



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“La sensibilidad ambiental de proteínas intrínsecamente desordenadas inducidas por deshidratación”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Laura Daniela Palomino Navarrete

TUTOR PRINCIPAL

Dr. César Luis Cuevas Velázquez
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
IBT-UNAM

Dra. Laura Domínguez Dueñas
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Mayo 2023



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

©PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este material está basado en trabajo realizado gracias al financiamiento del University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). Proyecto CN-20-113 titulado “Sensibilidad al ambiente de proteínas intrínsecamente desordenadas de plantas inducidas por deshidratación”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el donativo de Ciencia de Frontera CONACYT con la clave CF-2019/252952 al Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Clave IA203422. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química con la clave 5000-9182 al Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional para Estudios de Posgrado (CVU 1099541) que me fue proporcionada durante el desarrollo de mi maestría.

El apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) para asistir a congresos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi comité tutor por todo el apoyo y la retroalimentación brindada durante el desarrollo de mi proyecto: Dra. Alejandra Covarrubias y Dra. Laura Domínguez.

Al Dr. César Luis Cuevas Velázquez por su asesoría durante este proceso, su apoyo, su confianza y sus exigencias que me hicieron ser mejor cada día.

Al Dr. Shahar Sukenik por formar parte de este proyecto, por permitirme formar parte de su laboratorio, por confiar en mí, apoyarme y por su paciencia.

A mi familia: mi mamá Verónica, mi padre Ricardo, mi hermano Diego, que han sido mi soporte. Les agradezco infinitamente el que hayan creído en mí siempre y por brindarme las herramientas necesarias para seguir creciendo. Ustedes son mi motivación principal y en cada paso que doy les rindo homenaje.

A todos los miembros del laboratorio 103 del Conjunto E de la Facultad de Química; por ser mi segunda familia y grandes amigos. Gracias por hacer del laboratorio algo divertido y enriquecedor en todos los sentidos.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	28
IV.	Hipótesis	31
V.	Objetivo General	31
VI.	Objetivos particulares	31
VII.	Materiales y métodos	32
VIII.	Resultados	45
IX.	Discusión	66
X.	Conclusiones	72
XI.	Perspectivas	73
XII.	Referencias	74
XIII.	Anexos	83

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles que experimentan condiciones ambientales estresantes constantemente, como el déficit hídrico. El déficit hídrico es provocado no sólo por la falta de agua sino también por las altas concentraciones de sal en el suelo y la exposición a temperaturas congelantes. Este tipo de estrés ocasiona cambios en la regulación de múltiples procesos esenciales para las plantas. Una de las estrategias a nivel molecular que las plantas utilizan para hacer frente a este estrés es la expresión de proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*). Estas proteínas tienen una estructura desordenada, pero bajo condiciones de desecación, amontonamiento macromolecular o alta osmolaridad, experimentan una transición estructural, predominantemente formando hélices-alfa. Por otro lado, las proteínas LEA tienen una función tipo chaperona durante condiciones de desecación *in vitro*, previniendo la inactivación de enzimas reporteras y se ha demostrado que *in vivo* algunas proteínas LEA interactúan con las membranas biológicas y son capaces de estabilizarlas durante el estrés hídrico.

La transición estructural y la función tipo chaperona han sido descritas ampliamente para varias proteínas LEA. Además, en algunos casos se ha sugerido que la capacidad de cambiar de conformación en condiciones de falta de agua está relacionada a su función protectora. Tal es el caso de la región N-terminal de la proteína AtLEA4-5 de *Arabidopsis thaliana*, la cual es necesaria y suficiente para el plegamiento a hélice-alfa y para llevar a cabo la función protectora sobre una enzima reportera, lo que sugiere que la capacidad de cambiar de conformación influye en la función protectora *in vitro*.

En el presente trabajo caracterizamos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* el efecto de alteraciones ambientales sobre la sensibilidad estructural de cinco proteínas LEA de *A. thaliana*. Además, determinamos los niveles de protección para cuatro de las cinco proteínas LEA durante condiciones de desecación. De esta forma, encontramos que existe una correlación entre la sensibilidad estructural de las proteínas LEA seleccionadas y su capacidad protectora *in vitro*. Los resultados de esta tesis contribuyen a profundizar el mecanismo de protección de las proteínas LEA, lo cual se podría expandir a proteínas desordenadas de otros organismos tolerantes a la desecación.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that constantly experience stressful environmental conditions, such as water deficit. Water deficit is caused not only by lack of water but also by high salt concentrations in the soil and exposure to freezing temperatures. This type of stress causes changes in the regulation of multiple processes essential to plants. One of the molecular strategies that plants use to cope with this stress is the accumulation of *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) proteins. These proteins have a disordered structure but under conditions of desiccation, macromolecular crowding, or high osmolarity, they undergo a structural transition, predominantly forming alpha-helices. On the other hand, LEA proteins have a chaperone-like function during desiccation conditions *in vitro*, preventing inactivation of reporter enzymes. Structural transition and chaperone-like function have been described extensively for several LEA proteins. In addition, in some cases it has been suggested that the ability to change conformation under water-starved conditions is related to their protective function. Such is the case of the N-terminal region of the *Arabidopsis thaliana* AtLEA4-5 protein, which is necessary and sufficient for helix-loop-helix folding and for carrying out the protective function on a reporter enzyme, suggesting that the ability to change conformation influences the protective function *in vitro*.

