dentro de las células vegetales se diferencian a bacteroides (forma especializada de la bacteria para fijar nitrógeno bajo condiciones de anaerobiosis), los cuales se encuentran rodeados por la membrana peribacteroidal que proviene de la planta (Geurts y Bisseling, 2002., Figura 1). Es en este momento cuando se da lugar a un nódulo maduro (Geurts y Bisseling, 2002., Figura 1).

Gracias a que se requieren condiciones fuertemente reductoras para llevar a cabo la fijación del nitrógeno y a la actividad de proteínas como ferredoxina, uricasa, hidrogenasa y leghemoglobina, una hemoproteína acarreadora de oxígeno, los nódulos presentan un alto potencial para producir especies reactivas de oxígeno (EROs), (Puppo *et al.*, 1997). La leghemoglobina es muy abundante en los nódulos y se encarga de asegurar que los bacteroides reciban la cantidad adecuada de oxígeno para poder

llevar a cabo la respiración pero sin afectar la actividad de la nitrogenasa. Durante la realización de su función esta hemoproteína es sometida a un proceso de auto-oxidación, lo cual provoca la formación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Puppo *et al.*, 1981).

Especies reactivas de oxígeno

Las EROs son moléculas derivadas del oxígeno que pueden fácilmente oxidar a otras moléculas (Sena y Chandel, 2012). En este grupo se incluye al singulete de oxígeno ($O_2 [a^1\Delta_g]$), al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Chang *et al.*, 2009). El $O_2^{\cdot-}$, es generado por la reducción de O_2 por un electrón; posteriormente el $O_2^{\cdot-}$ es convertido a H_2O_2 por las enzimas superóxido dismutasas (SODs) (Sena y Chandel, 2012).

Las EROs están presentes en la célula a niveles basales y son parte de sus procesos metabólicos normales (Puppo *et al.*, 1997). Desempeñan un papel fundamental como moléculas señalizadoras de procesos celulares como: diferenciación, autofagia, adaptación metabólica y activación de células del sistema inmune (Sena y Chandel, 2012), así como en la defensa ante estrés biótico y abiótico en plantas (Apel y Hirt, 2004). Sin embargo, cuando los niveles de EROs se incrementan pueden causar estrés oxidativo, el cual provoca efectos adversos sobre carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; ésto puede inducir otros tipos de estrés en la célula y culminar en una degeneración progresiva e incluso la muerte (Puppo *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2000). Se ha reportado que durante la recuperación posterior a estrés por calor, en plantas de *Arabidopsis thaliana*, se induce la generación de EROs y que la señalización por Ca^{2+} es requerida para hacer frente al daño oxidativo provocado por acción de estas moléculas (Larkindale y Knight, 2002).

La detoxificación de EROs está a cargo tanto de componentes enzimáticos como no enzimáticos. La defensa enzimática incluye a aquellas proteínas que se encargan de convertir el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 : SOD1 (espacio intermembranal de la mitocondria y citosol), SOD2 (matriz mitocondrial) y SOD3 (matriz extracelular); así como a aquellas que remueven el H_2O_2 : peroxirredoxinas (PRXs), glutatión peroxidasas (GPXs) y la catalasa

(Sena y Chandel, 2012). La defensa no enzimática incluye a moléculas antioxidantes como: ascorbato (ASC), glutatión (GSH) y alfa-tocoferol (Chang *et al.*, 2009).

EROs durante la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa

Al igual que en varios procesos celulares, las EROs juegan un papel preponderante durante la interacción simbiótica *Rhizobium* – leguminosa. Hay evidencia que sugiere que la formación de EROs es un evento determinante para que el establecimiento de la interacción simbiótica puede llevarse a cabo (Chang *et al.*, 2009).

Se ha observado que si se inhibe la producción de EROs no hay enroscamiento del pelo radical ni formación de hilo de infección (Peleg- Grossman *et al.*, 2007); esto se ha asociado a la participación del H₂O₂ durante la formación de la pared celular así como en la regulación de la rigidez del hilo de infección (Cook *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que las EROs también son requeridas para la iniciación del nódulo (D’Haeze *et al.*, 2003). Finalmente, se ha propuesto que las EROs están implicadas en el fenómeno de senescencia del nódulo, ya que han sido detectadas rodeando a los simbiosomas durante este proceso (Rubio *et al.*, 2004).

Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) además de ser el punto de entrada al sistema endomembranal es un compartimento especializado en el plegamiento de proteínas (Jürgens, 2004). Éste requiere de un ambiente altamente oxidante debido a que durante el proceso de plegamiento de las proteínas se deben formar puentes disulfuro (Bhandary *et al.*, 2013). Otra función relevante del RE es ser el encargado de almacenar la mayor cantidad de calcio en las células (Stael *et al.*, 2011; Bhandary *et al.*, 2013). Alteraciones en el ambiente oxidativo de este compartimento así como en sus niveles de Ca²⁺ inducen la producción de EROs (Bhandary *et al.*, 2013). Otras fuentes implicadas en la producción de EROs en el RE son las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) y oxidorreductina-1 del RE (ERO-1), los complejos de NADPH oxidasas, así como el glutatión reducido y la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Sharma

et al., 2012; Bhandary *et al.*, 2013).

Estrés en el retículo endoplásmico

El RE es un organelo particularmente sensible a perturbaciones en su medio; es por ésto que diferentes agentes como los inhibidores de enzimas que dirigen la glicosilación de proteínas, así como químicos tóxicos y estrés oxidativo, pueden provocar estrés de RE (Rao *et al.*, 2004). Se denomina estrés de RE a la condición que se presenta por la agregación de proteínas mal plegadas, causada a su vez por la exposición de los dominios hidrofóbicos de dichas proteínas (Bhandary *et al.*, 2013). La célula responde a esta condición a través de dos vías principalmente: la degradación de proteínas asociada a RE (ERAD, por sus siglas en inglés) y la respuesta a proteínas no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) (Urade, 2007; Liu y Howell, 2010).

La ERAD es un fenómeno molecular que se ha descrito como parte del sistema de control de calidad de proteínas (Brandizzi *et al.*, 2003; Ahner *et al.*, 2007; Hedge y Ploegh, 2010) en el cual están implicadas las pequeñas proteínas de choque térmico (sHsps) (Ahner *et al.*, 2007; Kashlan *et al.*, 2007). Este mecanismo es el responsable de evitar la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE a través de la translocación de éstas hacia el citosol para su posterior degradación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (Brandizzi *et al.*, 2003; Kleizen y Braakman, 2004; Rao *et al.*, 2004; Brodsky, 2007; Hedge y Ploegh, 2010; Liu y Howell, 2010).

La UPR se caracteriza por la inducción de genes que, entre otros, codifican para chaperonas y para otras proteínas que previenen la agregación polipeptídica, participan en el plegamiento y el ensamblaje post-traduccionales de complejos proteicos y la degradación de proteínas. Además, la UPR provoca una atenuación transitoria en la tasa de síntesis de proteínas (Bertolotti *et al.*, 2000; Rutkowski y Kaufman, 2004; Liu y Howell, 2010). Mediante un análisis genómico y funcional, se ha revelado que la ERAD se incrementa durante la UPR, lo que genera un aumento en la tasa de translocación-degradación de proteínas (Travers *et al.*, 2000). Pero si con todos estos mecanismos moleculares encendidos, la UPR no tiene la capacidad para restablecer la homeostasis del RE, entonces se enciende una vía de muerte celular como última línea de defensa

(Yoshida, 2007).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, debido a la inducción de la UPR se incrementan las chaperonas moleculares residentes del RE (Travers *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2004) que ayudan a prevenir las interacciones inter-moleculares no productivas, evitando de esta manera la agregación de proteínas dentro de este compartimento subcelular. La relación entre las chaperonas residentes del RE (especialmente la bien caracterizada BiP, una variante de Hsp70) y la UPR en plantas ha sido revelada en diversos trabajos de investigación. Por ejemplo, la sobre-expresión de BiP en tabaco es capaz de atenuar la UPR, disminuir la inducción de otras chaperonas moleculares del RE e incrementar la resistencia de la planta completa a tunicamicina, un potente inductor de la UPR (Zhao *et al.*, 2007). Desafortunadamente, la mayoría de los estudios se han enfocado en las chaperonas de alto peso molecular, y no en las sHsps.

Proteínas de choque térmico

La aglomeración molecular y los factores del entorno que cambian rápidamente interfieren con el proceso de plegado de cadenas sintetizadas *de novo* o promueven la pérdida de la conformación nativa de polipéptidos maduros. Sin embargo, una de las funciones cruciales de las células, es su habilidad para responder a las fluctuaciones del medio (Greene, 2002) y mantener su homeostasis. La respuesta celular frente al estrés provocado por estos cambios incluye modificaciones dirigidas a potenciar la tolerancia al estrés por parte de la célula; uno de las principales respuestas, como se ha mencionado en capítulos anteriores, es el incremento en la síntesis de chaperonas moleculares (Urade, 2007; Timperio *et al.*, 2008), proteínas encargadas de prevenir la agregación proteica irreversible (Liberek *et al.*, 2008; Bondino *et al.*, 2012; Waters, 2013). Las chaperonas moleculares mejor estudiadas son las proteínas de choque térmico (HSPs); éstas fueron identificadas debido a que su expresión es inducida durante estrés por calor, sin embargo; ahora se sabe que muchas HSPs también se expresan en células no estresadas (Waters, 2013). Las HSPs incluyen familias proteicas conservadas no relacionadas entre ellas: HSPs100, HSPs90, HSPs70, HSP60 y sHsp (Laksanalamai y Robb, 2004; Bondino *et al.*, 2012; Waters, 2013).

Pequeñas proteínas de choque térmico

Todos los organismos, a excepción de algunas bacterias patógenas, sintetizan sHsps (Sun *et al.*, 2002; Laksanalamai & Robb, 2004; Waters, 2013). Este hecho indica que dichas proteínas surgieron antes de la divergencia de los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya (Waters, 2013) y denota la importancia de las mismas dentro del entorno celular. Cabe señalar que todas las sHsps son codificadas por genes nucleares (de Jong *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 2008).

Algunos miembros de la familia sHsp pueden estar inactivos o parcialmente activos bajo condiciones fisiológicas, y su activación es inducida por condiciones específicas, como diversos tipos de estrés y transiciones en el desarrollo (Sun *et al.*, 2002; Haslbeck *et al.*, 2005). A pesar de que las proteínas que pertenecen a esta superfamilia son diversas en tamaño y secuencia, la mayoría comparten ciertas características: una región conservada de ~90 aminoácidos denominado “dominio alfa-cristalino” (ACD), un peso molecular bajo que oscila entre 12-43 kDa (de Jong *et al.*, 1998; Nakamoto y Vígh, 2007; Hilario *et al.*, 2011), la capacidad para organizarse en oligómeros, una estructura cuaternaria dinámica, su inducción por condiciones estresantes y su actividad de chaperona para evitar la agregación proteica (Jakob *et al.*, 1993; Haslbeck, 2002; Haslbeck *et al.*, 2005; Siddique *et al.*, 2008).

El miembro mejor estudiado de las sHsps es la proteína α -cristalina, una proteína abundante en la lente ocular de vertebrados, incluyendo la de humano (Sun *et al.*, 2002). Esta proteína es la responsable de mantener la transparencia de las lentes y prevenir la formación de cataratas en los ojos de mamíferos (Brady *et al.*, 1997).

Función de las sHsps

Las proteínas de la familia sHsp juegan un papel crítico en la defensa del organismo durante el estrés fisiológico debido a que protegen a otras proteínas de su agregación irreversible hasta que condiciones más favorables permitan la renovación de la actividad celular. Dicho proceso es independiente de energía y se propone que una

vez formado el complejo entre sHsps y las proteínas diana, éstas son liberadas y replegadas por chaperonas cuya actividad depende de ATP, como el complejo Hsp70/Hsp100 (Sun y MacRae, 2005; Liberek *et al.*, 2008). Lo anterior implica que tanto la desagregación como el replegamiento ulterior de los polipéptidos presentes en estos agregados procede más eficientemente en presencia de sHsps (Liberek *et al.*, 2008). Por ello, la función de este tipo de proteínas es fundamental para la supervivencia y durante la recuperación al estrés. De hecho, diversos estudios sobre la expresión de sHsps bajo estrés por choque térmico y otras condiciones estresantes han demostrado que este grupo de proteínas se inducen preferencialmente (Halsbeck, 2002).

Algunas enfermedades hereditarias degenerativas en humanos involucran mutaciones en algunos de los 10 miembros de la familia HSPB de sHsps (Kampinga y Garrido, 2012). Por ejemplo, mutaciones en el gen que codifica para la proteína α B-cristalina (HSPB5) provocan cataratas congénitas (Litt *et al.*, 1998; Horwitz, 2000) además de miopatía relacionada a la desmina (Vicart *et al.*, 1998). Por otro lado, la resistencia celular a diferentes terapias contra el cáncer está asociada con la expresión elevada de muchas HSPBs (Acunzo *et al.*, 2012).

Estructura de las sHsps

Hasta la fecha se han resuelto mediante cristalografía las estructuras de siete sHsps y todas ellas muestran que la estructura primaria para la construcción de las sHsps es un dímero (Kim *et al.*, 1998; Montfort *et al.*, 2001; Stamler *et al.*, 2005; Hilario *et al.*, 2006; Bagnéris *et al.*, 2009; Laganowsky *et al.*, 2010; Hilario *et al.*, 2011). Cada monómero que conforma al dímero presenta tres regiones distinguibles: el dominio ACD que está delimitado por dos regiones, una región amino terminal (N-terminal) y otra región carboxilo terminal (C-terminal) (Hilario *et al.*, 2011), a excepción de la Tsp36, de *Taenia saginata*, que presenta dos ACD por cada monómero (Stamler *et al.*, 2005). Otra de las características generales de las sHsps es su capacidad para formar homooligómeros o heterooligómeros de hasta 1000 kDa (Halsbeck *et al.*, 2005; Hilario *et al.*, 2011).

La estructura cristalográfica de MjHSP16.5, una sHsp de la archaea hipertermófila *Methanococcus jannaschii*, mostró que ésta forma un complejo esférico hueco formado por 24 monómeros. La subunidad monomérica es una lámina β que se pliega en un patrón similar a un dominio de la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas, con una región N-terminal altamente desordenada y una extensión C-terminal ordenada (Kim *et al.*, 1998). Para la formación del dímero, dos láminas se establecen como capas paralelas. Una lámina está conformada por las cadenas $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 7$ y $\beta 4$ mientras que la segunda lámina está conformada por las cadenas $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 9$, y $\beta 8$ del mismo monómero, y la cadena $\beta 6$ de otro monómero ($\beta 6$ interactúa con la cadena $\beta 2$) (Kim *et al.*, 1998) (Figura 2a).

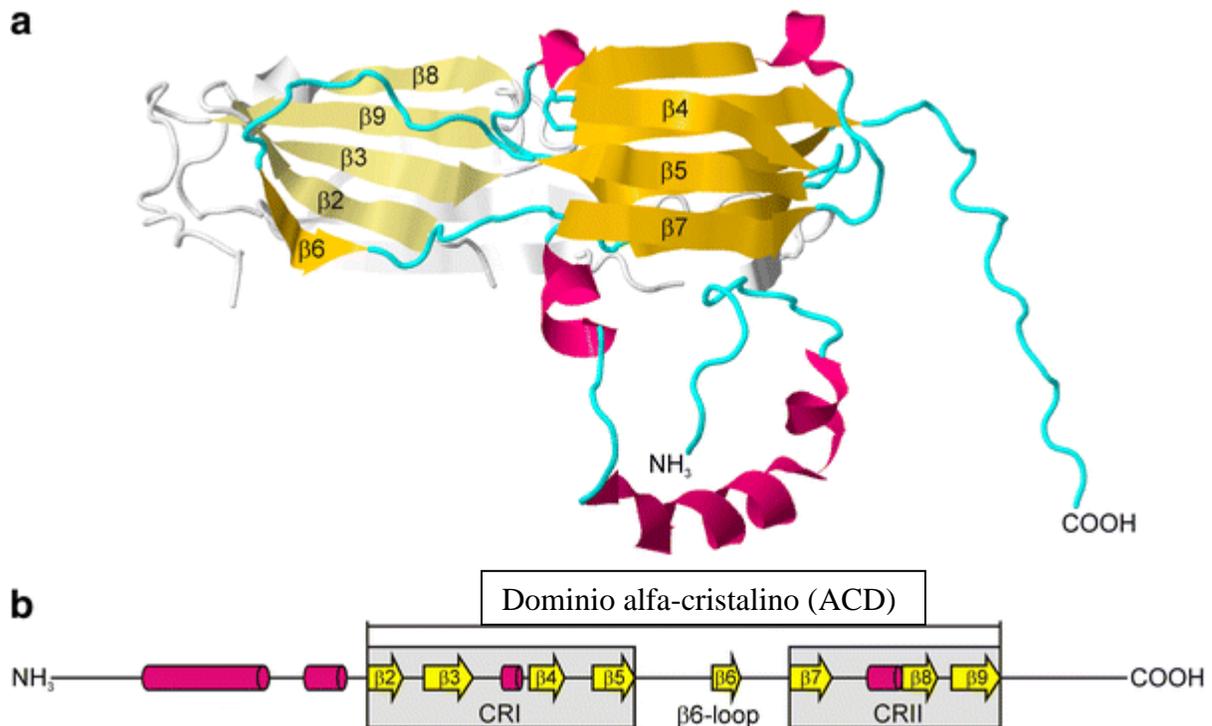


Figura 2. Organización estructural típica de una sHsp. a. Representación de la estructura de rayos X de un dímero de HSP16.9 de *Triticum aestivum*. b. Estructura primaria de esta proteína. El ACD consiste de las regiones conservadas I (CRI) y II (CRII) y del *loop* $\beta 6$. Las regiones conservadas forman un sándwich de láminas β . El *loop* $\beta 6$ sobresale del monómero y forma una lámina β con la cadena $\beta 2$ de otro monómero, conformando de esta manera al dímero (Tomado de Bondino *et al.*, 2012).

Además, se observó la presencia de dos pequeñas hélices denominadas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y una cadena beta pequeña denominada $\beta 10$. La misma disposición de las láminas β se observó en la estructura cristalográfica de la proteína HSP16.9 de trigo (sólo que ésta no posee una cadena $\beta 1$; Figura 2a). En este último trabajo se pudo corroborar que también esta proteína usa un dímero como unidad de ensamblaje (Montfort *et al.*, 2001). La comparación de ambas estructuras permitió identificar que la cadena $\beta 10$ presente en la extensión C-terminal de los monómeros de ambas proteínas se une a un surco hidrofóbico presente entre las cadenas $\beta 4$ y $\beta 8$ del ACD del monómero del par contiguo, interacción en la que participa la secuencia IXI/V (isoleucina, cualquier aminoácido, isoleucina o valina) (De Jong *et al.*, 1998). El principal rasgo distintivo entre ambas estructuras es su conformación cuaternaria y las interacciones que dan lugar a ella. MjHSP16.5 se pliega como una esfera (Kim *et al.*, 1998) y HSP16.9 de *Triticum aestivum* se ensambla como un dodecámero formado por un doble anillo continuo de trímeros de dímeros, dando lugar a una estructura en forma de dona (Montfort *et al.*, 2001). Mientras que el trabajo de Kim y sus colaboradores sugiere que el contacto entre subunidades sobre el tercer plano de MjHSP16.5 se lleva a cabo gracias a una única interacción entre subunidades adyacentes en cada “esquina” de la ventana triangular (Kim *et al.*, 1998), el trabajo de Montfort y sus colaboradores muestra que en la proteína HSP16.9 la interacción, que estabiliza al multímero, tiene lugar entre los brazos N-terminal de los monómeros de un disco con los brazos N-terminal de los monómeros del otro disco, formando de esta manera hélices compartidas entre dos monómeros adyacentes, ubicadas en el interior del disco (Montfort *et al.*, 2001).

A través de un estudio en el que se comparó la secuencia/estructura de alrededor de 4000 sHsps se situó al ACD entre la cadena $\beta 2$ y la cadena $\beta 9$. Se definió a la región N-terminal como la secuencia que precede a la cadena $\beta 2$, y a la región C-terminal como aquella que se sitúa después de la cadena $\beta 9$ (Poulain *et al.*, 2010). Tanto la región N-terminal como la región C-terminal presentan longitud y secuencia variables (Bondino *et al.*, 2012; Waters, 2013). Además se establecieron dos regiones conservadas dentro del ACD, la región CRI ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 5$) y la región CRII ($\beta 7$, $\beta 8$ y $\beta 9$); por otro lado la cadena $\beta 6$ se nombró como “el *loop* L57” ya que la secuencia, tamaño y estructura son muy variables (Poulain *et al.*, 2010; Bondino *et al.*, 2012. Figura

2b).

Motivos conservados en las sHsps

Se han identificado algunos motivos conservados dentro de las sHsps, los más destacados se describen a continuación:

El motivo V/I/L-X-I/V/L (valina o isoleucina o leucina, seguida de cualquier aminoácido, seguido de isoleucina o valina o leucina) en la extensión C-terminal, que actúa como ancla entre dímeros en el proceso de oligomerización (Kim *et al.*, 1998; Montfort *et al.*, 2001; Poulain *et al.*, 2010).

El motivo G-V-L (glicina, valina, leucina), de la cadena $\beta 9$ que podría participar en el proceso de oligomerización (Lee *et al.*, 1997).

En todas las sHsps, a excepción de las de animales, se encontró un doblete P-G conservado entre las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$, este motivo se ubica espacialmente en la interfase entre dímeros, por lo cual se propone que podría estar implicado en la estabilización de dicha estructura (Stamler *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2006; Poulain *et al.*, 2010).

Finalmente, cabe resaltar que aun cuando se ha propuesto al ACD como el sitio que se une a los parches hidrofóbicos (Lieberk *et al.*, 2008), hay pruebas que sugieren que el ACD únicamente funciona como andamio y que la región que se une al blanco es la región amino de la proteína (Basha *et al.*, 2013). Aunado a esto, se han identificado motivos conservados en el ACD como: G/A (glicina o alanina) al final de la cadena $\beta 5$, F-X-R (fenilalanina, cualquier aminoácido, arginina) en la cadena $\beta 7$, L-P/A (leucina y prolina o alanina) en el loop entre la cadena $\beta 7$ y $\beta 8$ y N/D-hidrofóbico-L (asparagina o aspártico, seguido de un aminoácido hidrofóbico, seguido de leucina) en el loop entre las cadenas $\beta 8$ y $\beta 9$; sin embargo no se ha identificado su participación en la unión a proteínas blanco (Poulain *et al.*, 2010).

Mecanismo de acción de las sHsps

Aun cuando el mecanismo exacto de unión a substratos permanece sin ser

elucidado, se han establecido al menos dos hipótesis que tratan de explicar el mecanismo a través del cual las sHsps protegen a sus blancos de la desnaturalización con base en la evidencia existente.

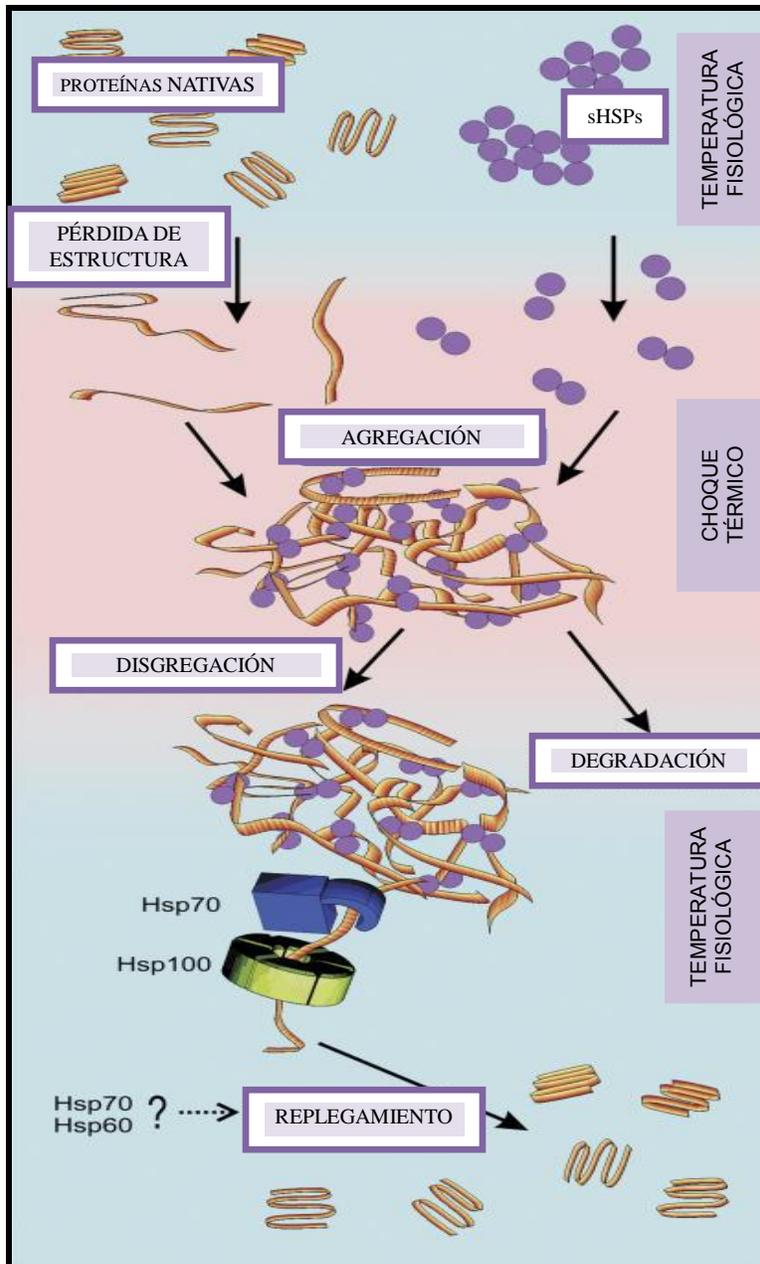


Figura 3. Hipótesis del mecanismo de acción de las sHsp. Las sHsps forman estructuras oligoméricas que intercambian permanentemente subunidades entre sí. Presentan dos estados principales: uno inactivo de baja afinidad bajo condiciones fisiológicas óptimas (oligómeros) y un estado de alta afinidad bajo condiciones de estrés (dímeros). Las sHsp se unen a los agregados facilitando su disgregación posterior. La recuperación de la proteína sustrato al estado nativo se lleva a cabo con el auxilio de chaperonas de alto peso molecular como son la Hsp70 y la Hsp100 (Tomado y modificado de Lieberk *et al.*, 2008).

Por un lado, se ha demostrado en ensayos *in vitro* que los oligómeros son capaces de proteger directamente a proteínas no nativas (Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997), por lo cual se propone que durante el proceso de ensamblaje *in vivo* de los

multímeros, algunas proteínas necesarias para la supervivencia de la célula bajo condiciones estresantes, son atrapadas dentro de la cavidad interior o bien interaccionan con la sHsp a través del contacto con su superficie exterior (Lee *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). Por otro lado, hay evidencia de que el proceso de oligomerización e intercambio de subunidades es muy dinámico y que puede ser acelerado bajo condiciones de estrés (Lanneau *et al.*, 2008). Aunado a esto, los análisis de cristalografía sugieren que la oligomerización previene a los motivos de unión de ser accesibles. Por lo tanto, se requiere del desensamblaje para que los dímeros puedan reconocer a sus blancos (Montfort *et al.*, 2001; Stamler *et al.*, 2005).

Los datos anteriores han llevado a establecer la hipótesis de que la forma oligomérica de las sHsps no es necesaria para la función de chaperona, sino que en realidad son reservorios de éstas, y que pueden desensamblarse rápidamente bajo algún estímulo estresante, dejando libres a los dímeros que son la forma activa y la más estable (Kim *et al.*, 1998; Montfort *et al.*, 2001; Stamler *et al.*, 2005; Liberek *et al.*, 2008. Figura 3). En concordancia con esto, se ha descrito que AtHsp18.5 de *A. thaliana* es una sHsp incapaz de formar oligómeros, pero conserva, a través de su forma dimérica, la actividad de chaperona (Basha *et al.*, 2013). Se cree que dependiendo de las necesidades de la célula o la situación de estrés que confronta, modificaciones en el estatus de oligomerización de las sHsps pueden cambiar la afinidad de éstas por sus blancos específicos (Garrido *et al.*, 2012).

sHsps en plantas

Las sHsps son ubicuas en la naturaleza, pero son inusualmente abundantes y diversas en plantas superiores en relación a otros eucariontes (Waters, 1996). Por citar algunos ejemplos, en *A. thaliana* hay 19 genes (Scharf *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2008), 23 en *Oryza sativa* y *Populus trichocarpa* posee 36 (Waters *et al.*, 2008) mientras que, por ejemplo, en humano encontramos sólo 10 (Kampinga y Garrido, 2012) y en *Drosophila* 12 (Michaud, 2002).

Mientras que en otros organismos las sHsps se encuentran únicamente en el citosol y en el núcleo, a excepción de HSP22 mitocondrial de *Drosophila* (Morrow *et al.*,

2000), en plantas parece que han evolucionado a formas más diversas (Waters, 1995; Sun *et al.*, 2002; Waters, 2013), pudiendo localizarse también en compartimentos celulares como cloroplasto, peroxisoma, mitocondria y RE (Waters *et al.*, 2008; Bondino *et al.*, 2012; Waters, 2013).

La mayoría de las sHsps de plantas, más que expresarse de manera constitutiva, se expresan rápida y abundantemente bajo varios tipos de estrés (Bondino *et al.*, 2012), así como bajo distintas etapas del desarrollo (Waters *et al.*, 1996). Algunas de las condiciones bajo las cuales se ha registrado expresión de sHsps son: presencia de metales pesados, sequía, UV, salinidad, frío, estrés osmótico, estrés oxidativo, así como en diferentes etapas del desarrollo (Waters *et al.*, 2008; tabla I).

La familia de las sHsp en plantas se divide en once subfamilias de acuerdo con su localización subcelular y relación filogenética (Waters *et al.*, 2008; Bondino *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2013). Existen seis formas citosólicas: las clases I, II, III, IV, V y VI (CI, CII, CIII, CIV, CV y CVI respectivamente), algunas de las cuales también pueden ser localizadas en el núcleo, las otras cuatro clases se localizan en mitocondria (MI y MII), cloroplasto (CP), RE (ER) y peroxisoma (PX) (Waters *et al.*, 2008; Bondino *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2013). Al igual que en otros organismos, el estrés por calor no es el único estímulo que dispara la expresión genética y la síntesis de sHsps en planta, en la tabla I se presenta una lista con sHsps vegetales y la(s) condición(es) a la(s) cual(es) está(n) relacionada(s).

Poco se sabe sobre el papel de las sHsps dentro de los diferentes compartimentos del sistema endomembranal. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de éstas en el RE de plantas (Scharf *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2008; Rodríguez-López *et al.*, 2014). Además, se ha descrito parcialmente su participación en respuesta a cambios fisiológicos: en *Morus bombycis* Koidz, la proteína WAP20, residente del RE, se acumula durante la aclimatación al frío estacional por una aparente respuesta al ácido abscísico (ABA) (Ukaji *et al.*, 2010), y LeHSP21.5 atenúa la UPR en plantas de jitomate (Zhao *et al.*, 2007).

Tabla I. Estímulos que inducen la expresión de sHsp en plantas (Tomado de Sun, *et al*, 2002).

CONDICIÓN	ESPECIE	GENE DE sHsp/SONDA
Desarrollo embrionario	<i>Helianthus annuus</i>	<i>HaHsp 17.6-CI, HaHsp 17.9-CII</i>
	<i>Pisum sativum</i>	<i>PsHsp18.1-CI</i> y tres sHsp relacionadas <i>PsHsp17.7-CII</i> y tres sHsp relacionadas
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI, AtHsp17.6-CI</i> <i>AtHsp17.7-CII</i>
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Homólogo de <i>LpHsp17.7-CI</i> , Homólogo de <i>LpHsp17.3-CII</i>
Germinación	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI, AtHsp17.6-CI</i> <i>AtHsp17.4-CII, AtHsp17.6-CII</i>
	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	cDNA DF 4.5 (Clase CI)
	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>HvHsp26.8, HvHsp26.9-P</i>
Embriogénesis somática	<i>Medicago sativa</i>	<i>Hsp18.1</i> (Clase I), <i>MsHsp18.2-CI</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHsp18-CI</i>
Desarrollo del polen	<i>Lilium</i>	cDNA homólogos a sHsp (Clase I)
	<i>Zea mays</i>	<i>ZmHsp17-CII</i> (Hsp18)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHsp18-CI</i>
Maduración de la fruta	<i>Solanum lycopersicum</i>	Homólogo de <i>LpHsp17.7-CI</i> Homólogo de <i>LpHsp17.3-CII</i> <i>LeHsp23.8-P</i> (LeHsp21) <i>TOM111</i> (Clase P)
Estrés osmótico	<i>Helianthus annuus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> <i>HaHsp17.9-CII</i>
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	Homólogos de <i>HaHsp17.6-CI</i> Homólogos de <i>HaHsp17.9-CII</i>
	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17-CI</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.7-CII, AtHsp17.6-CII</i>
Ácido abscísico	<i>Helianthus annuus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i>
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	Homólogos de <i>HaHsp17.6-CI</i> Homólogos de <i>HaHsp17.9-CII</i>

	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17-CI</i>
Estrés oxidativo	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17-CI</i>
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Hsp22</i> (Clase M)
	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Hsp17.9</i> (Clase I)
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsHsp26.6-P</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.7-CII</i>
Frío	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>CI19</i> (Clase RE)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>TOM66</i> (Clase I) <i>TOM 111</i> (Clase P)/ <i>LeHsp23.8-P</i>
	<i>Morus bombycis</i>	<i>WAP20</i> (Clase RE)
	<i>Castanea sativa</i>	<i>CsHsp17.5-CI</i>
Metales pesados	<i>Medicago sativa</i>	<i>Hsp18.1</i> (Clase CI) <i>MsHsp18.2-CI</i>

ANTECEDENTES

El gen que codifica para la proteína Nodulina 22 (*PvNod22*) fue aislado en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez del Instituto de Biotecnología de la UNAM, a partir de una librería de cDNA derivada de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Negro Jamapa) inoculadas con uno de sus simbiontes naturales, *Rhizobium etli* cepa CE3. A esta proteína se le denominó Nodulina 22 ya que su transcrito se induce durante la ontogenia de nódulos (a partir del séptimo día post-inoculación) y su peso molecular es cercano a 22 kDa.

El transcrito del gen *Pvnod22* incluye una larga región 5' no traducida (UTR) de 259 pares de bases (pb), un marco abierto de lectura (ORF) de 597 pb, que inicia con el codón ATG en la posición +260 y finaliza con tres codones de término contiguos, y una región 3' UTR de 321 pb que contiene una posible señal de poli-adenilación (ver anexo 1). Los análisis de expresión que hemos llevado a cabo sobre este gen han demostrado que bajo condiciones de desarrollo óptimas el transcrito *PvNod22* se encuentra presente en todos los tejidos de planta, aunque a niveles basales, y que su acumulación se induce, además de la inoculación con *Rhizobium*, bajo estrés por calor y estrés oxidativo (Rodríguez-López *et al.*, 2014).

El análisis comparativo de la secuencia de *Pvnod22* en distintas bases de datos reveló que dos genes de *A. thaliana* que codifican para las proteínas sHsps *AtAcd22.1* (At3g22530) y *AtAcd16.9* (At4g14830), localizados en el cromosoma tres y cuatro, respectivamente, comparten alrededor del 53% de identidad con *Pvnod22*. Al igual que este último, el gen *At3g22530* de 947 pb de longitud no presenta intrones y contiene un ORF de 597 pb. Además, presenta regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) relativamente largas, de 180 pb y 185 pb, respectivamente. Cabe mencionar que la región UTR del extremo 5' en el transcrito *Pvnod22* tiene un posible elemento IRES, esto es, un sitio alternativo reconocido por el complejo de pre-iniciación 43S, de manera que puede comenzar la traducción a pesar de carecer de la modificación *Cap* en el extremo 5'. Este hecho resulta sumamente interesante, ya que muchos de los elementos IRES se encuentran en algunas proteínas de organismos eucariontes implicadas en la respuesta a estrés (Fernández *et al.*, 2002, Dinkova *et al.*, 2005, Mardanova *et al.*, 2008). De

demostrarse experimentalmente que la predicción sobre el elemento IRES en el extremo 5' del transcrito *Pvnod22* es funcional, se reforzaría la propuesta de la importancia de *PvNod22* durante la respuesta a estrés.

La proteína resultante del análisis *in silico* incluye 198 residuos de aminoácidos, tiene un punto isoelectrico hipotético de 5.51 y un peso molecular calculado de 21.6 kDa. El extremo amino terminal de esta proteína es de carácter hidrofóbico, con un sitio de corte para un péptido señal, de entrada al sistema endomembral, en la posición 25. Asimismo, presenta una región localizada en el extremo carboxilo terminal que es similar estructuralmente al dominio alfa-cristalino de otras sHsps en plantas (Mohammad *et al.*, 2004).

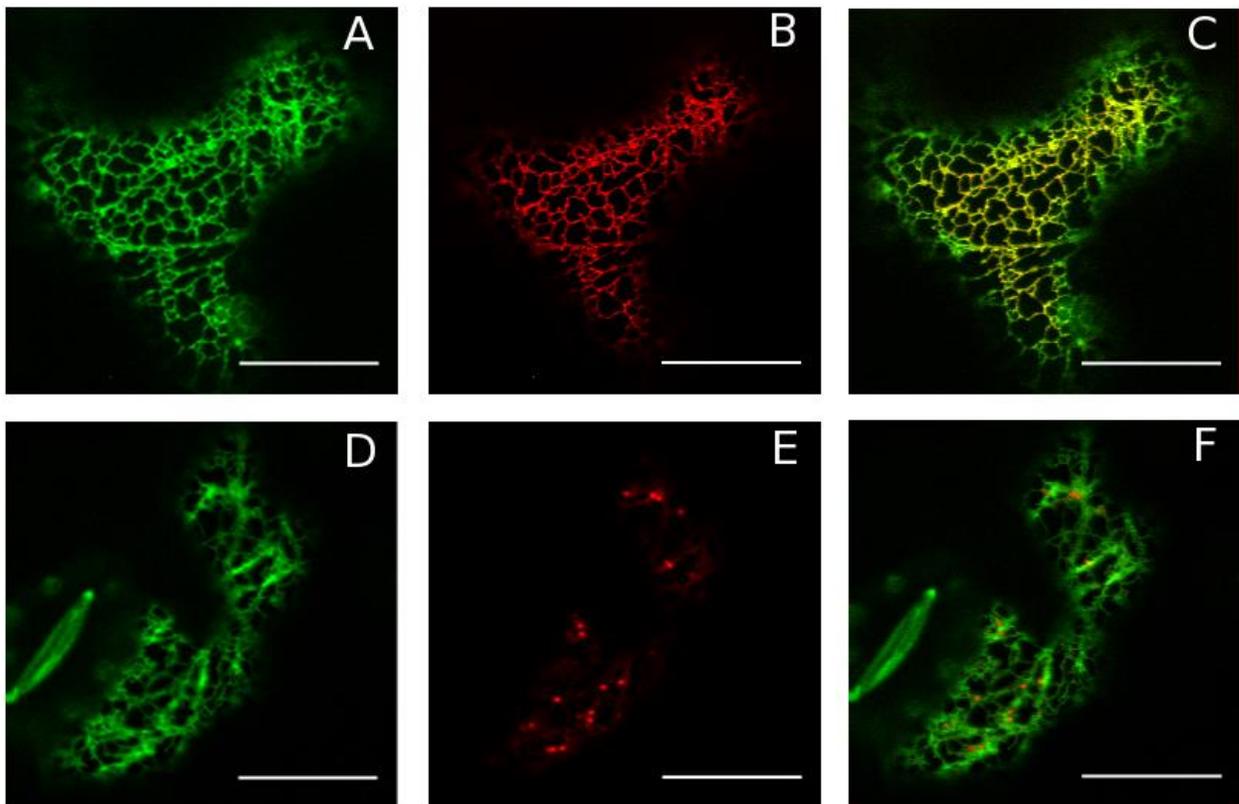


Figura 4. Co-localización de Nodulina 22 con los marcadores específicos para ER y aparato de Golgi en células de epidermis de *Nicotiana benthamiana*. A y D) Localización de Nodulina 22 fusionada a GFP en su región carboxilo. B) Localización de ERYK, marcador del ER. C) Superposición de A y B. E) Localización de ERD2YFP, marcador de aparato de Golgi. F) Superposición de D y E. G. Imágenes tomadas 3 días después de la infiltración. Objetivo empleado 40X. Las barras indican 10 μ m. Tomado de Rodríguez-López *et al.*, 2014.