In the present study, we characterized *in silico*, *in vitro* and *in vivo* the effect of environmental alterations on the structural sensitivity of five *A. thaliana* LEA proteins. In addition, we determined the levels of protection of four of the five LEA proteins during desiccation conditions. Thus, we found that there is a correlation between the structural sensitivity of the selected LEA proteins and their *in vitro* protective capacity. The results of this thesis contribute to deepen the mechanism of protection of LEA proteins, which could be expanded to disordered proteins from other desiccation-tolerant organisms.

I. INTRODUCCIÓN

Estrés abiótico en plantas

Debido a su carácter sésil, las plantas están continuamente sujetas a condiciones adversas que perjudican su desarrollo y crecimiento. El estrés abiótico es un tipo de estrés relacionado a aquellas condiciones que implican la fluctuación de parámetros ambientales, la disponibilidad de agua, la temperatura y la composición del suelo así como la deficiencia de nutrientes y niveles excesivos de sal o metales (Paes *et al.*, 2022).

Los factores de estrés abiótico influyen en el metabolismo, el crecimiento y desarrollo de los tejidos de las plantas. ; provocan además, cambios en los procesos celulares. Estos cambios, generan respuestas adaptativas y no adaptativas. Las respuestas adaptativas reflejan el daño infligido por un factor estresante, como los cambios perjudiciales en la fluidez de la membrana, las interrupciones en la cinética enzimática de algunas enzimas e interacciones moleculares causadas por iones tóxicos. Por otra parte, las respuestas adaptativas conducen a una mayor resistencia y, por lo tanto, son objetivos potenciales para la mejora de las plantas (Zhang *et al.*, 2022).

Diversos estudios resaltan la importancia de entender la forma en que las plantas perciben las señales de estrés y se adaptan a estos entornos adversos, con el fin de mejorar su resistencia al estrés causado por diversos factores químicos y físicos. Dentro de los que destaca la deficiencia de agua (Mendez C, 2019).

Importancia del agua en las plantas

El agua es la molécula esencial de la vida. En plantas constituye típicamente del 80 al 95% de la masa de los tejidos en crecimiento. El agua desempeña un papel crítico en la regulación final de la osmolaridad, la tensión de la membrana y la presión hidrostática que es esencial para el funcionamiento celular. Además, debido a sus propiedades polares, tiene gran influencia en la estructura y la estabilidad de moléculas como proteínas, polisacáridos y otras (Moreno, 2019).

Cuando las plantas se encuentran en un ambiente con una cantidad limitada o excesiva de agua, se lleva a cabo la perturbación del volumen celular y la hidrodinámica, que a su vez, afectan la regulación de múltiples procesos esenciales para las plantas. Razón por la que el agua en las plantas es de suma importancia y constituye un factor inductor de situaciones adversas o estresantes (Moreno, 2019).

Estrés por déficit hídrico

El estrés por déficit de agua se puede definir como una situación en la que el potencial hídrico y la turgencia de las células se reducen lo suficiente como para interferir con sus funciones normales. El estrés hídrico se considera una pérdida moderada de agua, que conduce al cierre de estomas y la limitación del intercambio gaseoso. La desecación es una pérdida de agua mucho más extensa que puede conducir potencialmente a una gran alteración del metabolismo y la estructura celular y, finalmente, al cese de las reacciones de catálisis enzimática (Hong, 2008).

El estrés por déficit hídrico se produce en plantas no sólo por periodos de sequía, sino también durante el estrés por congelamiento y salinidad. Estas condiciones de estrés abiótico producen cambios en la regulación de la expresión génica, vías de transducción de señales, modulación bioquímica y maquinaria proteómica que conducen a la supervivencia o muerte de las plantas afectadas (Imen, 2012).

En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado redes de genes inducibles por déficit hídrico y se han clasificado en dos grupos: genes reguladores y funcionales. Dentro de los genes reguladores, se encuentran los factores proteicos implicados en la regulación de la transducción de señales y la expresión génica sensible al estrés por déficit hídrico como: factores de transcripción, cinasas, fosfatasa, enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos y otras moléculas de señalización como la proteína de unión a calmodulina.

El segundo grupo comprende a los genes funcionales, que incluye genes que codifican para proteínas protectoras que confieren tolerancia al estrés abiótico, tales como las

proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*), chaperonas, proteínas anticongelantes y proteínas de unión a ARN (Imen, 2012).

Durante estas condiciones de deshidratación también se acumulan algunos metabolitos que puede actuar como osmoprotectores, tales como los azúcares, aminoácidos y sus derivados como rafinosa, Trehalosa, inositol, manitol, prolina (Pro), glicina (Gly) y betaína (GB) (He, 2018).