Para demostrar la actividad de chaperona (Jofré *et al.*, 2003) de *PvNod22* se clonó la región codificante del cDNA en un vector de expresión de *Escherichia coli* (Mohammad *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de este gen confiere resistencia a las células de *E. coli* en presencia de 1 mM de H₂O₂, una especie reactiva de oxígeno. Sin embargo, no se obtuvo tolerancia frente a elevadas temperaturas; por lo que inicialmente se propuso que *PvNod22* es importante para contender exclusivamente con el estrés oxidativo (Mohammad *et al.*, 2004). Paradójicamente, estudios de plegamiento de proteínas *in vitro* demostraron que la capacidad de chaperona de *PvNod22* proporciona protección ante la inactivación por calor. Se observó que el replegamiento de luciferasa (una enzima comúnmente empleada en este tipo de ensayos) desnaturalizada por calor fue más eficiente en presencia de *PvNod22*. El ensayo se llevó a cabo adicionando reticulocitos de conejo (que contienen HSPs de alto peso molecular) y ATP (Jonathan I. Rodríguez, tesis de maestría; Rodríguez-López *et al.*, 2014).

La predicción de la localización subcelular de *PvNod22* de frijol mediante dos algoritmos independientes (<http://psort.hgc.jp/> y <http://bioapps.rit.albany.edu/pTARGET/>) indica que esta proteína es dirigida al RE. Dicha predicción fue posteriormente confirmada mediante un ensayo de co-localización en células epidérmicas de tabaco mediante la infiltración de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con marcadores específicos para RE y aparato de Golgi (Cynthia G. Martínez, tesis de licenciatura; Rodríguez-López *et al.*, 2014). En este estudio se determinó que, efectivamente, *PvNod22* es una proteína que se encuentra preferencialmente en el RE (Figura 4).

En muchos casos se ha observado que al hacer *knock out* de un sólo gen de sHsp en planta se presenta carencia de fenotipo; ésto se ha atribuido al gran número de sHsps en plantas y a la posible redundancia funcional de éstas (Sun y MacRae, 2005; Waters, 2013). Sin embargo, y de manera muy interesante, el fenotipo foliar observado en plantas de frijol silenciadas en la expresión de *Pvnod22* (frijol posee aproximadamente 40 genes que codifican sHsps) indica cambios muy drásticos; ejemplo de ésto es la presencia de zonas de necrosis extendida (Figura 5), proceso que

correlaciona con un aumento importante en la concentración de especies reactivas de oxígeno (Nidia E. Beltrán, tesis de licenciatura). Además, los datos obtenidos a partir del transcriptoma de estas plantas, señalan que diversos transcritos que codifican para proteínas involucradas en la UPR o en ERAD y defensa se encuentran incrementados (Rodríguez-López *et al.*, 2014). Otro dato que es importante mencionar es que el silenciamiento de *PvNod22* induce la UPR (Rodríguez-López *et al.*, 2014).

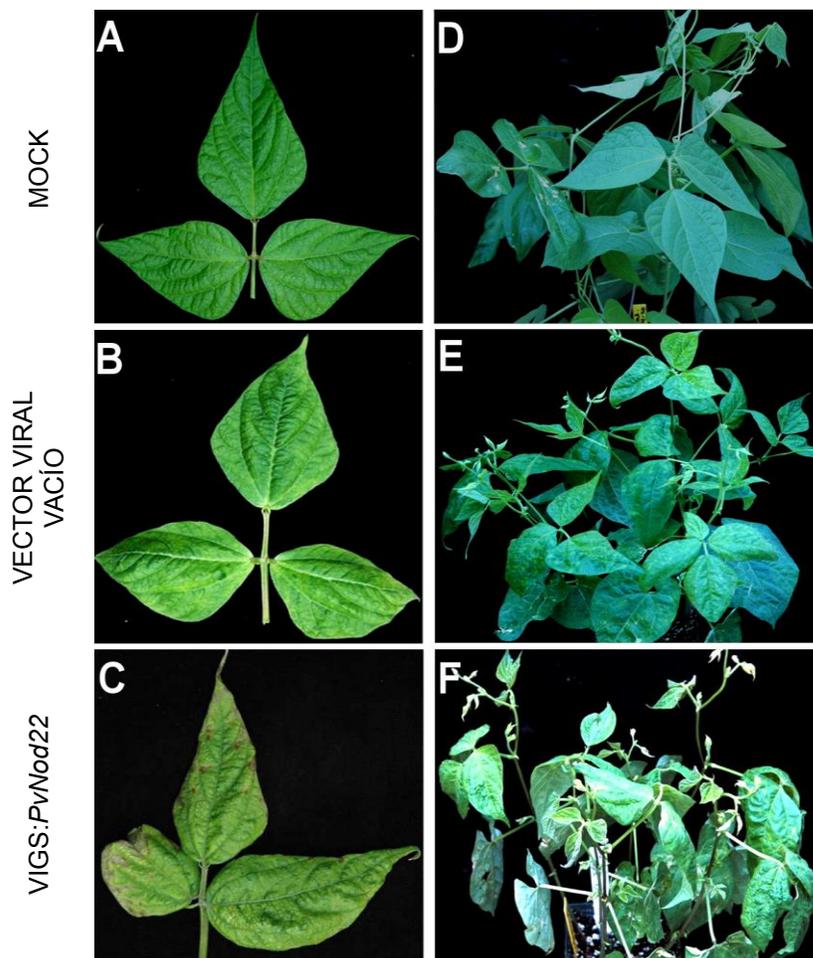


Figura 5. Fenotipo foliar observado en plantas silenciadas en la expresión de *Pvnod22* de frijol mediante el sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). VIGS:*Pvnod22* A y D) Trifolio y planta testigo tratada únicamente con el amortiguador de suspensión, respectivamente. B y E) Trifolio y planta infectada con el virus silvestre en la cual se pueden observar manchas cloróticas características de la infección por este virus, respectivamente. C y F) Efecto del silenciamiento de *Pvnod22* en la zona aérea de plantas maduras de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Valentino. Tomado de Rodríguez-López *et al.*, 2014.

Nos interesa estudiar a la proteína *PvNod22* porque las evidencias actuales muestran que es una proteína que juega un papel preponderante durante la respuesta a estrés en las plantas de frijol. Sabemos que es capaz de conferir resistencia a *E.coli* cuando ésta es sometida a estrés oxidativo, sin embargo no debemos olvidar que en

plantas su transcrito, además de encontrarse a niveles basales, se acumula bajo diversas condiciones: estrés oxidativo, estrés por calor, nodulación y etapas normales del desarrollo. Además, la acumulación se da a nivel de organismo, no de tejido. Esto parece indicar que *PvNod22* es una proteína que responde a alguna señal que está compartida en distintas condiciones incluyendo al estrés, no importa si es de tipo biótico o abiótico. Por otro lado, la proteína *PvNod22* contiene un péptido señal que la envía al sistema endomembranal, ésto ha sido comprobado experimentalmente y parece ser que se acumula en el RE aun cuando carece de una señal de retención para dicho organelo. Ésto último sugiere que el blanco de *PvNod22* o las proteínas con las que trabaja en conjunto podrían localizarse en el RE, además sabemos que si se silencia la expresión del gen *Pvnod22* hay inducción de la UPR. Para poder establecer una hipótesis del por qué es tan importante la participación de *PvNod22* durante la respuesta al estrés nos planteamos identificar a sus posibles interactores.

HIPÓTESIS

Dadas las características funcionales de las pequeñas proteínas de choque térmico, es posible que *PvNod22* interaccione con proteínas involucradas en la vía de plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, o alternativamente, con proteínas enviadas a la vía secretoria durante condiciones de estrés.

OBJETIVOS

General:

Identificar proteínas que interaccionan con *PvNod22* en frijol.

Particulares:

1. Aislar proteínas de plantas estresadas, con calor o peróxido de hidrógeno, utilizando una columna de afinidad conjugada a proteína *PvNod22* recombinante y obtener sus secuencias.
2. Generar la construcción 35S:*Pvnod22*: TAP que permita la purificación del complejo de proteínas unido a *PvNod22* directamente de la planta.
3. Generar raíces transgénicas en plantas de frijol que expresen la construcción 35S:*Pvnod22*: TAP.
4. Aislar interactores de *PvNod22* a partir del extracto proteico de raíces transgénicas que expresen la construcción 35S:*Pvnod22*: TAP y obtener sus secuencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para probar nuestra hipótesis se abordaron dos estrategias distintas, una consistió en unir a una columna de cromatografía a PvNod22 e incubarla con el extracto total de hoja de plantas de frijol estresadas bajo diferentes condiciones, con el fin de aislar e identificar a aquellas proteínas que resultaran retenidas por la presunta interacción con PvNod22. La otra estrategia consistió en generar una construcción que nos permitiera atrapar el complejo con los posibles interactores directamente del extracto de raíces de plantas de frijol, a través del método de obtención de complejos proteicos conocido como *tandem affinity purification* (TAP) (Rigaut *et al*, 1999). La etiqueta TAP consiste de un péptido de unión a calmodulina (CBP) y de una región de la proteína A de *Staphylococcus aureus* repetida 2 veces (ProtA 2x) que se une a IgGs. CBP y ProtA se encuentran separados por un sitio de corte para proteasa del virus del moteado del tabaco (TEV). Este vector hace uso del promotor CaMV 35S para dirigir la expresión de la proteína híbrida. La principal ventaja que esta estrategia ofrece sobre los esquemas de purificación convencionales es que la proteasa TEV permite hacer una elución del complejo proteico unido a una columna de IgG's en condiciones nativas (Puig *et al*, 2001). Además ha sido reportado que esta estrategia ha funcionado para caracterizar complejos proteicos de levadura, mamífero, insectos, bacterias y plantas (Rigaut *et al*, 1999; Van Leene *et al*, 2008).

Hemos decidido dividir "material y métodos" de acuerdo con cada una de las estrategias mencionadas (Sección 2 y 3), además de iniciar con una sección dedicada a las cepas bacterianas, plásmidos y técnicas generales utilizadas en el presente trabajo (Sección 1).

Sección 1. Técnicas generales, cepas bacterianas y plásmidos

Cepas bacterianas y plásmidos

Para la expresión de PvNod22 se utilizó la cepa bacteriana XL1-blue de *E. coli* con el genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-hsdR17 supE44 relA1 lac [F'pro AB*

lacIqZΔM15Tn10 (Tetr)] (Stratagene®) y el vector de expresión pQE30 que contiene una secuencia génica que confiere resistencia a ampicilina y una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 5' de la zona de clonación (QIAGEN®), lo cual facilita tanto la selección de transformantes como la purificación de la proteína de interés.

Para la generación de la construcción *pvnod22: TAP* se utilizó la cepa bacteriana DH5α de *E. coli* con el genotipo *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1* y el vector binario pEarleyGate 205 que presenta una secuencia génica que proporciona resistencia a kanamicina en bacteria y una secuencia que codifica para la etiqueta TAP en el 3' de la zona de clonación.

Para la transformación transitoria de las plantas de frijol se utilizó la cepa NCPP2659 (K599) de *Agrobacterium rhizogenes*.

Medios de cultivo

Las cepas bacterianas se cultivaron de manera rutinaria en medio Luria-Bertani (o LB de acuerdo con Miller, 1972). Este medio rico de cultivo contiene:

NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar *	15 g
Agua bidestilada	1000 ml

Una vez mezclados todos los componentes del medio, este se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 120 ° C y se vierte posteriormente en cajas Petri. * Si el medio es líquido no se agrega agar y el cultivo desarrolla en el matraz o tubo.

Antibióticos de selección

Con el propósito de inducir la generación de cultivos bacterianos homogéneos, de *E.coli* o *A.rhizogenes*, se adicionaron al medio de cultivo antibióticos específicos a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua bidestilada, esterilizados mediante su paso a través de unidades de filtración MILLEX GS (MILLIPORE; 0.22 μm de diámetro). La concentración final de los distintos antibióticos se indica en la siguiente tabla.

Tabla II. Concentración final de antibióticos adicionados al medio.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa bacteriana
Ampicilina (Amp)	100	<i>E.coli</i> con plásmido pQE30
Kanamicina (Kan)	50	<i>E.coli</i> con plásmido pEarleyGate 205 <i>A.rhizogenes</i> K599 con plásmido pEarleyGate 205

Protocolo para purificación de plásmidos

La purificación de plásmidos se realizó mediante el uso del paquete “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas) de acuerdo con su protocolo. Brevemente, se cultivó la cepa de *E. coli* de interés (pENTR-PvPs, pENTR-*Pvnod22*, 35S:PvPs:TAP o 35S:*Pvnod22*:TAP) en medio LB líquido suplementado con kan (50 $\mu\text{g/ml}$) por 8 h a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Las células se colectaron por centrifugación en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se descartó el medio de cultivo del sobrenadante, se añadieron 250 μl de solución de resuspensión (solución amortiguadora suplementada con RNasa A), y se agitó vigorosamente esta mezcla. Acto seguido, se añadieron 250 μl de solución de ruptura celular (NaOH, SDS) y se invirtieron los tubos de 4 a 6 veces, con el objeto de homogenizar el contenido. Se añadieron 350 μl de solución de neutralización (acetato potásico 3 M) y se invirtieron los tubos de 4 a 6 veces. Posteriormente, éstos se centrifugaron a 16 000 x g. El sobrenadante se incluyó en la

columna de purificación de DNA. Por centrifugación se eliminó el eluido. De la misma manera la columna fue lavada con 500 μ l de solución de lavado (etanol al 96%) con el fin de eliminar contaminantes. El DNA plasmídico fue colectado en un tubo Eppendorf mediante la adición de 30 μ l de solución amortiguadora de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5).

Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las cepas bacterianas empleadas en este trabajo, se utilizaron criotubos que contienen alícuotas de los distintos cultivos en fase logarítmica de crecimiento complementados con solución acuosa de glicerol estéril al 80% (v/v) a una concentración final de 25% (v/v). Se incluyeron los antibióticos de resistencia correspondientes a cada cepa a su concentración apropiada. Los criotubos fueron almacenados a -80°C .

Preparación de células electro-competentes de *E. coli* DH5 α

Todos los reactivos y el material empleado en este protocolo se pre-enfriaron a 4°C y las células se mantuvieron en hielo a lo largo de la preparación. Células de *E. coli* DH5 α fueron cultivadas a 37°C en agitación constante (225 rpm) durante 12-16 h en un tubo de ensayo con 5 ml de LB. Al término, se determinó la OD_{600} del cultivo y se utilizó una fracción del mismo para inocular 100 ml de LB a una OD_{600} de 0.1. El cultivo se incubó a 37°C bajo agitación constante hasta que se alcanzó una OD_{600} de entre 0.5 y 0.6; esto es, de crecimiento bacteriano en fase logarítmica. En este punto se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 min. Se sedimentaron las células mediante centrifugación a $5\ 000 \times g$ durante 20 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en agua MilliQ. Se efectuaron dos lavados más en condiciones similares. Finalmente la pastilla celular obtenida se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10 % (v/v) el cual se distribuyó en alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorf estériles. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Preparación de células quimio-competentes de *A. rhizogenes*

Todos los reactivos y el material empleado en este protocolo se pre-enfriaron a 4 °C y las células se mantuvieron en hielo a lo largo de la preparación. Células de *A. rhizogenes* fueron cultivadas durante 16 h en un tubo de ensayo con 5 ml de LB a 30 °C en agitación constante (225 rpm). Al término, se determinó la OD₆₀₀ del cultivo y se utilizó una fracción del mismo para inocular 100 ml de LB a una OD₆₀₀ de 0.1. El cultivo se incubó a 30 °C bajo agitación constante (225 rpm) hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de 0.5. En este punto se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 min. Se sedimentaron las células mediante centrifugación a 5 000 x *g* durante 20 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en 2 ml de una solución de CaCl₂ 50 mM y glicerol al 20%. Las células se distribuyeron en alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf estériles. Las células se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Sección 2. Primera estrategia experimental

Extracción y purificación de la proteína PvNod22 recombinante (Protocolo inicial)

Se cultivó por 12 h un inóculo de *E. coli* XL1-blue transformadas con el vector (pQE30) con la construcción del gen *Pvnod22* (sin la región del péptido señal) en 3 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Con 1 ml del cultivo saturado se inoculó un matraz con 100 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se cultivó por 3 h a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Una vez alcanzada la OD₆₀₀ óptima (de 0.3-0.5) se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 1 mM, y se incubó el cultivo por 4 h a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Las células se colectaron por centrifugación (10 min a 4420 x *g* a 4 °C), se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de una solución compuesta por H₂O milliQ, Tris 100 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, glicerol 10 %, tritón X-100 0.5 %, benzamidina 1 mM, ácido aminocaproico

1 mM, PMSF 1 mM y 50 mg de lisozima. Las células se incubaron durante 30 min en hielo, posteriormente éstas se sonicaron durante 10 min con pulsos de 10 s a una amplitud de 40 % (130 Watt, 20 kHz Ultrasonic Processor); este último paso se repitió una vez más. Las células se centrifugaron por 15 min a 20 400 x g a 4° C, se colectó el sobrenadante y se resuspendió a los cuerpos de inclusión en 5 ml de 8 M de urea. Los cuerpos de inclusión se sonicaron durante 1 min con pulsos durante 1 min con pulsos de 10 seg a una amplitud de 40 % (130 Watt, 20 kHz Ultrasonic Processor), se centrifugaron por 10 min a 20 400 x g a 4° C y se tomó el sobrenadante (5 ml). En una columna *BioRad® poly-prep chromatography column* (0.84 cm) se agregó 1 ml de perlas de agarosa conjugadas a Níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) (QIAGEN®), éstas se lavaron con un vol. de H₂O milliQ y se equilibraron con un volumen de urea 8 M. Se cerró la columna por la parte inferior y se agregaron los 5 ml de la solución de cuerpos de inclusión resuspendidos en urea 8 M y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se descartó la solución de urea 8 M por gravedad y se lavaron las perlas con 1 ml de urea 8 M, después se llevaron a cabo 8 lavados con un volumen de urea 8 M cada uno y tres lavados con la solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 100 mM y KCl 10 mM) con la finalidad de eliminar contaminantes. Posteriormente, se eluyó con una solución ácida (urea 8 M, ácido acético 20 mM pH 4 e imidazol 50 mM) y finalmente se dializó contra HEPES 25 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM pH 7 en una proporción 2 ml:500 ml con 2 cambios subsecuentes de solución.

Extracción y purificación de la proteína PvNod22 recombinante (Protocolo establecido durante el presente trabajo)

Se cultivó por 12 h un inóculo de *E. coli* XL1-blue transformadas con el vector (pQE30) con la construcción del gen *Pvnod22* (sin la región del péptido señal) en 3 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Con 1 ml del cultivo saturado se inoculó un matraz con 100 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se cultivó por 3 h a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Una vez alcanzada la OD₆₀₀ óptima (de 0.3-0.5) se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 1 mM, y se incubó el cultivo por 4

h a 37 °C en agitación constante (225 rpm). Las células se colectaron por centrifugación (10 min a 4420 x g a 4 °C), se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de una solución compuesta por H₂O milliQ, tris 100 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, KCl 10 mM, glicerol 10 %, tritón X-100 0.5 %, benzamidina 1 mM, ácido aminocaproico 1 mM, PMSF 1 mM y 50 mg de lisozima. Las células se incubaron durante 30 min en hielo, posteriormente éstas se sonicaron durante 10 min con pulsos de 10 s a una amplitud de 40 % (130 Watt, 20 kHz Ultrasonic Processor); este último paso se repitió una vez más. Las células se centrifugaron por 15 min a 20 400 x g a 4° C, se colectó el sobrenadante y se resuspendió a los cuerpos de inclusión en 5 ml de amortiguador salino de fosfatos 1x (PBS: Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM y NaCl 130 mM) pH 7.4 y urea 4 M. Los cuerpos de inclusión se sonicaron durante 1 min con pulsos de 10 seg a una amplitud de 40 % (130 Watt, 20 kHz Ultrasonic Processor), se centrifugaron por 10 min a 20 400 x g a 4° C y se tomó el sobrenadante (5 ml). En una columna *BioRad*[®] *poly-prep chromatography column* (0.84 cm) se agregó 1 ml de perlas de agarosa conjugadas a Ni-NTA (QIAGEN[®]), éstas se lavaron con un vol. de H₂O milliQ y se equilibraron con un vol. de PBS 1x/ urea 4M. Se cerró la columna por la parte inferior y se agregaron los 5 ml de la solución de cuerpos de inclusión resuspendidos en PBS 1x /urea 4 M y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución PBS 1x /urea 4 M por gravedad y se lavaron las perlas con 1 ml de urea 8 M, después se llevaron a cabo 8 lavados con un vol. de PBS 1x/ urea 4M cada uno, 3 lavados con un vol. de PBS 1x/ NaCl 0.5 M/ imidazol 60 mM y finalmente se incubó 1 hora a temperatura ambiente con 5 ml de una solución PBS 1x/ urea 2 M/ 200 mM imidazol; se colectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Renaturalización por diálisis de PvNod22 recombinante

Se diluyó la muestra en amortiguador de elución a una concentración no mayor a 300 µg/ml y se incluyó en una bolsa de diálisis (corte de 6000 a 8000 Da), la cual se dializó durante 14 h con agitación a 4 °C contra 1 litro de una solución PBS 1x, urea 2 M, DTT 2 mM y EDTA 1 mM. Posteriormente se cambió la solución de diálisis por PBS,

urea 1 M, DTT 1 mM y EDTA 0.5 mM; en esta etapa se llevó el recambio durante 10 h con agitación a 4 °C y finalmente se reemplazó por PBS y se dializó por 14 h con agitación a 4 °C. La muestra se centrifugó durante 1 h a 16 400 x g a 4 °C. Se separó el sobrenadante de la pastilla para verificar en cual fracción se encontraba enriquecida PvNod22 por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 13 %.

Electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para el SDS-PAGE las muestras de proteína se diluyeron en una relación 1:1 en el amortiguador de carga Laemmli 2x (Tris pH 6.8 125 mM , SDS 4 %, glicerol 20 %, 2-β mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.005 %) (Laemmli, 1970) y se separaron en un gel de acrilamida con una región condensadora (mezcla de acrilamida [29.2 % acrilamida, 8 % N,N-metileno-bis-acrilamida] al 5 %, Tris pH 6.8 125 mM, SDS al 0.1 %, APS al 0.1 %, TEMED al 0.1 % y H₂O milliQ) seguida de una región separadora (mezcla de acrilamida al 13%, Tris pH 8.8 400 mM, SDS al 0.1 %, APS al 0.1 %, TEMED al 0.04 % y H₂O milliQ). Las condiciones del análisis electroforético fueron: 100 V durante 180 min en amortiguador de *corrida* (Tris-HCl 2 mM, glicina 250 mM y SDS al 0.1 %). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Comassie G-250 al 0.1 %, metanol al 50 % y ácido acético glacial al 7 %) durante 20 min y desteñidos con solución desteñidora (metanol al 50 % y ácido acético glacial al 10%) hasta obtener la tinción deseada.

Para el caso del PAGE no desnaturalizante, no se agregó SDS a las mezclas y el porcentaje de acrilamida para la región separadora del gel fue de 8%. Al finalizar, el gel se tiñó con nitrato de plata de la manera siguiente: las muestras se fijaron en el gel con una solución de metanol al 50 % y ácido acético al 5 % durante 30 min, se lavó durante 15 min en H₂O milliQ. El gel fue sumergido en una solución de sensibilización (metanol al 30 %, acetato de sodio al 7 % y tiosulfato de sodio 1.27 mM) durante 3 min, se lavó dos veces con H₂O milliQ durante 1 min cada vez, posteriormente se tiñó con 0.1 % de nitrato de plata durante 20 min en oscuridad, se lavó dos veces con H₂O milliQ durante 1 min cada vez y se reveló con carbonato de sodio al 2 % y formalina (formaldehido al 35 %) al 0.04 %, durante este paso, se realizaron agitaciones por 5 min y se cambió la solución por solución fresca; ésto último se repitió hasta lograr la tinción deseada.

Finalmente, la reacción se detuvo sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 5 % durante 5 min y dando tres lavados subsecuentes de 1 min cada uno con H₂O milliQ.

Protocolo para la técnica de *Western blot*

Posterior a la separación de proteínas mediante SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa pre-humedecida con amortiguador de transferencia (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0.037 % y metanol 20 %, pH 8.3). El protocolo de transferencia empleado consistió en la aplicación de una corriente constante de 400 mA durante 60 min en un sistema de transferencia semiseca (OWL). El paso siguiente consistió en bloquear los sitios libres en la membrana con una solución de leche descremada al 5 % (Svelty) en TBS-T (Tris pH 8.0 30 mM, NaCl 150 mM y Tritón X-100 0.1%). La membrana se incubó durante 1 h a 50 °C con agitación constante, tras lo cual se transfirió la membrana a una solución de TBS-T más leche al 5 % con el anticuerpo primario anti-*PvNodulina 22* (anti-*PvNod22*) en una dilución 1:1000 y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. La membrana fue sometida a 3 lavados con TBS-T durante 10 min cada uno y después se incubó con el anticuerpo secundario, anti- IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer) diluido 1:5000 en TBS-T más leche al 5 %, durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T. Seguido a esto, la señal de reconocimiento del anticuerpo unido a *PvNod22* se analizó añadiendo los substratos necesarios para la reacción enzimática de fosfatasa alcalina, elemento reportero que se encuentra unido al anticuerpo secundario (NBT [nitro blue tetrazolium] y BCIP [5-bromo 4-cloro 3-indolfosfato]) diluidos en agua en una relación 1:1).

Determinación de la eficiencia del protocolo de purificación establecido mediante *Western blot*

Para cuantificar a la proteína se recurrió a la técnica de *Western blot*, ya que la

urea y la alta concentración de sales interfiere con la cuantificación por el método de Bradford. La cuantificación se hizo de la siguiente manera: se purificó a la proteína PvNod22 de acuerdo con el protocolo arriba descrito y se tomó una muestra de 100 μ l de cada uno de los siguientes pasos: extracto total, cuerpos de inclusión y elución y se les agregó 100 μ l de una solución de Laemmli 2x. Posteriormente se tomó 1 ml de la elución y se agregaron 10.5 ml de solución con la que se eluyó, se sometió esta muestra a diálisis (protocolo arriba establecido) y se centrifugó durante 1 h a 16 400 x g a 4 °C; se tomó el sobrenadante y se llevó a cabo la cuantificación por el método de Bradford; seguido a esto se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se resuspendieron en 100 μ l de una solución de Laemmli 1x. Se tomaron 15 μ l de cada una de las cuatro muestras y se resolvieron en un gel de acrilamida al 13 %. Se llevó a cabo el ensayo de *Western blot*, de acuerdo con el protocolo arriba descrito, se capturó la imagen de la membrana y el archivo se procesó con programa FIJI que permitió medir la densidad óptica integrada usando como referencia a la muestra dializada, la cual sí fue cuantificada por el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, BioRad® [usando una curva de 0, 1, 2, 4, 6,8 y 10 μ g/ml de BSA como referencia]).

Tratamientos para inducir estrés por calor y estrés oxidativo en plantas de frijol

Plantas de frijol de 18 días post-germinación crecidas a 28 °C con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, fueron expuestas a 40 °C durante 30 min para inducir el estrés por calor. Para el tratamiento de estrés oxidativo, las plantas fueron asperjadas con H₂O₂ 1 mM, se dejaron en presencia de la solución durante 1 h. Las plantas control fueron crecidas bajo las mismas condiciones, pero no fueron sometidas a ningún tratamiento. Inmediatamente después de finalizado el tratamiento correspondiente, las hojas de las plantas tratadas y las plantas control, fueron colectadas y congeladas en nitrógeno líquido, posteriormente éstas fueron reducidas a un polvo fino en un mortero y almacenadas a -80 °C para su uso subsiguiente.

Extracción de proteína total a partir de tejido de hoja

Se colocó 0.1 g de tejido previamente molido en nitrógeno líquido en un tubo Eppendorf® congelado de 1.5 ml y se le agregó 1.3 ml de una solución con PBS 1x pH 7.4, PVPP 2 % y el coctel comercial de inhibidores de proteasas libres de EDTA Complete™ Mini EDTA-free (Roche®). El tubo se agitó vigorosamente hasta resuspender el tejido. Seguido a esto, se incubó por 10 min a 4 °C en agitación y se centrifugó a 20 000 x g por 10 min a 4 °C; se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo que contenía 50 µl de perlas de agarosa conjugadas a Ni-NTA (QIAGEN®) previamente lavadas y equilibradas (Se colocaron 50 µl de perlas de agarosa conjugadas a Ni-NTA (QIAGEN®) en un tubo Eppendorf®, se centrifugaron a 400 x g por 2 min a temperatura ambiente, se descartó el etanol en que se encontraban suspendidas. Se agregaron 500 µl de H₂O milliQ, se resuspendieron suavemente las perlas y se centrifugaron a 400 x g por 2 min a temperatura ambiente; se agregaron 200 µl de PBS 1x pH 7.4 con la finalidad de equilibrar la matriz, se resuspendieron suavemente las perlas y se centrifugaron a 400 x g por 2 min a temperatura ambiente). Se incubó el extracto con las perlas durante 1 h con la finalidad de limpiarlo. Posteriormente se centrifugaron a 400 x g por 2 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. Finalmente se midió la concentración de proteína por el método de Bradford y se ajustó con una solución de PBS 1x y el coctel comercial de inhibidores de proteasas libres de EDTA Complete™ Mini EDTA-free a 2 mg/ml.

Purificación de interactores de PvNod22

Una vez purificada y aparentemente re-naturalizada, la proteína recombinante PvNod22 se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación en un tubo que contenía agarosa acoplada a níquel, se lavó con PBS. La mezcla se incubó con las mismas condiciones descritas en el paso anterior y se lavó el excedente con PBS, se adicionó 1 mg de extracto proteico total de hojas de *P. vulgaris*, el cual se incubó bajo las mismas condiciones del paso anterior. Se lavó la columna con 1 M de NaCl y finalmente se eluyó a PvNod22 con amortiguador de elución. Esta fracción fue

analizada mediante SDS-PAGE en una sola dimensión.

Obtención de la secuencia de los posibles interactores de PvNod22

Las eluciones provenientes del ensayo de interacción arriba mencionado, fueron sometidas a SDS-PAGE, se seleccionaron las bandas de las proteínas que posiblemente interaccionen con PvNod22, fueron cortadas y enviadas a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras fueron tratadas de la manera siguiente: fueron reducidas con DTT y digeridas *in gel* con tripsina (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI nr a través del programa ProteinProspector, así como también fueron sometidos a la búsqueda restringida contra PDB de UniProt de *Phaseolus* en el Proteome Discoverer 1.4.

Sección 3. Segunda estrategia experimental

Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la tabla III para la amplificación de las zonas de interés mediante el empleo de la polimerasa de DNA *Pfu* (Fermentas), con el objeto de generar extremos romos. El protocolo de la PCR consiste en un periodo de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de a) desnaturalización a 95 °C, 30 s; b) alineamiento de los oligonucleótidos a 60 °C durante 30 s y c) extensión a 72 °C por tiempos variables de 30 a 60 s y, finalmente un periodo de extensión a 72 °C por 7 min.

La mezcla de reacción estuvo conformada por la molécula de DNA molde (5-15 ng) suspendida en amortiguador para PCR, MgSO₄ 1.5 mM, dNTPs a una concentración final de 0.2 mM de cada uno, oligonucleótido sentido 0.2 mM,

oligonucleótido anti-sentido 0.2 mM, *Taq Pfu* polimerasa recombinante 0.05 U/ μ l, y H₂O ultrapura obtenida mediante el paso en un sistema MilliQ (Millipore) hasta 25 μ l de vol. final.

Este mismo protocolo fue seguido para las reacciones de PCR en colonia, sin embargo, se utilizó como molde 1 μ l de una dilución 1:50 de una asada directa del cultivo congelada a -80 grados durante 15 minutos y descongelada por agitación; en este caso se utilizó la polimerasa de DNA *Taq* (Thermo scientific) a la mezcla de reacción y se adicionó 1 mM de MgCl₂.

Tabla III. Oligonucleótidos empleados en las diversas PCR.

Fragmento	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')
<i>Pvnod22</i>	CAC CAT GAT ACA AAA GGT GTC TCT GAT CTT	AAA CTG TAC AAG CAC AAG TCT ACC ACC A
ps	CAC CAT GAT ACA AAA GGT GTC TCT GAT CTT	CGC CGC AGA GGA TTG CAA CAC
M13	GTA AAA CGA CGG CCAG	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13-RvPs	GTA AAA CGA CGG CCA G	CGC CGC AGA GGA TTG CAA CAC
Sps5'-M13	CAC CTT CCA CAG TAG CAA AAA CAG CAT CAT G	CAG GAA ACA GCT ATG AC
CaMV35S- <i>Pvnod22</i>	CCA CTA TCC TTC GCA AGA CCC TTC	AAA CTG TAC AAG CAC AAG TCT ACC ACC A
CaMV35S-ps	CCA CTA TCC TTC GCA AGA CCC TTC	CGC CGC AGA GGA TTG CAA CAC
protA	CGG AAT TCG CGT CTA CTT TC	CTC TTG CGC AAC ACG ATG A

Análisis del fragmento de DNA amplificado mediante PCR

La verificación del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos por medio de la PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 1 μ g/ml disuelto en amortiguador de corrida TAE (10 mM Tris, 1 mM EDTA-Na₂, 1.2 mM ácido acético glacial, pH 8). El voltaje aplicado fue de 90 V. Como amortiguador de carga se utilizó

sacarosa al 40 % (p/v) y azul de bromofenol al 0.25% (v/v) disueltos en agua MilliQ. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1 Kb (Fermentas).

Clonación de las secuencias obtenidas en el vector pENTR/D-TOPO

Se utilizó el paquete de clonación direccional pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Como requisito de clonación unidireccional del fragmento deseado en el vector de clonación a los oligonucleótidos sentido (5'-3') se les adicionaron 4 pares de bases (CACC) en el extremo 5'. Fue necesario utilizar a la polimerasa *Pfu* que proporciona extremos romos en los amplicones. El vector pENTR/D-TOPO contiene una enzima topoisomerasa que permite la ligación del fragmento modificado a la secuencia "CACC". La reacción de ligación de los fragmentos con el vector de clonación se llevó a cabo usando una relación molar de 0.5-2:1 del producto de PCR con respecto al vector de clonación. El protocolo consistió en mezclar el producto de PCR con el vector de clonación en una solución salina (0.05 M NaCl y 0.0025 M MgCl₂). La reacción se incubó a 25 °C durante 12 h.

Transformación de células electro-competentes de *E. coli* DH5α

Se descongelaron alícuotas de 50 µL de células de *E. coli* electro-competentes en hielo de 15 a 20 min. Se adicionaron de 50-100 ng del producto de ligación o del producto de recombinación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, las células se sometieron a un choque eléctrico de 1 700 V por 5 ms, se recuperaron en 250 µl de medio S.O.C. (Anexo 2) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. El cultivo se distribuyó en placas de LB suplementadas con kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron por 12 h a 37 °C.

Recombinación con el vector binario pEarleyGate205

Una vez que se obtuvo el fragmento deseado dentro del vector de clonación (pENTR/TOPO, Invitrogen), éste se usó como molde de partida para una PCR que

incluyó a los oligonucleótidos universales M13 sentido y anti-sentido (Tabla III). Estos oligonucleótidos amplificaron a la secuencia de interés y a las regiones flanqueantes de recombinación. 50 fmoles del vector de entrada o del producto de PCR se recombinaron con 50 fmoles del vector pEarleyGate205, utilizando 1 μ l de la enzima LR clonasa (Invitrogen™) suspendida en amortiguador TE, pH 8.0 (10 mM de tris-HCl, 1 mM EDTA) en un vol. final de 10 μ l. La reacción de recombinación se incubó durante 12 h a 25 °C, tras lo cual fue tratada con proteinasa K a una concentración final de 0.18 ng/ μ l por 10 min a 37 °C. La proteinasa K degrada a la LR clonasa y detiene el proceso de recombinación. Posteriormente, y con el fin de transformar genéticamente a las células de *E. coli* DH5 α , se llevó a cabo el protocolo de electroporación. Se realizó la selección de células transformadas genéticamente con las construcciones deseadas mediante PCR en colonia, método que permitió verificar la presencia de los genes de interés. A continuación se purificaron los plásmidos respectivos mediante el protocolo descrito en la sección previa y se determinó la secuencia nucleotídica de interés por el método de secuenciación de DNA por terminación de ciclo de amplificación mediado por compuestos fluorescentes en la Unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (o *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing*), a través del uso de los oligonucleótidos M13 (*Forward* y *Reverse*). De esta manera se generaron las construcciones 35S:*Pvnod22*:TAP y 35S:PvPs:TAP; la primera contiene al ORF de *Pvnod22* sin codón de paro y la segunda contiene sólo a la región que codifica para el péptido señal (Ps) de *PvNod22*.

Transformación de células quimio-competentes de *A. rhizogenes*

Se descongelaron alícuotas de 50 μ L de células de *A. rhizogenes* quimio-competentes en hielo de 15 a 20 min. Se adicionaron de 50-100 ng del producto de ligación o del producto de recombinación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Seguido a esto, la mezcla se incubó durante 30 s a 42 °C, sin agitar, la mezcla se transfirió nuevamente a hielo donde se incubó durante 2 min. Posteriormente, se recuperaron en 250 μ l de medio S.O.C. tras lo cual se incubaron durante 2 h a 30 °C. El cultivo se distribuyó en placas de LB suplementadas con kanamicina (50 μ g/ml) y se

incubaron de 24 a 36 h a una temperatura de 30 °C.