Factores que generan estrés por déficit hídrico

a. Congelamiento

Los periodos de congelamiento a los que se llegan a exponer las plantas son uno de los factores que causa el estrés por déficit hídrico. Los periodos de congelamiento alteran la fluidez de la membrana, el citoesqueleto y el flujo de calcio, ya que reducen el agua líquida en los fluidos extracelulares y pueden conducir a la deshidratación intracelular en los organismos multicelulares (Sangwan *et al.*, 2002).

Los efectos ocasionados en el metabolismo de las plantas surgen de la inhibición directa de las enzimas metabólicas por las bajas temperaturas y de la reprogramación de la expresión génica, induciendo la expresión de muchos factores de transcripción, como las proteínas CBF (C-repeat/DRE-Binding Factor) con dominio AP2, que activan la expresión de numerosos genes sensibles al frío (COR). La expresión de genes COR también está regulada por la activación de las proteínas cinasas que responden al calcio tales como (CPK, CIPK y CRLK1) y la cascada MAPK (Chinnusamy *et al.*, 2007).

El receptor tipo cinasa CRLK1 puede conectar la señalización de calcio inducida por el estrés causado por congelamiento con la cascada de MAPK. En estas condiciones, CRLK1 se une al calcio y a la calmodulina, interactúa con MEKK1 y es un requisito para activar la cascada de MAPK y contener el estrés por frío (Figura 1) (Yang *et al.*, 2010).

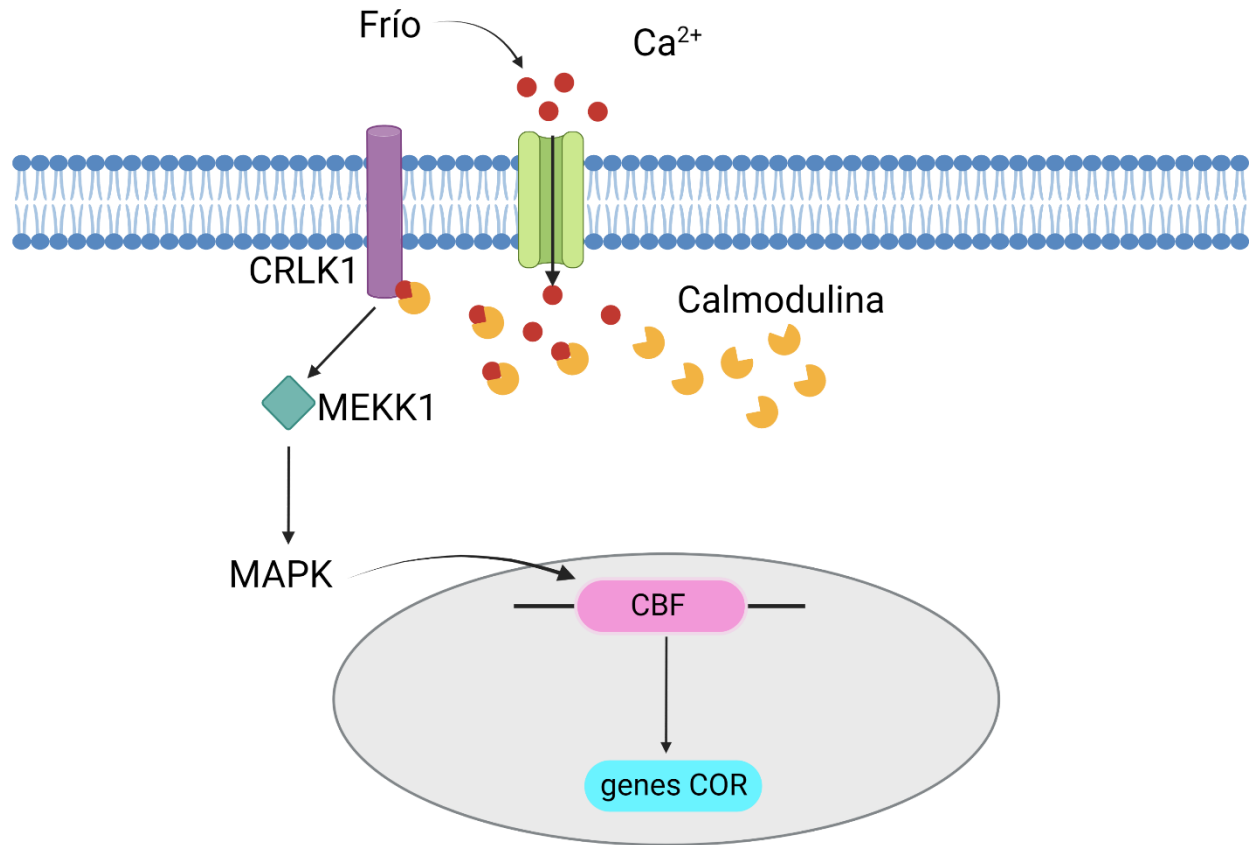


Figura 1. Vías de inicio de la respuesta a estrés por frío. Se ilustran los principales componentes implicados en la ruta de señalización. Las flechas indican una activación. Esquema modificado de Chunzhao Zhao, 2017.

b. Alta Salinidad

Las concentraciones altas de sales en los suelos también provocan déficit hídrico en las plantas, pues alteran la osmolaridad y propician la toxicidad de los iones dentro de los tejidos vegetales (principalmente de Na^+). Ante esta situación, la respuesta rápida de las plantas implica reajustar el potencial osmótico, o de manera más lenta, reducen los niveles tóxicos de sal en sus células.

Uno de los mecanismos adaptativos de las plantas para la señalización del estrés salino y tolerancia a Na^+ es la activación de la vía de la proteína cinasa dependiente de calcio conocido como vía de sensibilidad excesiva a la sal (SOS) (Zhu, 2002). En dicha vía, la

proteína de unión al calcio (SOS3), detecta la señal de calcio citosólico provocada por el estrés salino. SOS3 interacciona y activa SOS2, una proteína cinasa de serina/treonina. SOS3 se expresa preferentemente en la raíz, y un parálogo de SOS3, SCaBP8/CBL10 que se expresa principalmente en el brote, desempeña un papel equivalente a SOS3 (Quan *et al.*, 2007). El SOS2 activado fosforila y activa el SOS1, un antiportador de Na^+/H^+ en la membrana plasmática. Posteriormente, SOS1 se expresa en las células epidérmicas de la raíz y en las células del parénquima del xilema, de modo que el SOS1 activado puede obtener Na^+ del suelo y Na^+ en el xilema para su transporte hacia las hojas (Figura 2) (Zhu *et al.*, 2016).

La alta salinidad también provoca estrés osmótico que afecta diferencialmente tanto a diferentes órganos vegetales, como a los tejidos de un mismo órgano. Sin embargo, en respuesta a este estrés, se lleva a cabo un ajuste osmótico que consiste en aumentar el potencial hídrico celular, particularmente en tejidos como la raíz, provocando de esta manera, la entrada de agua a la célula para recuperar el turgor y la estructura celular (Yancey *et al.*, 1982).

Los mecanismos adaptativos a la alta salinidad tienen tres propósitos: tolerar el estrés osmótico, excluir el exceso de iones de los tejidos vegetales y aumentar la tolerancia de los tejidos a la acumulación de los iones. Estos mecanismos pueden complementarse entre ellos, y variar sus respuestas en función de la severidad del estrés y de la especie afectada (Munns, 2008).

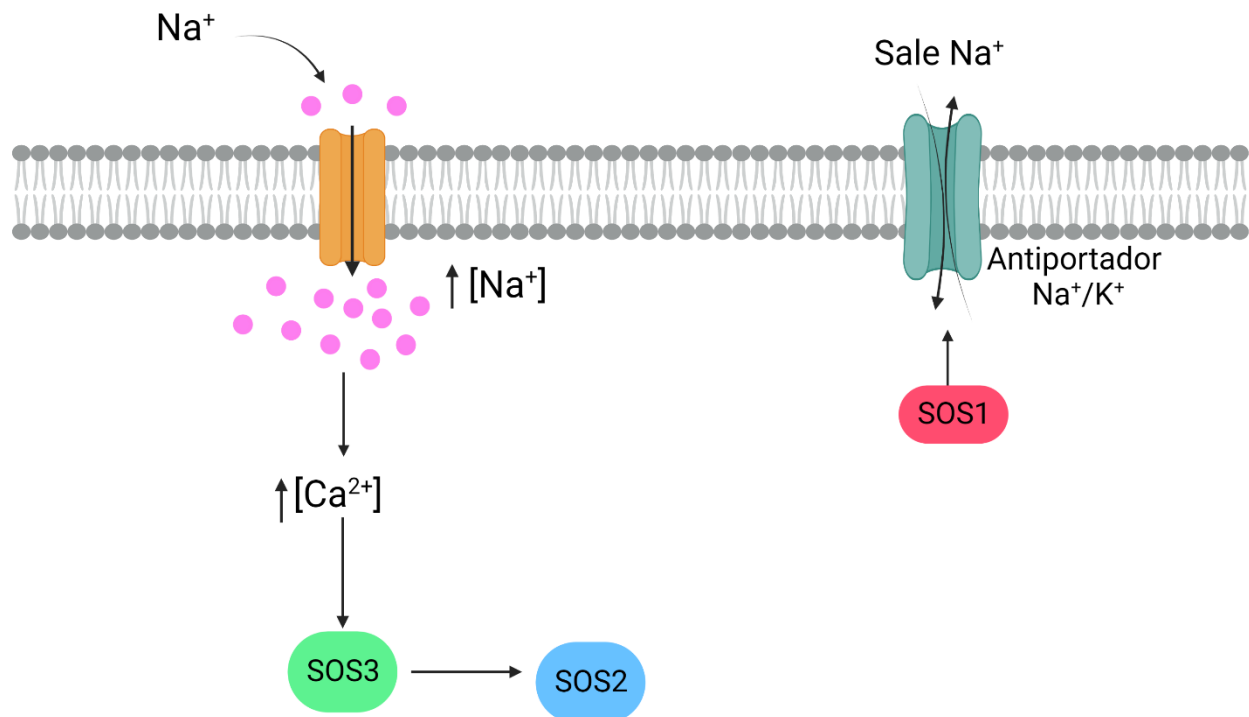


Figura 2. Esquema que ilustra la homeostasis de iones en respuesta a estrés salino. En respuesta a altas concentraciones de sal, se activa la vía SOS. Dicha vía involucra SOS1, 2 y 3. SOS1 es un antiportador que ayuda a la exclusión de Na⁺ de células bajo estrés. también la concentración alta de iones Na⁺ conduce a la activación dependiente de calcio de SOS3 y SOS2. Figura modificada de Amin I, 2021.