Generación de raíces transgénicas de *P. vulgaris* mediada por *A. rhizogenes*

Se modificó ligeramente el protocolo de Estrada-Navarrete *et al*, 2007. Se colocaron 150 semillas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa en un matraz estéril y se lavaron dos veces con H₂O milliQ estéril, se descartó el agua y se agregaron 150 ml de etanol al 96 %, se dejaron en el alcohol durante 1 min, se descartó el etanol y se lavaron tres veces con H₂O milliQ estéril. Se les agregaron 5 ml de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 5 % y se dejaron reposando durante 5 min, tras lo cual se sometieron cinco veces a lavados con 200 ml de H₂O milliQ estéril. Posteriormente las semillas estériles se colocaron sobre un colchón estéril de toallas de papel húmedecidas con agua en una charola metálica con una separación de aproximadamente 2 cm entre semila y semilla. Se cubrió la charola con papel aluminio, se posicionó de manera ligeramente inclinada y se incubaron en oscuridad durante 48 h a una temperatura de 28 ° C. El mismo día que las semillas fueron esterilizadas, se estriaron las cepas *A. rhizogenes* convenientes sobre un plato de medio LB con kanamicina y se dejaron en incubación a 30 °C durante 48 h. Las plántulas se transfirieron a tubos de cristal estériles con la solución nutritiva B&D compuesta por solución A (CaCl₂ 2M), solución B (KH₂PO₄ pH 7.0), solución C (citrato férrico, esta solución debe almacenarse evitando su exposición a la luz), solución D (MgSO₄ 0.5 M, K₂SO₄ 0.5 M, MnSO₄ 2 mM, H₃BO₃ 4 mM, ZnSO₄ 1 mM, CuSO₄ 4 mM, CoSO₄ 0.2 mM, Na₂MoO₄ 0.2 mM); se mezclaron 0.5 ml de cada solución por cada litro de agua y se le agregaron 8 ml de KNO₃ 1 M (8 mM de nitrógeno final). Durante la transferencia de las plantas, éstas fueron inoculadas con el cultivo bacteriano. La inoculación consistió en hacerles dos pequeñas incisiones debajo de los cotiledones (una de cada lado del tallo) con la punta de una jeringa estéril, para después colocar cuidadosamente una gota del cultivo colectado directamente de la caja Petri con ayuda de un asa estéril, los frijoles se colocaron sobre un soporte de plástico de tal manera que quedaran al ras de la solución, pero la raíz quedara sumergida en ella. Los tubos se cubrieron con una tapa para evitar la evaporación de la solución, y eventualmente esta tapa se cambió por

Parafilm con un orificio para que la planta pudiera crecer fuera del tubo. Las plantas se dejaron crecer por aproximadamente dos semanas, agregando solución a los tubos cada tres días, hasta que emergieron las raíces pilosas, las cuales identificamos debido a su agravitropismo; en este punto se hizo un corte sobre el tallo, justo debajo de las raíces pilosas con la finalidad de eliminar a la raíz primaria y permitir el crecimiento de las raíces pilosas. Después de esto se dejó crecer a las raíces por dos semanas más y se colectaron todas en nitrógeno líquido, se maceraron y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Extracción de RNA

Se colectaron las raíces pilosas de 40 plantas para cada caso de manera independiente y se siguió el procedimiento siguiente para la extracción de RNA: se tomó 0.1 g de tejido y se le agregó 500 µl de buffer de extracción (clorhidrato de guanidina 8 M, MES 20 mM, EDTA 20 mM) y 6 µl de β-mercaptoetanol, se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 16 400 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante (alrededor de 600 µl) a un tubo nuevo y se le agregaron 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo, se agitó nuevamente hasta quedar homogéneo, se volvió a centrifugar bajo las condiciones antes mencionadas, se transfirió el sobrenadante, sin tocar la interfase, a un tubo nuevo y se repitió la operación anterior. Seguido a esto se precipitó el RNA con 600 µl de isopropanol y 60 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 durante 2 h a -20 °C. Se centrifugó a 16 400 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó por 10 min más, se dejó secar la pastilla sobre la mesa de trabajo durante aproximadamente 30 min y se resuspendió en H₂O milliQ estéril.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó con el paquete RevertAid Kit (Thermo scientific) de acuerdo con su protocolo: 5 µg de RNA se sometieron a un tratamiento con 2.5 U de la enzima DNAsa I, en un volumen total de 25 µl. Se incubó por 30 min a 37 °C; acto

seguido se adicionaron 2.5 μ l de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C durante 10 min. Posteriormente se tomaron 2 μ g de ARN, se adicionó 1 μ l de oligonucleótidos dT18 100 μ M y se agregó agua para un volumen de 24 μ l; se incubó por 5 min a 65 °C. Después, a cada tubo se agregaron 8 μ l de amortiguador de reacción 5x, 2 μ l de RiboLock y 4 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM, así como 2 μ l de enzima transcriptasa reversa; se incubó por 1 h a 42 °C y posteriormente los tubos fueron transferidos a 70 °C donde se mantuvieron por 5 min. El equivalente a 100 ng de RNA fueron usados para las reacciones de PCR.

RESULTADOS

Resultados experimentales de la primera estrategia

Purificación y re-naturalización de la proteína PvNod22 recombinante

En el trabajo de tesis de maestría del Biol. Jonathan I. Rodríguez, se reportaron las condiciones experimentales para lograr la purificación de PvNod22 recombinante a partir de cuerpos de inclusión formados en *E. coli*; así como su posterior renaturalización. Sin embargo, tras innumerables réplicas de este protocolo no se logró obtener a la proteína soluble (Figura 6b). Por esa razón, decidimos establecer un nuevo protocolo de purificación y re-naturalización de PvNod22.

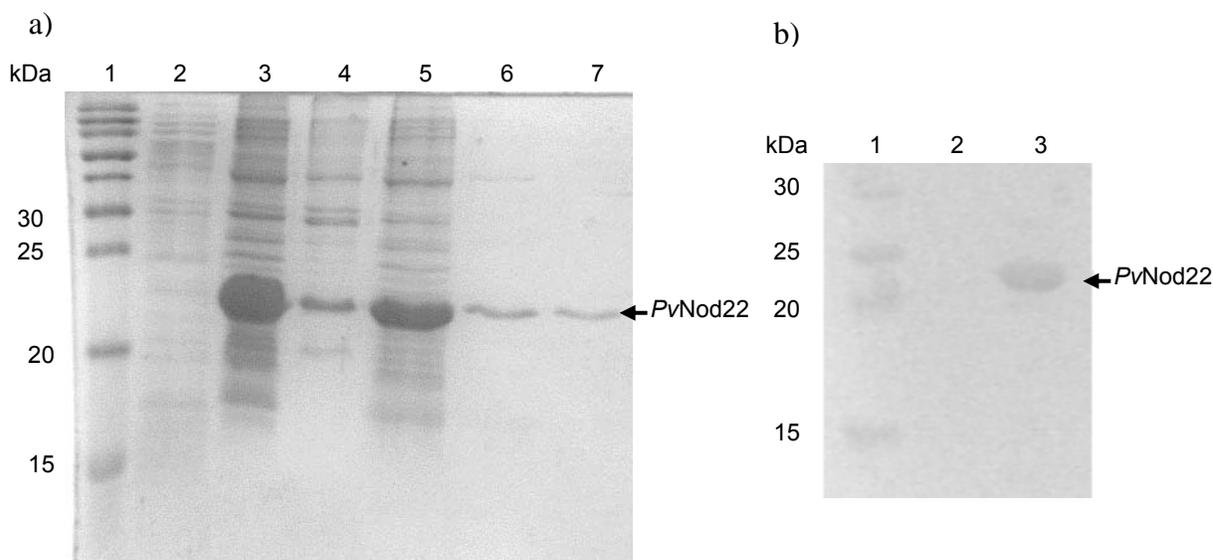


Figura 6. Perfil de proteínas del proceso de purificación y re-naturalización de PvNod22 a partir de cuerpos de inclusión formados en *E. coli*, y re-solubilizados en 8 M de urea. a) Carril 1, marcador de peso molecular (MPM); carriles 2 y 3, se observa el perfil de proteínas contenidas en las fracciones solubles y en cuerpos de inclusión de *E. coli*, respectivamente; carril 4, perfil de proteínas insolubles en urea; carril 5, perfil de proteínas solubles en urea; carril 6, representa la fracción con la que se incubó la columna, y el carril 7 contiene el producto de elución de ésta. **b)** La fracción de elución (carril 7, panel a) se dializó con HEPES 25 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, pH 7.5. Carril 1, MPM; carril 2, fracción soluble; carril 3, fracción precipitada.

Se decidió utilizar una concentración menor del agente desnaturizante, por lo que optamos por una solución de PBS suplementada con 4 M de urea para resolubilizar a los cuerpos de inclusión, y se sustituyeron los lavados con 8 M de urea por lavados con PBS 1x/urea 4 M. Se llevaron a cabo 3 lavados con un PBS 1x/ NaCl 0.5 M/ imidazol 60 mM con la finalidad de eliminar interacciones inespecíficas de la matriz y finalmente se eluyó con una solución de PBS 1x/ urea 2 M/ 200 mM imidazol (Figura 7).

Posteriormente se llevó a cabo la re-naturalización de la proteína a través de una serie de cambios de amortiguador de diálisis donde se retiraron gradualmente a los agentes desnaturizantes (Figura 7).

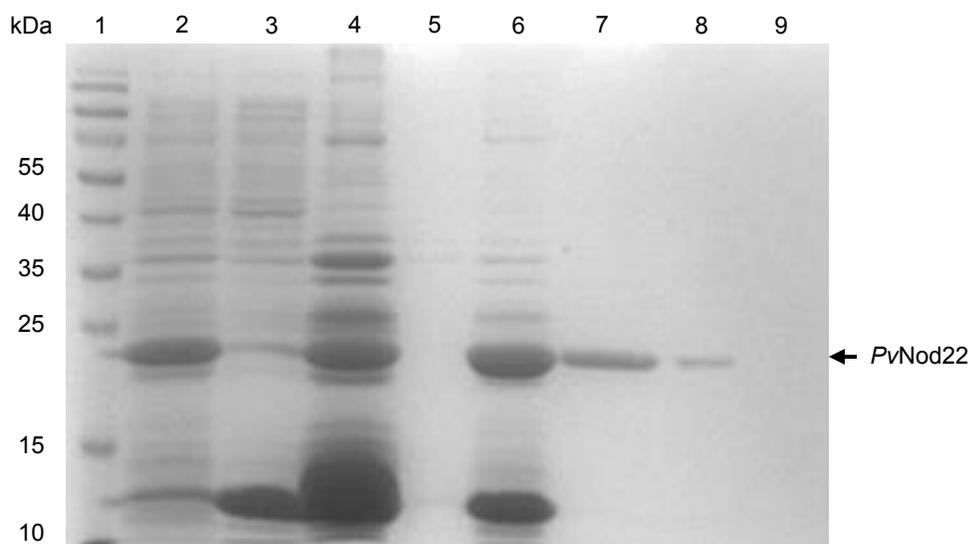


Figura 7. Perfil de proteínas obtenidas por un proceso de purificación de *PvNod22* en 4 M de urea, e imidazol como agente eluyente, en una solución no ácida. Carril 1, MPM; carril 2, extracto crudo; carril 3, fracción soluble; carril 4, cuerpos de inclusión; carriles 5 y 6, cuerpos de inclusión resuspendidos, fracción precipitada y fracción soluble, respectivamente; carril 7, elución; carriles 8 y 9, fracciones soluble y precipitada, respectivamente, provenientes de la diálisis.

Con la finalidad de conocer el rendimiento del protocolo establecido, se llevó a cabo la cuantificación de la proteína obtenida a través de un ensayo de *western blot* de las fracciones mencionadas en la gráfica (Figura 8b). El rendimiento obtenido fue de 2.7 mg de proteína soluble por cada 100 ml de cultivo inicial.

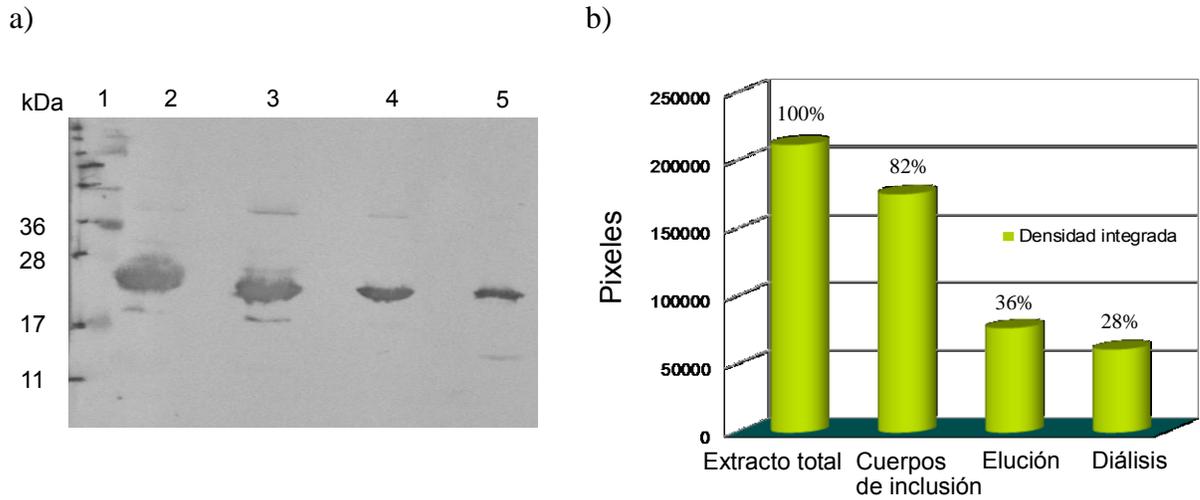


Figura 8. Rendimiento de purificación de PvNod22. Se compararon las densidades integradas de cada una de las bandas mediante la aplicación Image J, tomando como el 100 % la PvNod22 presente en el extracto total. **a)** Western blot de PvNod22 en: 1, MPM. 2, extracto total de *E.coli*. 3, cuerpos de inclusión. 4, elución de la columna de afinidad. 5, proteína soluble proveniente de la diálisis. **b)** Gráfica de los datos obtenidos de la figura a).

Para determinar si PvNod22 se encontraba en su estado de monómero o multímero analizamos una muestra obtenida de la diálisis en un gel nativo y lo teñimos con plata (Figura 9). Observamos que aparece una banda de 669 KDa por lo cual es probable que PvNod22 se encuentre estructurada en su forma multimérica.

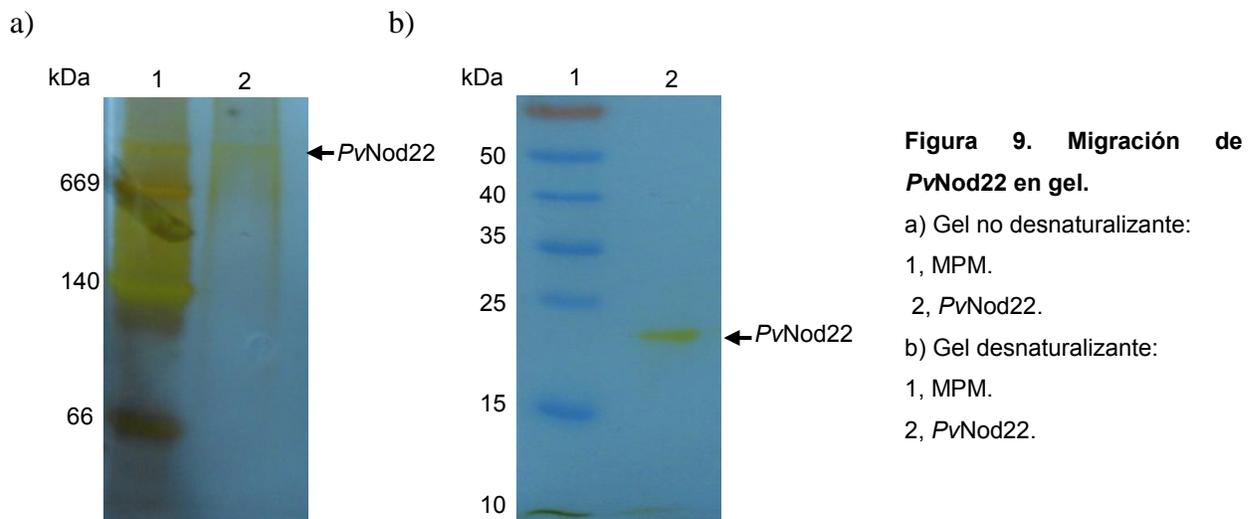


Figura 9. Migración de PvNod22 en gel.

a) Gel no desnaturizante:

1, MPM.

2, PvNod22.

b) Gel desnaturizante:

1, MPM.

2, PvNod22.

Aislamiento de interactores de *PvNod22* a partir de extracto de plantas estresadas

Finalmente se llevaron a cabo ensayos en columna de afinidad acoplada a *PvNod22* para “atrapar” a sus interactores biológicos (Figura 10). Decidimos probar extractos de hojas de plantas de frijol estresadas por H_2O_2 o por choque térmico a $40^\circ C$ durante 30 min.

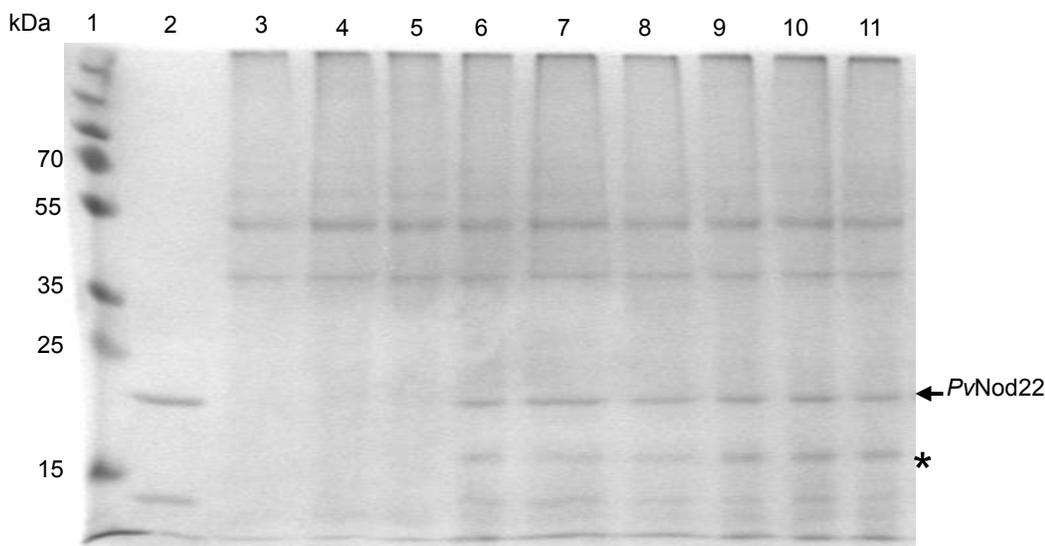


Figura 10. Perfil electroforético de posibles interactores de *PvNod22*. 1, MPM.2, *PvNod22*. 3,4 y 5, elución de proteínas unidas a la columna de Ni-NTA a partir de extractos de hoja control, hoja a $40^\circ C$ y hoja con H_2O_2 , respectivamente. 6,7 y 8, elución de proteínas unidas a la columna acoplada a *PvNod22* a partir de extractos de hoja control, hoja a $40^\circ C$ y hoja con H_2O_2 , respectivamente. 9,10 y 11, elución de proteínas unidas a la columna acoplada a *PvNod22* a partir de extractos de hoja control, hoja a $40^\circ C$ y hoja con H_2O_2 respectivamente, en presencia de 2 mM de Ca^{2+} . Asterísco: indica banda que aparece sólo en presencia de *PvNod22* con extracto.