Respuestas moleculares de las plantas ante el déficit hídrico

La deficiencia hídrica en plantas desencadena una serie de señales iónicas, mecánicas y osmóticas reconocidas por diversos receptores. De manera general, la deshidratación celular genera alteración de la mitosis, reducción del metabolismo, del volumen celular y de la turgencia, así como potencial hídrico negativo en el apoplasto y alta concentración iónica que puede resultar citotóxica (Mendez, 2019).

Dos de los principales mecanismos moleculares que intervienen en la resistencia y respuesta a la deficiencia hídrica son la acumulación de la fitohormona ácido abscísico (ABA) y la inducción de las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía, conocidas como proteínas LEA. Se ha encontrado una relación entre estos mecanismos

moleculares, al probar que algunos de los genes que codifican para las proteínas LEA son inducibles en tejidos vegetativos por ABA y estrés osmótico (Dalal, 2009).

Otros factores importantes en la transducción de señales en la respuesta al déficit hídrico que pueden o no ser regulados por ABA, son los factores transcripcionales, como los DRE (DRE-binding protein), CBF (C-repeat-binding factor), AREF/ABF (ABA-binding factor). Estos factores transcripcionales se encargan de activar genes que codifican proteínas diversas cuyas actividades son necesarias para establecer la homeostasis celular que conduce a la adaptación y/o ajuste al estrés (Hirayama, 2010).

En términos generales, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación y defensa contra los daños causados por la deficiencia hídrica. Estos mecanismos se basan en genes agrupados en tres categorías principales:

- I. genes involucrados en cascadas de señalización y control transcripcional.
- II. genes con funciones directas de protección de membranas y proteínas.
- III. genes de transporte y secuestro de iones.

La respuesta depende del tipo y la duración del estímulo, sin embargo, los flujos de los segundos mensajeros como calcio (Ca^{2+}) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en los distintos tipos de estos antes mencionados incrementan. No obstante, el/los receptores en la percepción y expresión genética serán distintos, aunque en algunos casos pueden compartirse, por ejemplo, en déficit hídrico (Mendez, 2019).

En la tabla 1 se presentan las respuestas generales a condiciones de deficiencia hídrica y las condiciones ambientales que ocasionan este déficit hídrico como: salinidad y congelamiento.

Tabla 1. Efectos del estrés abiótico en plantas y los mecanismos generales de respuesta.

Tipo de estrés	Efectos en la planta	Mecanismos de respuesta
Déficit hídrico	Reducción del potencial hídrico; deshidratación celular; reducción de la expansión celular y del metabolismo; cavitación; citotoxicidad iónica; muerte celular; inhibición de la fotosíntesis.	Cierre de estomas, acumulación de proteínas LEA, disminución de la elongación radicular y reducción del área foliar.
Alta salinidad	Reducción del potencial hídrico; deshidratación celular; toxicidad iónica; inhibición de la fotosíntesis.	Activación de la vía de sensibilidad excesiva a la sal (SOS), compartimentación iónica, reducción del crecimiento de brotes y flujo iónico limitado de las raíces a los brotes.
Congelamiento	Reduce el agua líquida en los fluidos extracelulares y puede conducir a la deshidratación intracelular en organismos multicelulares.	Activación de las proteínas cinasas que responden al calcio (CPK, CIPK y CRLK1) y la cascada MAPK, que, en conjunto, regulan la expresión de genes COR.

Modificada de Mendez, C. 2019.

Proteínas Intrínsecamente desordenadas (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*)

Recientemente, las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*) y proteínas que contienen regiones de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPR, *Intrinsically Disordered Protein Regions*) y dominios ordenados, han provocado el interés de los investigadores principalmente debido al hecho de que la existencia de tales moléculas biológicamente activas sin una estructura tridimensional estable contradice el paradigma tradicional “una proteína-una estructura-una función”.

Dentro de las características para definir si una proteína es IDP o IDPR se encuentra la composición de aminoácidos en la secuencia. Un análisis comparativo de la composición

de la secuencia de proteínas ordenadas y desordenadas revelo que residuos como Ala, Arg, Gly, Gln, Glu, Lys, Pro y Ser (denominados residuos que promueven el desorden) se produjeron con mayor frecuencia en las proteínas IDP e IDPR, además, contrastantemente, los residuos como Asn, Cys, Ile, Leu, Phe, Val, Trp y Tyr fueron más comunes en los segmentos ordenados/estructurados de las proteínas (denominados residuos promotores del orden) (Trivedi *et. al*, 2022).

Antes de que fueran finalmente reconocidas como una extensión única e importante del proteoma, estas proteínas altamente dinámicas con importantes funciones biológicas fueron descubiertas y redescubiertas varias veces. Los análisis bioinformáticos sistemáticos muestran que las IDP e IDPR son abundantes en cualquier proteoma. Por lo tanto, estas proteínas han pasado de una categoría de raras y oscuras excepciones a una nueva clase de proteína muy comunes en la naturaleza, cuya funcionalidad está determinada por la falta de estructura estable.

La importancia biológica de las IDP se puede abordar y corroborar a través de la función identificada para algunas de ellas y, por su abundancia natural mediante análisis *in silico*, en donde se predice que el 30% de las proteínas de eucariotas presentan niveles significativos de desorden. Además, el 70% de las proteínas consideradas como proteínas de señalización también presentan regiones desordenadas (Uversky, 2011).

Muchas de las IDP experimentan un cambio conformacional pasando de un estado desordenado a un estado plegado cuando interactúan con su blanco (Uversky, 2011). En el mecanismo de “plegamiento asociado a la interacción” de las IDP participan regiones denominadas MoRF (*Molecular Recognition Features*), las cuales están involucradas en el reconocimiento del blanco y son las regiones que sufren un cambio de conformación transitando de un estado desordenado a un estado ordenado (Liu, 2014). Sin embargo, el desorden de la proteína puede mantenerse aún después de la unión en los llamados “complejos difusos”, donde se crea una red de conexiones entre proteínas con sitios de unión dinámicamente distribuidos y de baja afinidad existiendo la misma probabilidad de que cualquier sitio de unión de la proteína desordenada

interacción con cualquier sitio de unión de sus blancos y de esta manera realizar una función (Liu, 2014 ; Uversky, 2011).

Funciones de las proteínas intrínsecamente desordenadas

Las funciones de las IDP/IDR son complementarias a las funciones de las proteínas y los dominios ordenados y las proteínas desordenadas suelen participar en las vías de regulación, señalización y control. Debido a su funcionalidad única, se sabe que las mutaciones en algunas de estas proteínas, las cuales comprometen su función cambiando su ambiente estructural, están asociadas a enfermedades tan serias como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, las amiloidosis y las enfermedades neurodegenerativas (Uversky N, 2013).

Entre las funciones que desempeñan las IDP se puede distinguir su participación como proteínas de andamiaje o ensambladoras, como chaperonas, proteínas efectoras, sitios de reconocimiento, cadenas entrópicas y proteínas de recolección o “scavengers”. Las proteínas LEA mencionadas anteriormente, se han considerado como IDPs, ya que comparten ciertas características fisicoquímicas como un alto contenido de aminoácidos cargados y su propensión a poseer un alto desorden estructural (Battaglia *et al.*, 2008).

Sensibilidad estructural al ambiente de las proteínas intrínsecamente desordenadas

El comportamiento de un sistema IDP carece de un estado plegado singular y se consideran extremadamente sensibles a diferentes cambios ambientales que pueden modificar su energía libre de formas diferentes, reduciendo algunos mínimos de energía y elevando algunas barreras energéticas. Esto explica la plasticidad conformacional de un IDP, su extrema sensibilidad a los cambios en el entorno, su capacidad para interactuar con múltiples blancos diferentes y, en consecuencia, plegarse de diferentes maneras (Uversky, 2019).

Un ejemplo clásico de las IDP que participan en la respuesta a condiciones adversas son las “hidrofilinas”. Se ha asociado su acumulación con la exposición de las células o de

los organismos a condiciones de limitación de agua. Además, interesantemente, se han encontrado en diferentes *phyla* donde de igual manera, están acumuladas en respuesta a una baja disponibilidad de agua en el ambiente, dígase arqueas, bacterias, hongos, plantas, insectos, artrópodos y otros animales. También se acumulan en aquellas células que transitan por etapas de desarrollo que involucran un déficit hídrico y en estructuras u órganos que pasan por estados de deshidratación severa (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2016).

Otro ejemplo de IDPs, son las proteínas LEA miembros de *A. thaliana*. Que mediante estudios de análisis estructural por difracción circular (DC) y por espectroscopía de infrarrojo (IR) muestran la carencia de una estructura secundaria definida en solución acuosa, sin embargo, en presencia de sacarosa, glicerol o etilenglicol adoptan una estructura secundaria estable tipo hélice alfa (Shih *et al.*, 2008; Battaglia *et al.*, 2008).

Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*)

Las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) se acumulan en las últimas etapas del desarrollo de las semillas ortodoxas, etapa en el que la semilla llega a perder hasta el 98% de su contenido de agua, razón por la que se les ha atribuido la función de conferir tolerancia a la deshidratación (Battaglia *et al.*, 2013).

Dure en 1981 descubrió por primera vez las proteínas LEA en el desarrollo de semillas de algodón (Dure *et al.*, 1987). Posteriormente, se encontraron en trigo, cebada, maíz, arroz, girasol, papa, uva, manzana, frijol, arabidopsis, tomate, centeno, soja, zanahoria, etc. Sin embargo, no son específicas de plantas, se han encontrado en otros organismos como la bacteria *Deinococcus radiodurans* y *Bacillus subtilis*, el quironómido *Polypedilum vanderplanki*, el camarón de salmuera *Artemia*, diferentes especies de nematodos, rotíferos y cianobacterias (Hundertmark, 2008).