Por otro lado, en un reporte del 2010 se demuestra que la proteína HSP1, uno de los homólogos de *PvNod22* en *A. thaliana*, interacciona con la proteína CPK10, sólo en presencia de 2 mM de Ca^{2+} (Zou, *et al*, 2010), ión que actúa como segundo mensajero en las vías de señalización de diversos tipos de estrés (Larkindale y Knight, 2002). Debido a esta razón, los extractos de plantas estresadas y de plantas control se incubaron en 2 mM de Ca^{2+} y se hicieron pasar por la columna con la matriz acoplada a *PvNod22* (Figura 10).

Se observó que ciertas proteínas se quedan unidas directamente a la columna de Ni-NTA (Figura 10, carriles 3-5); estas bandas aparecen también en los carriles donde se analizaron las muestras de los ensayos de interacción con *PvNod22* (Figura 10, carriles 6-11). No se observó la presencia de alguna banda diferencial entre la condición control y las condiciones de estrés, sin embargo, en todos los casos donde *PvNod22* estuvo en contacto con el extracto total de proteínas de hoja, sin importar que fueran hojas control o estresadas, apareció una banda entre 15 y 25 kDa (Figura 10, carriles 6-11, marcada con asterísco). Además, la presencia de Ca^{2+} en el medio pareció no cambiar el patrón de bandas en el gel.

Con el afán de obtener una mejor visualización de las bandas, decidimos ajustar el protocolo para aumentar la concentración de proteínas para llevar a cabo el ensayo de interacción (Figura 11). Por otro lado observamos, en el gel teñido con Coomasie, que la banda presente alrededor de 55 kDa presentaba un cambio tanto en intensidad de la banda, como en la aparición de 2 nuevas bandas cercanas a ésta (Figura 11, carril 6, incisos 4 y 5) cuando las plantas fueron sometidas a estrés por calor.

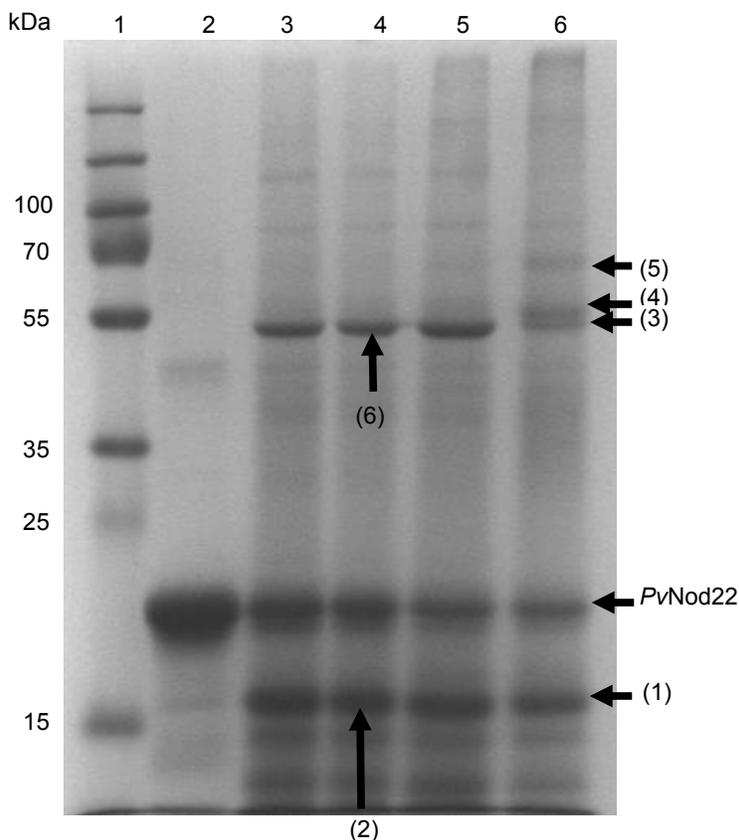


Figura 11. Perfil de elución de proteínas de hoja de frijol, en presencia de Ca^{2+} , estrés por calor y estrés oxidativo, unidas a *PvNod22*. a) 1, MPM. Elución de: 2, *PvNod22* unida a columna Ni-NTA. 3, *PvNod22* unida a columna Ni-NTA e incubada con extracto de proteínas totales de hoja control de frijol. 4, *PvNod22* unida a columna Ni-NTA e incubada con extracto de proteínas totales de hoja control de frijol en presencia de Ca^{2+} . 5, *PvNod22* unida a columna Ni-NTA e incubada con extracto de proteínas totales de hoja sometida a estrés oxidativo por H_2O_2 . 6, *PvNod22* unida a columna Ni-NTA e incubada con extracto de proteínas totales de hoja sometida a estrés por calor a 40 °C durante 30 min. Las flechas y número señalan a las bandas que fueron seleccionadas para ser secuenciadas.

Para conocer la identidad de estas proteínas recurrimos a la secuenciación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en secuencia continua (LC-MS/MS) (Figura 11a), los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Resultados de secuenciación de proteínas provenientes del ensayo de interacción.

Muestra en gel	Descripción	Peso molecular (kDa)	Cobertura
1	<i>PvNod22</i>	21.6	58.59
2	<i>PvNod22</i>	21.6	66.16
3	Cadena larga de RuBisCO	52.8	49.37
4	Cadena larga de RuBisCO	52.8	47.9
5	Cadena larga de RuBisCO	52.8	45.38
5	<i>PvNod22</i>	21.6	66.67
5	Cadena corta de RuBisCO	14.2	68.6
6	Cadena larga de RuBisCO	52.8	55.04

Las bandas 1 y 2 resultaron ser un fragmento de la proteína *PvNod22*, las bandas 3,4 y 6 resultaron ser la cadena larga de la enzima RuBisCO y la banda 5 resultó corresponder a tres proteínas: la cadena larga, la cadena corta de la RuBisCO y la proteína *PvNod22*.

Resultados de la segunda estrategia experimental

Decidimos explorar otra estrategia experimental para aislar complejos de proteínas unidas a *PvNod22* directamente de raíces transgénicas de frijol transformadas con una quimera de *PvNod22* fusionada a una etiqueta para “purificación de afinidad en secuencia continua” (TAP por sus siglas en inglés), la cual consiste de un péptido de unión a calmodulina y un péptido de proteína A repetido (protA 2x), que tiene la capacidad de unirse a inmunoglobulinas (Ig) sobre todo las del tipo G (IgG) (Figura 12). Ambos péptidos están separados a través de una secuencia que contiene un sitio de corte para la proteasa TEV (Bürckstümmer *et al.*, 2006. Figura 12). La estructura de dicha etiqueta se ilustra a continuación:



Figura 12. Representación de la etiqueta TAP. La etiqueta TAP presenta la secuencia del fragmento de un péptido de unión a calmodulina, seguido de un sitio de corte para la proteasa TEV y finalmente dos fragmentos en secuencia continua de la proteína A (peso total de 20.7 kDa). La fusión de la etiqueta TAP se llevó a cabo en la región carboxilo de nuestra proteína de interés. Tomado de Bürckstümmer *et al.*, 2006.

Generación de la construcción de las construcciones 35S:*Pvnod22*: TAP y 35S: PvPs: TAP

El primer paso para la generación de la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP, fue la amplificación mediante PCR de la secuencia *Pvnod22* (Anexo 1) con sus oligonucleótidos específicos mediante PCR (Tabla III) y su inserción en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Figura 13).

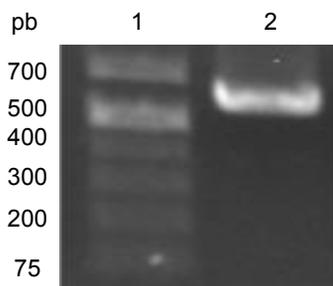


Figura 13. Amplificación del gen *Pvnod22* sin codón de paro. Carril 1, MPM; carril 2, producto de la amplificación del gen *Pvnod22* (601 pb).

Debido a que el vector destino posee al gen *ccdB* (codifica para una toxina que interfiere con la actividad de la girasa de DNA) que selecciona negativamente a aquellas células que no han recombinado, necesariamente, debe pasar por un proceso de recombinación para eliminar a dicho gen. Por otro lado, era necesario generar un control para los ensayos de captura de los interactores, es decir, una construcción para transformar raíces de plantas donde no estuviera *PvNod22*, pero sí se expresara la etiqueta TAP. Cabe recordar que *PvNod22* presenta un péptido señal (Ps), lo cual quiere decir que es introducida al sistema endomembranal, por lo tanto, la etiqueta TAP

sola también tendría que localizarse en dicha región.

Tomando en cuenta las razones anteriores, se decidió fusionar el fragmento correspondiente al Ps de la proteína *PvNod22* (PvPs) a la etiqueta TAP y utilizarla como control. Esta secuencia ya había sido insertada previamente en el vector pENTR/D-TOPO (denominada pENTR-PvPs) y clonada en células de *E. coli* DH5 α (Cynthia Martínez-Centeno, tesis de licenciatura).

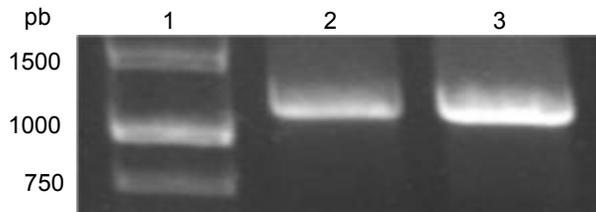


Figura 14. Amplificación del gen *Pvnod22* más sitios *attL* 1 y 2. Carril 1, MPM; carriles 2 y 3, producto de la amplificación utilizando como molde dos colonias distintas. Producto esperado de 922 pb, producto observado, mayor a 1000 pb.

La secuencia de *PvNod22* fue clonada en células de *E. coli* DH5 α y se procedió a la amplificación del fragmento *Pvnod22* acompañado de los sitios de recombinación *attL* 1 y 2 a los lados, éstos sitios permiten la recombinación con el vector destino pEarleyGate 205, el cual contiene la secuencia de la etiqueta TAP para ser fusionada en la región C-terminal de nuestra proteína de interés. Para lograr lo anterior, se usaron los oligonucleótidos M13 (Figuras 14 y tabla III). Se decidió no llevar a cabo la recombinación directa de vector a vector debido a que ambos vectores tienen una secuencia génica de resistencia a Kanamicina como marcador de selección.

El tamaño esperado para el fragmento *Pvnod22* era de 922 pb, sin embargo, obtuvimos bandas arriba de 1000 pb (Figura 14), se aumentó la astringencia de la reacción de PCR, pero aun así, la banda seguía apareciendo. Se obtuvo la secuencia del fragmento insertado sin embargo no parecía haber algún problema. Recurrimos al análisis del patrón de restricción de esta construcción molecular con la enzimas *PvuI* (Figura 15b, carriles 3 y 5), la cual tiene un sitio de corte en el vector pENTR/D-TOPO y otro en la secuencia de *Pvnod22*. Se utilizó también la enzima *HpaI*, sólo para linearizar el vector (Figura 15b, carriles 2 y 4). El corte con *PvuI* debía generar dos fragmentos como se observa en la predicción del programa *Serial Cloner* (www.serialbasics.com) (Figura 15a), sin embargo se obtuvieron tres fragmentos (Figura 15b, carriles 3 y 5); lo anterior sugiere que pudiera haberse insertado un fragmento adicional de *Pvnod22*.

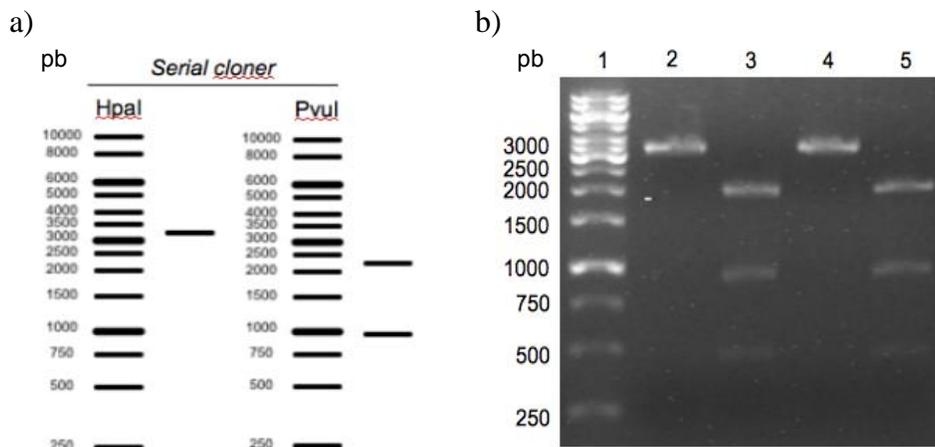


Figura 15. Patrón de restricción de la construcción pENTR-*Pvnod22*. a) Predicción del patrón de digestión de la construcción pENTR-*Pvnod22* con el programa *Serial Cloner*. b) Patrón de restricción observado. Carril 1, MPM; carril 2, pENTR-*Pvnod22* proveniente de la primera colonia digerido con *HpaI*; carril 3, pENTR- *Pvnod22* proveniente de la primera colonia digerido con *PvuI*; carril 4, pENTR-*Pvnod22* proveniente de la segunda colonia digerido con *HpaI*; carril 5, pENTR- *Pvnod22* proveniente de la segunda colonia digerido con *PvuI*.

Por otro lado, en lo que respecta al fragmento Ps, se procedió directamente a amplificar los fragmentos que poseen los sitios *attL* 1 y 2 con los oligonucleótidos M13 (Figura 16) a partir de la construcción pENTR-PvPs ya existente. Se observó la amplificación de una banda inespecífica alrededor de los 300 pb aún y cuando se aumentó la temperatura de reacción para incrementar la astringencia (Figura 15), por lo cual se procedió a purificar la banda de interés (alrededor de 400 pb).

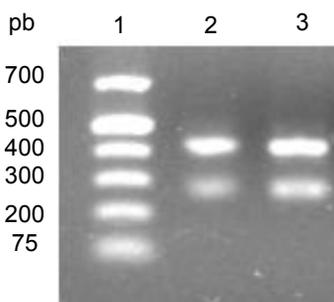


Figura 16. Amplificación del fragmento PvPs más sitios *attL* 1 y 2. Se amplificó la secuencia de interés más los sitios de recombinación *attL* 1 y *attL* 2 usando el par de oligonucleótidos M13. Carril 1, MPM; carril 2, producto de la amplificación a 55 °C; carril 3, producto de la amplificación a 58 °C.

Una vez más, amplificamos mediante PCR el marco abierto de lectura de *Pvnod22*, pero esta vez, se llevó a cabo una PCR en gradiente (Figura 17). Se utilizó el producto de la amplificación a 62 °C para clonarlo en el vector pENTR/D-TOPO.

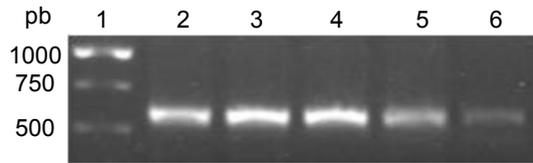
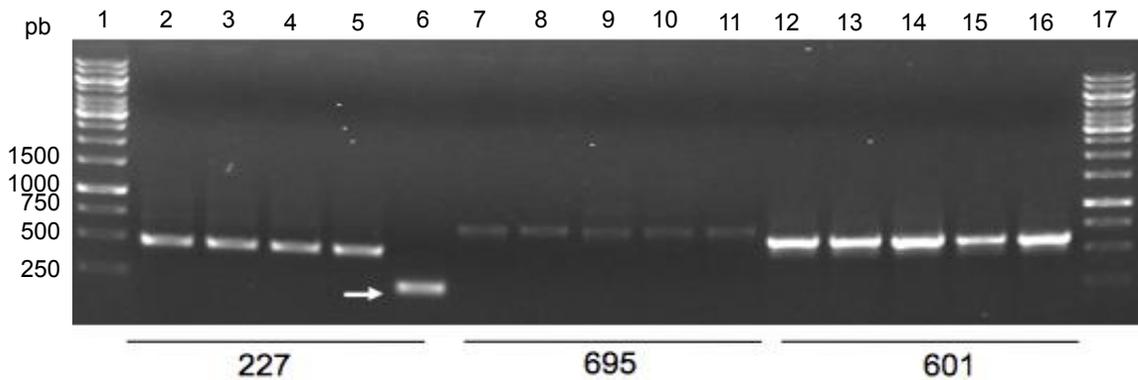


Figura 17. PCR en gradiente del gen *Pvnod22*. Carril 1, MPM; carriles 2-6, amplicones provenientes de la amplificación a 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C y 68 °C, respectivamente.

Se transformaron células DH5 α y se seleccionaron algunas colonias, las cuales fueron utilizadas como molde para reacciones de PCR con distintos pares de oligonucleótidos (Tabla III, Figura 18) con la finalidad de comprobar que la dirección y el tamaño del fragmento clonado eran los correctos esta vez. Se seleccionó la colonia con la que se amplificaron todos los fragmentos del tamaño esperado (Figura 18a, carril 6) y se le extrajo plásmido, el cual fue sometido a un análisis de restricción (Figura 19b) y a su posterior secuenciación.

a)



b)

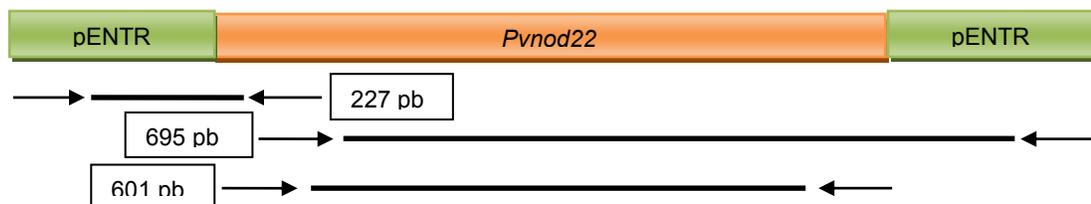


Figura 18. PCR en colonia para corroborar direccionalidad correcta del inserto *Pvnod22*. a) Carriles 1 y 17, MPM; carriles 2-6, amplicones provenientes de la amplificación con oligonucleótido M13 sentido y un oligonucleótido reverso que se ancla a la secuencia de *Pvnod22* (RVPs) usando como molde 5 colonias distintas. Carriles 7-11 amplicones provenientes de la amplificación con un oligonucleótido sentido interno de *Pvnod22* (Sps5') y M13 anti-sentido usando como molde las 5 colonias seleccionadas. Carriles 12-16 amplicones provenientes de la amplificación con oligonucleótidos específicos del marco abierto de lectura de *Pvnod22* usando como molde las 5 colonias seleccionadas. Bajo la imagen se muestra el tamaño esperado del amplicón en pb. La flecha indica la colonia seleccionada. b) Esquema de amplificaciones.

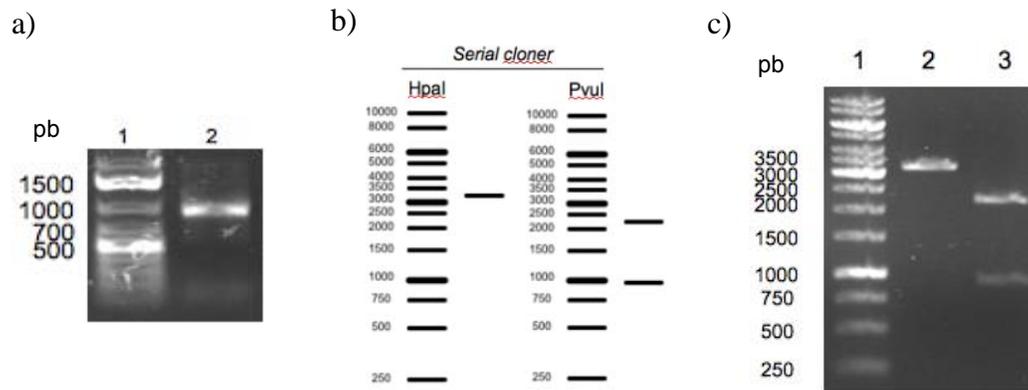


Figura 19. Análisis de la construcción pENTR-*Pvnod22* mediante PCR y restricción. a) Amplificación mediante PCR del gen *Pvnod22* más los sitios de recombinación *attL* 1 y *attL* 2 usando el par de oligonucleótidos M13. Carril 1, MPM; carril 2, producto de la amplificación. b) Predicción del patrón de restricción de la construcción pENTR-*Pvnod22* (3177 pb) con el programa *Serial Cloner*. c) Patrón de restricción observado de la construcción pENTR-*Pvnod22*. Carril 1, MPM; carril 2, pENTR-*Pvnod22* proveniente de la colonia 5 digerido con *HpaI*; carril 3, pENTR-*Pvnod22* proveniente de la colonia 5 digerido con *PvuI*.