Las proteínas LEA en plantas, se localizan generalmente en el citosol, sin embargo, también se han encontrado en regiones nucleares y algunas en cloroplastos y mitocondrias (Hong, 2005).

Dentro de las características estructurales de estas proteínas, destaca su peso molecular pequeño. Principalmente oscila entre 10 y 30 kDa. Son miembros de un grupo más extenso de proteínas, conocido como hidrofilinas. Las hidrofilinas son aquellas proteínas que presentan un elevado contenido de aminoácidos hidrofílicos como Gly (proporción de residuos >6%), Ala, Glu, Ser y Thr (considerando un índice de hidrofiliidad total mayor a 1). Y carecen o contienen menos residuos de aminoácidos como como Cys y Trp (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Una de las propiedades más importantes de las proteínas LEA es su carencia de estructura tridimensional bien definida, dado que los programas de modelado y predicción de estructuras sugieren que la mayoría de las proteínas LEA estudiadas experimentalmente han revelado un alto grado de desorden en su estructura cuando se encuentran en solución. Esto las ha llevado a ser consideradas proteínas intrínsecamente desordenadas o IDP por sus siglas en inglés (Battaglia *et al.*, 2008).

Clasificación de las proteínas LEA

En total, se han encontrado 51 genes que codifican para proteínas LEA en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los cuales se han clasificado de acuerdo con la similitud en su secuencia de aminoácidos en distintos grupos (tabla 2).

Existe más de una clasificación, sin embargo, en el presente trabajo, se utilizará la nomenclatura de PFAM (*database of protein families*). Esta nomenclatura consiste en agrupar a los genes que codifican para proteínas LEA en distintos grupos: LEA_1, LEA_2, LEA_3, LEA_4, LEA_5, Dehidrinas, PvLEA18, SMP y AtM.

Los grupos LEA_1, LEA_4, LEA_5, Dehidrinas y PvLEA18 corresponden a las proteínas LEA hidrófilas o "típicas", mientras que aquellas proteínas LEA que presentan características hidrofóbicas "atípicas" pertenecen a los grupos LEA_2, LEA_3 y SMP.

Tabla 2. Muestra la clasificación de los distintos grupos de proteínas LEA con las correspondientes equivalencias entre diferentes autores y los motivos conservados en sus secuencias (según sea el caso).

Battaglia et al. 2008	PFAM nombre	Dure et al. 1989	Motivos conservados en sus secuencias
Grupo 1	PF00477 (LEA_5)	D19/D132	motivo de 20 aminoácidos GGETRKEQLGEEGYREMGRK
Grupo 2	PF00257 (Dehidrinas)	D11	Segmento K EKKGIMDKIKEKLPG
Grupo 3	PF02987 (LEA_4)	D7/D29	11 aminoácidos (11-mer) TAQAAKEKAGE
Grupo 4	PF03760 (LEA_1)	D113	motivo 1 (SAKEKIS) repetido hasta seis veces motivo 2 (VSHKSK-VK-SL)
Grupo 5	PF04927 (SMP) PF03168 (LEA_2) PF03242 (LEA_3)	D34/D95/D73	motivo 1 (DVL-----KL---DV---VTDAE-V-AELR-- -P----- PGGVA-S---AAARLN) motivo 2 (KPV---DAAAIQAAE-RA-G-----GG-AA---Q-AA) motivo 3 (TIGEALEA).
Grupo 6	PF10714 (PvLEA18)	_____	motivo con LEDYK
-	AtM	_____	_____

Modificada de Battaglia et al., 2008

Las proteínas LEA típicas

LEA_1

Las proteínas de esta familia se conservan en la región N-terminal, la cual posee alrededor de 70 a 80 residuos y se predice que forman hélices alfa anfipáticas, mientras que la región C-terminal está menos conservada y es de tamaño variable. En la región N-terminal este grupo posee un motivo conservado con la siguiente secuencia consenso: AQEKAEKMTA[R/H]DPXKEMAHK[E/K][A/E][K/R]. Sin embargo, se pueden distinguir cuatro motivos adicionales en muchas proteínas LEA de este grupo. La presencia o ausencia del motivo 4 o 5 define dos subgrupos (4A y 4B) dentro de la familia. El subgrupo 4A consta de proteínas pequeñas (80-124 residuos) con 2 y/o 3 motivos conservados. El subgrupo 4B tiene representantes más largos (108-180 residuos) que, además de tener 3 motivos en la porción N-terminal, pueden contener 4 y/o 5 motivos en la región C-terminal. Un miembro de este grupo es la proteína D-113 del algodón, que fue la primera en descubrirse (Battaglia *et al.*, 2008; Nagaraju *et al.*, 2019).