Posterior a ésto, se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar con los oligonucleótidos M13, y se observó una banda de alrededor de 1000 pb para un fragmento esperado de 922 pb (Figura 19a). Ulteriormente se llevó a cabo la reacción de recombinación de producto de PCR a vector destino en proporción de 1:1 en cuanto a molaridad. Se transformaron células DH5 α , se seleccionaron algunas clonas para amplificar mediante PCR a *Pvnod22* (Figura 20a). De dichas clonas, seleccionamos algunas provenientes de cada recombinación, se les extrajo el plásmido y se obtuvo la secuencia del inserto. Se seleccionó una clona con base en su secuencia y a esta construcción se le denominó 35S:*Pvnod22*:TAP. En cuanto al Ps, se purificaron las bandas de alrededor de 400 pb y se utilizaron para hacer la recombinación de producto de PCR al vector destino en proporción de 1:1 molar. Estas reacciones se utilizaron para transformar células DH5 α , se seleccionaron algunas colonias, fueron analizadas mediante PCR en colonia (Figura 20b), se seleccionaron algunas clonas positivas y se obtuvo la secuencia de los insertos, a la construcción resultante se le denominó 35S: PVPs: TAP.

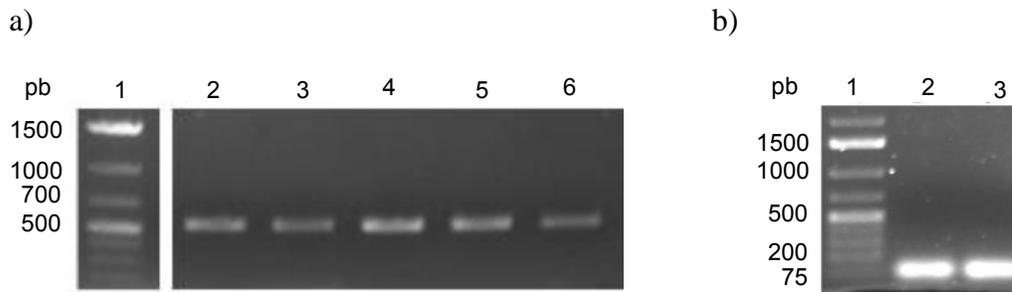


Figura 20. PCR en colonia de clonas con los insertos de interés en el vector binario pEarleyGate 205. a) Amplificación de los fragmentos *Pvnod22*. Se amplificó al fragmento *Pvnod22* usando el par de oligonucleótidos *Pvnod22* (tabla III). Carril 1, MPM; carriles 2-6 productos de la amplificación usando como molde 5 colonias distintas. b) Amplificación del fragmento Ps. Se amplificó al fragmento Ps usando el par de oligonucleótidos ps (tabla III). Carril 1, MPM; carriles 2 y 3 amplificación de Ps a partir de dos clonas distintas.

Finalmente, se transformaron células de *A. rhizogenes* K599 con cada una de las dos construcciones, se seleccionaron algunas colonias y fueron sometidas a PCR en colonia para verificar la presencia e integridad del inserto. Para la amplificación mediante PCR se utilizó un oligonucleótido sentido que se ancla a la región 3' del promotor CaMV35S y con un oligonucleótido específico que se ancla al final de la secuencia de *PvNod22* o del *PvPs* según sea el caso (Figura 21).

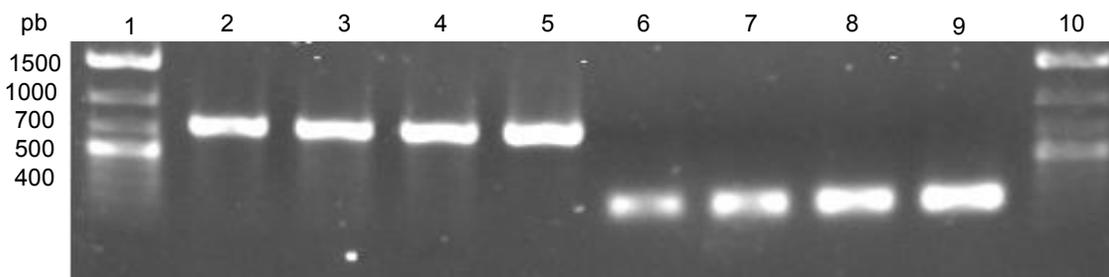


Figura 21. Resultados obtenidos tras la amplificación de DNA por PCR para verificar la presencia de las construcciones 35S:*Pvnod22*:TAP y 35S:*PvPs*:TAP en *A. rhizogenes*. Carril 1, MPM; carriles 2-4, amplicones usando como molde vectores provenientes de 3 colonias con la construcción 35S: *Pvnod22*:TAP, carril 5; control positivo. Carriles 6-8, amplicones usando como molde vectores provenientes de 3 colonias con la construcción 35S:*PvPs*:TAP; carril 9, control positivo; carril 10, MPM.

Una vez confirmada la presencia de las construcciones moleculares en colonias de *A. rhizogenes*, se generaron raíces transgénicas en plantas de frijol con cada una de las construcciones seleccionadas (Figura 22a). Se colectaron las raíces pilosas, se congelaron en nitrógeno líquido y se maceraron para extraer su RNA (Figura 22b); se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de estos RNA. El cDNA fue sometido a PCR punto final con la finalidad de conocer si los transcritos de las construcciones se encontraban presentes. Para esto, se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieran amplificar un fragmento de la etiqueta TAP (ProtA). Para la reacción de PCR se usó como molde el cDNA de las plantas transformadas con la cepa K599 de *A.rhizogenes* de tipo silvestre (WT) (Figura 23, carril 1), el cDNA de las plantas transformadas con la cepa K599 que acarrea la construcción 35S:PvPs:TAP (Figura 23, carril 2), el cDNA de las plantas transformadas con la cepa K599 que acarrea la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP (Figura 23, carril 3). Se usaron como controles positivos

a)



b)

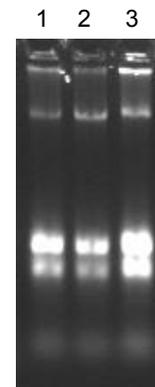
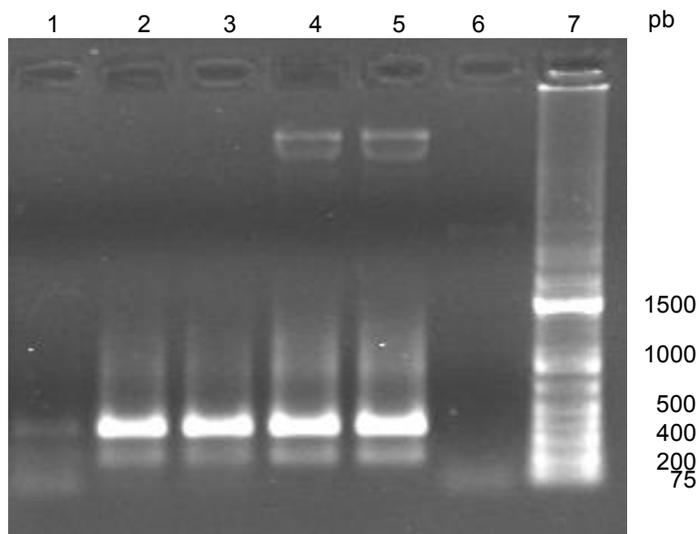


Figura 22. Generación de raíces pilosas en frijol mediada por *A. rhizogenes* y extracción del RNA de las plantas. a) de izquierda a derecha, ejemplos de plantas transformadas con: una cepa *A. rhizogenes* sin transformar, una cepa transformada con la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP, cepa transformada con la construcción 35S:PvPs:TAP, en el tubo de la orilla derecha se muestra una planta que no generó raíces pilosas. b) Carril 1, RNA extraído de plantas transformadas con la cepa vacía; carril 2, RNA extraído de plantas transformadas con la cepa con la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP; carril 3, RNA extraído de plantas con la cepa con la construcción 35S:PvPs:TAP.

de la reacción a la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP y al vector a partir del cual se originó la construcción (pEarleyGate 205) (Figura 23, carriles 4 y 5) y como control negativo se utilizó a la construcción en el vector de entrada, pENTR-PvNod22 (Figura 23, carril 6). Hasta el momento se ha llegado a este punto para la segunda estrategia.

Figura 23. Verificación de la integridad del cDNA de las plantas transgénicas de frijol mediante PCR punto final. Carril 7, MPM. Carriles 1-6, amplificación de *protA* usando como molde: carril 1, cDNA de plantas transformadas con K599 WT; carril 2, cDNA de plantas transformadas con la construcción 35S:PvPs:TAP; carril 3, cDNA de plantas transformadas con la construcción 35S:*Pvnod22*:TAP; carril 4, vector 35S:*Pvnod22*:TAP, carril 5, vector pEarleyGate 205; carril 6, construcción pENTR-PvNod22.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos planteamos llevar a cabo la purificación e identificación de las proteínas que interaccionan con la sHsp de frijol *PvNod22* con la finalidad de poder establecer una hipótesis sobre su función, la cual parece ser preponderante bajo distintas condiciones incluyendo respuesta a estrés. Para ello, recurrimos a dos estrategias distintas. La primera de ellas consistió en purificar y re-naturalizar a la proteína *PvNod22* recombinante fusionada a una etiqueta de seis histidinas, con la finalidad de unirla a una matriz de agarosa acoplada a níquel. Posterior a la unión de *PvNod22* a la matriz, recurrimos a pasar el extracto de hoja de plantas estresadas con calor o peróxido de hidrógeno, tanto en presencia como en ausencia de calcio (Ca^{2+}) exógeno durante el ensayo. Esto último debido a que en 2010, Zou y colaboradores demostraron que HSP1 (*At4g14830*), uno de los homólogos de *PvNod22* en *A. thaliana*, interacciona con la proteína CPK10 sólo en presencia de 2 mM de Ca^{2+} exógeno. Lo primero que llevamos a cabo fue expresar a la proteína *PvNod22* a partir de una construcción en el vector pQE30 en células de *E. coli* (Jonathan I. Rodríguez, tesis de maestría). Se había identificado con anterioridad que *PvNod22* recombinante se encuentra enriquecida principalmente en cuerpos de inclusión (Jonathan I. Rodríguez, tesis de maestría). Se ha reportado que la sobre-expresión heteróloga de proteínas, incluyendo a las sHsps, llevan a la formación de cuerpos de inclusión (Kuczynska-Wisnik *et al*, 2004). Este hecho puede ser considerado como una ventaja en el proceso de purificación proteico ya que confiere la capacidad de poder aislar estos componentes a través de centrifugación serial (Rogl *et al*, 1998; Misawa and Kumagai, 1999). De hecho evaluaciones recientes han arrojado a la luz que en los cuerpos de inclusión, al contrario de lo que se pensaba, se agregan proteínas en su forma nativa (García- Fruitós, 2010). Desafortunadamente en la mayoría de las ocasiones es necesario recurrir al uso de agentes desnaturalizantes, como la urea, para poder extraer de los cuerpos de inclusión a las proteínas de interés y ésto puede afectar de manera negativa el re-plegamiento de dicha proteína y por lo tanto también su función (Misawa and Kumagai, 1999; Tsumoto *et al*, 2003). Para poder recuperar a la proteína *PvNod22* de los cuerpos de inclusión, se montó un protocolo

(Jonathan I. Rodríguez, tesis de maestría) que consistió en solubilizar a la proteína PvNod22 en 8 M de urea y unirla a la matriz de agarosa conjugada a níquel para, posteriormente, lavarla con más urea 8 M y un amortiguador de lavado con la finalidad de eliminar contaminantes y finalmente eluir a la proteína con una solución ácida para dializarla contra un amortiguador con HEPES (Material y métodos, pág. 38). Sin embargo, tras varias réplicas del protocolo no logramos obtener soluble a PvNod22 (Figura 6b, carril 3) por lo cual decidimos establecer un nuevo protocolo. Dicho protocolo consistió en disminuir la concentración de urea a 4 M y utilizar simultáneamente un amortiguador salino de fosfatos (PBS) durante la extracción de la proteína, seguido de un proceso de diálisis, involucrando cambios graduales en la concentración de los agentes desnaturizantes, hasta removerlos completamente y dejar a la proteína en PBS, el cual asemeja a las condiciones celulares (Material y métodos, pág. 39).

La cuantificación, mediante *Western blot*, del proceso de purificación y re-naturalización dio como resultado un rendimiento de 2.7 mg de proteína soluble por cada 100 ml de cultivo (Figura 8). Aún falta conducir un análisis estadístico para llegar a una cuantificación más acertada, sin embargo se podría concluir que el protocolo establecido en el presente trabajo tiene un rendimiento considerablemente bueno comparado con otros protocolos para purificar proteínas recombinantes anteriormente reportados (Scheich *et al.*, 2003). Por otro lado, carecemos de un análisis de la funcionalidad de la proteína purificada mediante este protocolo, sin embargo, existe evidencia de que la agregación y posterior precipitación de proteínas se debe a un proceso de desnaturización (Fink, 1998); como PvNod22 se mantiene soluble aun cuando se encuentra formando multímeros (Figura 9a, carril 2), podemos inferir que probablemente se encuentre en su estado nativo y probablemente funcional.

En diversos trabajos se han propuesto mecanismos que tratan de explicar la manera en la que las sHsps son capaces de interaccionar con sus blancos; la mayoría de las evidencias soportan la teoría que postula que los dímeros son las formas activas de este tipo de proteínas, y que los multímeros son sólo reservorios hasta que un estímulo induce su des-ensamblaje (Kim *et al.*, 1998; Montfort *et al.*, 2001; Stamler *et al.*, 2005; Liberek *et al.*, 2008). De ser este el caso del mecanismo de acción de la

proteína PvNod22, nos enfrentamos a un problema técnico, ya que al intentar analizar la muestra proveniente de la proteína recombinante re-naturalizada, no logramos inducir su entrada a la región separadora del gel nativo (Figura 9a, carril 2). Aunado a esto, cuando se corrió la misma cantidad de muestra en un gel desnaturalizante, se pudo observar que no acarrea contaminantes (Figura 9b, carril 2) que pudieran interferir en su plegamiento y dirigirla hacia la agregación. Esto sugiere que PvNod22 podría estar formando agregados de alto peso molecular (forma multimérica).

Por otro lado, existe evidencia de que las formas multiméricas son capaces de unir posibles proteínas blanco (Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997), por esta razón, y por el hecho de que no descubrimos la forma de obtener monómeros y unirlos en esa forma a la matriz, decidimos seguir con los ensayos de interacción PvNod22-blanco (Figura 10). No se observaron bandas diferenciales pero en todos los carriles donde PvNod22 estuvo en contacto con el extracto proteico de hojas, incluso en el extracto proveniente de las plantas sin tratamiento, apareció una banda de entre 15 y 25 kDa (Figura 10, carriles 6-11). Se estandarizaron las condiciones para obtener una mejor definición de las bandas de los posibles interactores (Figura 11, carriles 3-6); en todos los casos volvió a aparecer la banda de entre 15 y 25 kDa, (Figura 11, carriles 3-6), pero además en el carril correspondiente al ensayo con el extracto de plantas estresadas por calor, aparecieron dos bandas más (Figura 11, carril 6). Se obtuvieron las secuencias de estos péptidos mediante espectrometría de masas y se observó que los péptidos de entre 15 y 25 kDa corresponden a fragmentos de degradación de la proteína PvNod22 (Tabla IV), pero además arrojó información de que ningún otro péptido migra a la misma altura de dicho fragmento.

Retomando el trabajo de Zou y colaboradores. Se sabe que el calcio es una molécula señalizadora que actúa como segundo mensajero tanto en condiciones normales como bajo condiciones de estrés en las células (Stael *et al.*, 2011). Se ha reportado que durante estrés por calor, estrés oxidativo (Larkindale y Knight, 2002) e interacción simbiótica de *Rhizobium* con frijol (Cárdenas *et al.*, 1999) se presentan picos de calcio al interior de la célula que inducen una serie de cambios tanto a nivel transcripcional como post-traducciona, lo que nos llevó a pensar que quizás PvNod22 podría ser una proteína que responde a la presencia de calcio *in vivo*, por lo cual

decidimos realizar ensayos de captura de los interactores en presencia de este ion; lo que se obtuvo fue que ni la presencia de Ca^{2+} en el medio, ni el estrés oxidativo modificaron el patrón de bandas en el gel (Figura 10, carriles 6-11), éste sólo se modificó en el ensayo con el extracto proveniente de plantas tratadas con calor, ya que en su presencia se aislaron dos bandas más alrededor de la banda de 55 kDa (Figura 11, carril 6).

Al obtener la secuencia de estas proteínas, resultaron ser subunidades de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) (Tabla IV). RuBisCO está compuesta de ocho subunidades grandes y ocho subunidades pequeñas (Fashui *et al.*, 2005) de 52.8 kDa y 14.2 kDa, respectivamente, se localiza en el citoplasma y en cloroplastos y es la enzima que cataliza el primer paso durante la fijación de carbono en las plantas, además de ser la proteína más abundante en la hoja (Chapman *et al.*, 1988). Por otro lado, *PvNod22* es una proteína que reside en el retículo endoplasmático (Rodríguez-López *et al.*, 2014), lo cual nos lleva a concluir que, debido a la distribución subcelular que cada proteína presenta, es poco probable que sean capaces de interactuar *in vivo*. Se ha reportado con anterioridad que RuBisCO se encuentra comúnmente como contaminante en diversos ensayos (Delaunios *et al.*, 2013); podría ser el caso del ensayo de interacción aquí presentado, ya que al hacer el extracto total y pasarlo por la columna estamos poniendo en contacto proteínas que de manera natural no se acercan, pero que pueden ser capaces de interactuar entre ellas a través de parches hidrofóbicos. Con base en estos resultados obtenidos podemos inferir que *PvNod22* y RuBisCo interactúan *in vitro*, sin embargo esto puede deberse a una interacción inespecífica debido a la abundancia de la enzima RuBisCo y a que pudo sufrir un proceso de desnaturalización por calor. Recordemos que las sHsps son capaces de reconocer parches hidrofóbicos de otras proteínas y unirse a éstos, lo que nos ha llevado a pensar que *PvNod22* podría ser capaz de unirse a la proteína RuBisCo desnaturalizada, a través de los aminoácidos hidrofóbicos que ésta haya expuesto al perder su forma nativa.

Por otro lado, se decidió hacer una construcción para ser usada a través del método de obtención de complejos proteicos conocido como *tandem affinity purification* (TAP), donde la secuencia de interés se fusiona a dos unidades de unión a IgG's de la

proteína A (ProtA) de *Staphylococcus aureus* y un péptido de unión a calmodulina (CBP) con un sitio de corte para la proteasa del virus del moteado del tabaco (TEV) entre ellos (Rigaut *et al*, 1999).

La principal ventaja que esta estrategia ofrece sobre los esquemas de purificación convencionales es que la proteasa TEV permite hacer una elución del complejo proteico unido a una columna de IgG's en condiciones nativas (Puig *et al*, 2001). Además ha sido reportado que esta estrategia ha funcionado para caracterizar complejos proteicos de levadura, mamífero, insectos, bacterias y plantas (Rigaut *et al*, 1999; Van Leene *et al*, 2008). El proceso consiste en dos pasos consecutivos de limpieza lo cual permite seleccionar sólo a aquellas proteínas que establezcan interacciones lo suficientemente fuertes con la proteína de interés.

Hasta el momento, se logró obtener la construcción 35S:Pvnod22:TAP y se han transformado algunas plantas con dicha construcción y sus respectivos controles. Se pudo observar que sólo aquellas plantas que fueron transformadas con las construcciones de interés dieron positivo a la amplificación de la etiqueta ProtA, por lo cual podemos concluir que este fragmento es adecuado para monitorear la transformación de las plantas. Por otro lado, la presencia del transcrito de las quimeras es un indicativo de que se está llevando a cabo su transcripción y eventualmente podría llevarse a cabo su traducción. Resta transformar un mayor número de plantas y permitir el crecimiento de éstas en maceta con el afán de obtener una mayor cantidad de tejido de raíz y poder continuar con el protocolo de obtención de complejos proteicos mediante la estrategia TAP.

CONCLUSIONES

1. El protocolo de purificación de *PvNod22* recombinante establecido en el presente trabajo permite mantener a la proteína soluble.
2. Es probable que *PvNod22* forme multímeros.
3. La estrategia *in vitro* de purificación de interactores, a través de una matriz de afinidad acoplada a níquel, no fue efectiva para atrapar a los interactores de *PvNod22* bajo las condiciones aquí descritas.
4. Las construcciones 35:PvPs:TAP y 35S:*Pvnod22*:TAP permiten la transformación de raíces pilosas de plantas de *Phaseolus vulgaris*.

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Hasta el momento hemos logrado generar las construcciones que nos permitirán seguir adelante en la búsqueda de los interactores. Se ha reportado que se necesitan grandes cantidades de tejido para que la purificación de los complejos se lleve a cabo de manera eficiente mediante la metodología TAP. Por ello, proponemos que se generen lotes de al menos 50 plantas con raíces pilosas (transgénicas). Estas plantas deberán ser transferidas del tubo donde sean generadas a maceta con la finalidad de permitir el crecimiento de las raíces y obtener una mayor cantidad de tejido. Por otro lado podrían seguirse otras estrategias para llegar a la identificación de los interactores como el sistema de doble híbrido en levaduras usando como anzuelo a la proteína PvNod22.

LITERATURA CITADA

1. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. 2012. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **44**: 1622-1631.
2. Ahner A, Nakatsukasa K, Zhang H, Frizzell RA, Brodsky JL. 2007. Small heat-shock proteins select F508-CFTR for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Molecular Biology of the Cell*, **18**: 806 – 814.
3. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373-399.
4. Basha E, Jones C, Blackwell AE, Cheng G, Waters ER, Samsel KA, Siddique M, Pett V, Wysocki V, Vierling E. 2013. An unusual dimeric small heat shock protein provides insight into the mechanism of this class of chaperones. *Journal of molecular biology*, **425**: 1683-1696.
5. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ. 2013. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International Journal of Molecular Science*, **14**: 434-456.
6. Beltrán Hernández, Nidia Ednita. Efecto del silenciamiento génico de la Nodulina 22 en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Valentino. 2010. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
7. Benesch JLP, Ayoub M, Robinson CV, Anquilina JA. 2008. Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**: 28513-28517.
8. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. 2000. Dynamic

- interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, **2** (6): 326-332.
9. Bondino HG, Valle EM, ten Have A. 2012. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/-crystallin family in higher plants. *Planta*, **235**: 1299-1313.
 10. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
 11. Brady JP, Garland D, Douglas-Tabor Y, Robinson WG, Groome A, Wawrouser EF. 1997. Targeted disruption of the mouse α A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein α B-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**: 884-889.
 12. Brandizzi F, Hanton S, Pinto daSilva LL, Boevink P, Evans D, Oparka K, Denecke J, Hawes C. 2003. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *The Plant Journal*, **34**: 269-281.
 13. Brodsky JL. 2007. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochemistry Journal*, **404** (3): 353-363.
 14. Bürckstümmer T, Bennett KL, Preradovic A, Schütze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A. 2006. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nature methods*, **3** (12): 1013-1019.
 15. Cárdenas L, Feijó JA, Kunkel JG, Sánchez F, Holdaway Clarke T, Hepler PK,

- Quinto C. 1999. Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal*, **19** (3): 347-352.
16. Chang C, Damiani I, Puppo A, Frendo P. 2009. Redox changes during the Legume-*Rhizobium* symbiosis. *Molecular Plant*, **2** (3): 370-377.
17. Chapman MS, Suh SW, Curmi MP, Cascio D, Smith WW, Eisenberg DS. 1988. Tertiary structure of plant RuBisCO: domains and their contacts. *Science*, **241** (4861): 71-74.
18. Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K. *The Plant Cell*, **7**: 43-55.
19. De Bary HA. 1987. Die Erscheinung der symbiose. Citado en inglés por Relman O.A. 2008. Till death do us apart: coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology*, **6**: 721-724.
20. D'Haese W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M. 2003. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (20): 11789- 11794.
21. De Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JAM. 1998. Genealogy of the α -crystallin-small heat shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, **22**: 151-162.
22. Delanois B, Colby T, Belloy N, Conreux A, Harzen A, Baillieul F, Clément C, Schimidt J, Jeandet P, Cordelier S. 2013. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress- related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biology*, **13**: 24.

23. Dinkova TD, Zepeda H, Martínez-Salas E, Martínez LM, Nieto-Sotelo J, Sánchez de Jiménez E. 2005. Cap-independent translation of maize *Hsp101*. *The Plant Journal*, **41**: 722-731.
24. Downie JA. 2007. Infectious heresy. *Science*, **316**: 1296-1297.
25. Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshof P y Sánchez F. 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, **7** (2): 1819-1824.
26. Fashui H, Liu C, Zheng L, Wang X, Wu K, Song W, Lü S, Tao Y, Zhao G. 2005. Formation of complexes of rubisco- rubisco activasa from La, Ce treatment spinach. *Science in China series B: Chemistry*, **48** (1): 67-74.
27. Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Reid DE, Gresshof PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52** (1): 61-76.
28. Fernandez J, Yaman I, Merrick WC, Koromilas A, Wek RC, Sood R, Hensold J, Hatzoglou M. 2002. Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2 α phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (3): 2050-2058.
29. Fink AL. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*, **3** (1): 9-23.
30. Fu X, Jiao W, Chang Z. 2006. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. *Journal of Molecular Evolution*, **62** (3): 257-266.

31. García-Fruitós E. 2010. Inclusion bodies: a new concept. *Microbial Cell Factories*, **9**: 80.
32. Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH. 2012. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **44**: 1588-1592.
33. Geurts R & Bisseling T. 2002. *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, **14** (1): S239 – S249.
34. Grene R. 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. En CR Somerville, EM Meyerowitz (eds) *The Arabidopsis book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi:10.11/tab.0036.1, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
35. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat shock proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12** (10): 842- 846.
36. Haslbeck M. 2002. sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**: 1649-1657.
37. Hedge RS, Ploegh HL. 2010. Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**: 437-446.
38. Hilario E, Medrano Martin FJ, Bertolini MC, Fan Li. 2011. Crystal structures of *Xanthomonas* small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer. *Journal of Molecular Biology*, **408**: 74-86.
39. Horwitz J. 2000. The function of alpha-crystallin in vision. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **11**: 53-60.

40. Howard JB, Rees DC. 1996. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical Reviews*, **96**: 2965-2982.
41. Jofré A, Molinas M, Pla M. 2003. A 10-Kda Class-CI sHsp protects *E. coli* from oxidative and high-temperature stress. *Planta*, **217**: 813-819.
42. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (3): 1517-1520.
43. Jürgens G. 2004. Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, **20**: 481-504.
44. Kampinga HH, Garrido C. 2012. HSPB: small proteins with big implications in human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **44**: 1706-1710.
45. Kashlan OB, Mueller GM, Qamar MZ, Poland PA, Ahner A, Rubenstein RC, Hughey RP, Brodsky JL, Kleyman TR. 2007. Small heat shock protein α A crystallin regulates epithelial sodium channel expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**: 28149-28156.
46. Kim KK, Kim R, Kim SH. 1998. Crystal structure of small heat shock protein. *Nature*, **394**: 595-599.
47. Kleizen B, Braakman I. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**: 343-349.
48. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
49. Laganowsky A, Benesch JLP, Landau M, Ding L, Sawaya MR, Cascio D, Huang

- Q, Robinson CV, Horwitz J, Eisenberg D. 2010. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallin reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Science*, **19**: 1031-1043.
50. Laksanalamai P, Robb FT. 2004. Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*, **8**: 1-11.
51. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Apoptosis Review Series*, **12** (3): 743-761.
52. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. 2007. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70, HSP27. *Prion*, **1** (1) 53-60.
53. Larkindale J, Knight MR. 2002. Protection against heat-stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology*, **128**: 682-695.
54. Lee CC, Ribbe MW, Hu Y. 2014. Chapter 7. Cleaving the N, N triple bond: the transformation of dinitrogen to ammonia by nitrogenases. *Metal Ions in Life Sciences* **14**: 147-176.
55. Lee GJ, Pokala N, Vierling E. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (18) 10432-10438.
56. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal*, **16** (3): 659-671.

57. Lee GJ, Vierling E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 system to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*, **122**: 189-197.
58. Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO Journal*, **27**: 328-335.
59. Limpens E & Bisseling T. 2003. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 343-350.
60. Litt M, Kramer P, LaMorticella DM, Murphey W, Lovrien EW, Weleber RG. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene *CRYAA*. *Human Molecular Genetics*, **7** (3): 471-474.
61. Liu JX, Howell SH. 2010. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *The Plant Cell*, **22**: 1-13.
62. Mardanov ES, Zamchuk LA, Skulachev MV, Ravin NV. 2008. The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene*, **420** (1): 11-16.
63. Martínez-Centeno, Cynthia Gemalit. Localización de la proteína Nodulina 22 de *Phaseolus vulgaris* L. var. Negro Jamapa. 2011. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
64. Michaud S, Morrow G, Marchand J, Tanguay RM. 2002. Drosophila small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **28**: 79-101.
65. Misawa S, Kumagai I. 1999. Refolding of therapeutic proteins produced in

Escherichia coli as inclusion bodies. *Biopolymers*, **51**: 297-307.

66. Mohammad A, Miranda-Ríos J, Estrada-Navarrete G, Quinto C, Olivares JE, García-Ponce B, Sánchez F. 2004. Nodulin 22 from *Phaseolus vulgaris* protects *Escherichia coli* from oxidative stress. *Planta*, **219**: 993-1002.
67. Montfort RLM, Basha E, Friedrich K, Slingsby C, Vierling E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature*, **8** (12): 1025-1030.
68. Morrow G, Inaguma Y, Kato K, Tanguay RM. 2000. The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**: 31204-31210.
69. Nakamoto H, Vigh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **64**: 294-306.
70. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, **45**: 119-144.
71. Peleg-Grossman S, Volpin H, Levine A. 2007. Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany*, **58** (7): 1637-1647.
72. Poulain P, Gelly JC, Flatters D. 2010. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS ONE*, **5** (4): e9990. doi: 10.1371/journal.pone.0009990
73. Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2005. Bacteria: the proteobacteria. In *Microbiology*. (6th ed., 473-502). New York, NY, U.S.A.: McGraw-Hill.

74. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**: 218-229.
75. Pappo A, Rigaud J, Job D. 1981. Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Science Letters*, **22** (4): 353-360.
76. Pappo A, Davies MJ, Marecu S, Turnbull R, Frenedo P, Mathieu C & Herovart D. 1997. Oxidative stress in Nitrogen Fixing Legume Nodules: some biochemical and molecular biology aspects. *Phyton*, **37** (3): 233-238.
77. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell death and differentiation*, **11**: 372-380.
78. Rigaut G, Sevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Sheraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*, **17**: 1030-1032.
79. Rodríguez López, Jonathan Israel. Caracterización bioquímica de la Nod22 y la AtAcd22.1; dos proteínas de choque térmico de bajo peso molecular de plantas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Morelos, México.
80. Rodríguez-López J, Martínez-Centeno C, Padmanaban A, Guillén G, Olivares JE, Stefano G, Lledías F, Ramos F, Ghabrial SA, Brandizzi F, Rocha-Sosa M, Díaz-Camino C, Sánchez F. 2014. Nodulin 22, a novel small heat-shock protein of the endoplasmic reticulum is linked to the unfolded protein response in common bean. *Molecular Plant-Microbe interactions*, **27** (1): 18-29.
81. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. 1999. Regulation of Hsp27

- oligomerization, chaperone function and protective activity against oxidative stress/ tumor necrosis factor by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (27) : 18947-18956.
82. Rogl H, Kosemund K, Kühlbrandt W, Collinson I. 1998. Refolding of *Escherichia coli* produce membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters*, **432**: 21-26.
83. Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Fedorova M, Vance CP, Becana M. 2004. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17** (12): 1294-1305.
84. Rutkowski DT, Kaufman RJ. 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, **14**: 20-28.
85. Scharf KD, Siddique M , Vierling E. 2001. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat shock stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell stress and chaperones*, **6** (3): 225-237.
86. Scheich C, Sievert V, Büssow K. 2003. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *MBC Biotechnology*, **3**:12.
87. Sena LA, Chandel NS. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, **48**: 158-167.
88. Sharma P, Bhushan Jha A, Shanker Dubey R, Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. *Journal of Botany*, doi: 10.1155/2012/217037
89. Siddique M, Gernhard S, Koskull-Döring P, Vierling E, Klaus-Dieter S. 2008. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell stress and chaperones*, **13**: 183-197.

90. Simon HU, Haj Yehia A, Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, **5** (5): 415-418.
91. Stael S, Wurzinger B, Mair A, Mehlmer N, Vothknecht UC, Teige M. 2011. Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/err394
92. Stamler R, Kappé G, Boelens W, Slingsby C. 2005. Wrapping the α -Crystallin domain fold in a chaperone assembly. *Journal of Molecular Biology*, **353**: 68-79.
93. Stougaard J. 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Current opinion in Plant Biology*, **4**: 328 – 335.
94. Sun W, Montagnu MV, Verbruggen N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1577**: 1-9.
95. Sun Y, MacRae TH. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**: 2460-2476.
96. Timperio AM, Egidi MG, Zolla L. 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of proteomics*, **71**: 391-411.
97. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, **101**: 249-258.
98. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, **28** (1): 1-8.
99. Ukaji N, Kuwabara C, Kanno Y, Seo M, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S.

2010. Endoplasmic reticulum-localized small heat shock protein that accumulates in mulberry tree (*Morus bombycis* Koidz.) during seasonal cold acclimation is responsive to abscisic acid. *Tree Physiology*, **30**: 502-513.
100. Urade R. 2007. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *FEBS Journal*, **274**: 1152-1171.
101. Van Leene J, Witters E, Inzé D, De Jaeger G. 2008. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in Plant Science*, **13** (10): 517-520.
102. Vance C. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorous acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology*, **127**: 391-397.
103. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prévost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tomé F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. 1998. A missense mutation in the α B crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics*, **20**: 92-95.
104. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9** (5): 244-252.
105. Waters ER, Aebermann BD, Sanders-Reed Z. 2008. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveal diverse evolutionary patterns. *Cell Stress and Chaperones*, **13**: 127-142.
106. Waters ER, Lee GJ, Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, **47**: 325-338.
107. Waters ER. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant

- sHSPs. *Journal of Experimental Botany*, **64** (2): 391-403.
108. Yoshida H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS Journal*, **274**: 630-658.
109. Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2005. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, **5**: 539-554.
110. Zhao C, Shono M, Sun A, Yi S, Li M, Liu J. 2007. Constitutive expression of an endoplasmic reticulum small heat shock protein alleviates endoplasmic reticulum stress in transgenic tomato. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 835-841.
111. Zou JJ, Wei FJ, Wang C, Wu JJ, Ratnasekera D, Liu WX, Wu WH. 2010. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca^{2+} - mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant physiology*, **154**: 1232-1243.

ANEXO

1. Secuencia nucleotídica de *Pvnod22*

```
ACGCACATATTCCGCATCTATTCTTCTTCTGCTCACACATTTTCATCAATTCGTCGCAGCATCTCAATCTCCCA 75
ACATTTTCTCCACAAAGGGAAAAATAAATCTTAATAACAATAAAAAAGGGGAATCACGTCTTCCAATCCGCC 150
AAACGCGATCGTCCCGGCCGCAAATTGAAATTAGGGTTAGGGTTTTTCATCGTCTTCGCCCGAAAAAGAAAGGGGG 225
AAGTGGGAAGGAAGACGCGAACAACCGTTCCCTTTATGATACAAAAGGTGTCTCTGATCTTCATCGTCATCATCGC 300
                                     ↓ M I Q K V S L I F I V I I A 14
TGTATTAATCTTGGTGTGGCAATCCTCTGCGGCGTTCCACAGTAGCAAAAACAGCATCATGAAGGTCCACCCTGT 375
  V L I L V L Q S S A A F H S S K N S I M K V H P V 39
TCCGCGAAAACGCAACATCTCAATCCAATTCGGCGTCGACGGGGGAATCCCATGTCGGAGGCGCAGGCGCTGTT 450
  P R K R N I S I Q F G V D G G N P M S E A Q A L L 64
GGGAATCGCTGGCAGCAAGAAGCTCCGGCGACTCCCGCACGTGTTTCAGCTGCGTCCTGGAGCTCCCGTTCCGCTC 525
  G I A G S K K L R R L P H V F S C V L E L P F R S 89
CGACGCGACGTGGTGGTGGAGGAGGCCCGACTGCTTCCGCTTCGTCGGCGGAGACTGAGGGTATCGGGCGACGT 600
  D A D V V V E E D P D C F R F V A E T E G I G D V 114
GAGGGCGCACACGATCGAAATCCACCCCGGCGTGACGAAGATCGTGGTGAGGGACGGCGGTTCCGGTGGAGCTCTC 675
  R A H T I E I H P G V T K I V V R D G G S V E L S 139
GCTCGACCAGCTCGAACTGGATATGTGGAGGTTCCGTTTACCAGAATCGACGCGGCCGAGCTCGCGAGCGCGGT 750
  L D Q L E L D M W R F R L P E S T R P E L A S A V 164
GTTTCGTAGACGGCGAGCTCATCGTGACGGTGCCGAAGGGGCACGGAGAGGAAGACGGGGATGGTATAGGGTTAT 825
  F V D G E L I V T V P K G H G E E D G D G D R V M 189
GGGTGGTGGTAGACTTGTGCTTGTACAGTGATGATGAAGGAATGAGTGGTGAAGCAATGATTCTTTTGTAA 900
  G G G R L V L V Q * * * 198
CTTCATGTTGCCCTCCAAACGTGGCCATATTAGTATGTTGGTTAGATTTCAAGTTGTTGTTGGAAGTAGTTTCTC 975
TGTGAATTTTATTGTTGCTATTGTTGAATCAGGAACAAAAATGTTCTATCTGGACAATGGTTTATTCATGGCAAT 1050
GGCAATTTTTCGTAATAGGTGTAACCTCTGTTTCGTGTGTTCTTTTATTTGCTCAGATAACTCTGTTTCATGAGATTG 1125
TTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1183
```

Anexo 1. Análisis de la secuencia del gen de Nodulina 22 de *Phaseolus vulgaris* (*Pvnod22*). El cDNA de tamaño completo del gen *Pvnod22* y los aminoácidos codificados (198 residuos) son mostrados. El codón de inicio ATG está subrayado y los tres codones de paro están marcados por asteriscos. Las posibles señales de poliadenilación están en negritas. El sitio probable para el corte del péptido señal está marcado con una flecha. El amino terminal hidrofóbico está subrayado. (Tomado de Mohammad *et al*; 2004).