LEA_4

Este grupo se caracteriza por presentar motivos repetidos de 11 aminoácidos (11-mer) [TAQAAKEKAGE] (Tabla 2). En función de la abundancia en la secuencia de aminoácidos de estos motivos repetidos, se dividen en dos subgrupos (3A y 3B). El subgrupo 3A comprende a los motivos altamente conservados, en la región N-terminal se encuentra el motivo 4 (SYKAGETKGRKT), y en la región C-terminal, se encuentran los motivos 1 y 2 (GGVLQQTGEQV y AADAVKHTLGM). Este subgrupo es representado por la proteína LEA D-7 de algodón. El subgrupo 3B es más heterogéneo en los motivos repetidos 11-mer. Se han encontrado cuatro variaciones del 11-mero (motivos 1-4). Sin embargo, el motivo 5 está muy conservado. Este subgrupo es representado por la proteína LEA D-29 del algodón (Battaglia *et al.*, 2008; Nagaraju *et al.*, 2019).

LEA_5

Este grupo incluye proteínas con una composición aproximada de 40% de aminoácidos cargados y de un 18% de glicina, por lo que su estructura se puede predecir cómo desordenada en solución acuosa. Está presente en todos los taxones y contiene 3 motivos altamente conservado (Tabla 2). Son moléculas pequeñas con un peso molecular promedio de 11.5 kDa, un máximo de 20.3 kDa y un mínimo de 6.8 kDa (Battaglia *et al.*,2008; Bies *et al.*, 2008).

Dehidrinas

Una característica particular de este grupo es la presencia de una región en la proteína rica en residuos de Lys, regularmente en la región carboxilo, a la que se le denomina “segmento K”. También existen otros motivos que comúnmente se encuentran en este grupo de proteínas. Uno de ellos es el “motivo Y”. El “motivo Y” consta de una secuencia repetida en tándem de 1-35 residuos y un dominio rico en Ser con susceptibilidad a ser fosforilado. La fosforilación de estos residuos se ha asociado con su translocación al núcleo, aunque se localizan principalmente en el citosol. Existen cinco subgrupos de acuerdo con el arreglo y presencia de los dominios característicos de este grupo (K, Y y S): YSK, SK, K, KS, YK. Presentan valores en su masa molecular en promedio de 18.3 kDa, con un mínimo de 5.3 kDa y un máximo de 66.3kDa. Uno de los subgrupos de las Dehidrinas se caracteriza por presentar carácter ácido, y por acumularse mayoritariamente en periodos de congelamiento (Battaglia *et al.*,2008).

PvLEA18

Las proteínas de este grupo presentan 1 dominio conservado (LEDYK) (Tabla 2). Son proteínas que se distinguen por su pequeño tamaño con masas moleculares que van desde 7 kDa a 14 kDa. La primera proteína descubierta de este grupo corresponde a la PvLEA18 proveniente de la planta *Phaseolus vulgaris*, conocida comúnmente como frijol (Reyes *et al.*,2005; Bies *et al.*, 2008).

La transcripción y los niveles de expresión de estas proteínas se acumulan en gran medida en las semillas secas y responden al déficit hídrico y a tratamientos con ABA. Sin embargo, en condiciones normales de crecimiento, la expresión del gen que codifica para estas proteínas también se regula durante el desarrollo. Ya que se ha detectado la acumulación alta de estas proteínas y transcritos en la zona de expansión de los hipocótilos de plántulas de frijol, que muestran potenciales hídricos más bajos que los de las regiones sin crecimiento (Battaglia *et al.*,2008).

Las proteínas LEA atípicas:

SMP

Como los grupos 6 y 7, este grupo también se considera un grupo de proteínas LEA atípicas. La primera proteína LEA descrita para este grupo ha sido la D-34. Dentro de las características de estas proteínas atípicas, se encuentra una proporción significativamente mayor de residuos hidrofóbicos. Debido a esta característica, estas proteínas no son solubles después de la ebullición, lo que sugiere que adoptan una conformación globular.

A pesar de que se sabe poco sobre este conjunto de proteínas, los datos disponibles indican que sus transcritos se acumulan durante la última etapa de desarrollo de la semilla y en respuesta a condiciones de estrés, como sequía, luz ultravioleta, salinidad, frío y heridas (Battaglia *et al.*,2008).

LEA_2

Este grupo forma parte de una agrupación mayor a las que se les han denominado proteínas LEA atípicas, debido a que poseen una mayor proporción de residuos hidrofóbicos, a diferencia de las proteínas LEA típicas.

Este criterio integra en el grupo a todas las proteínas LEA que no cumplen con las características típicas, por lo que se podrán encontrar proteínas que no presentan similitud alguna. A pesar de poseer características fisicoquímicas contrastantes con las

proteínas LEA típicas, sus transcritos también se acumulan en la última etapa del desarrollo de la semilla, así como en condiciones de sequía, frío y salinidad. En general, son proteínas de carácter ácido y tienen una masa molecular promedio de 18.1 kDa, con un máximo de 38.5 kDa y un mínimo de 5.3 kDa. La primera proteína LEA descrita para este grupo fue la D-95 y adicionalmente se le ha asignado el subgrupo 5C (Battaglia et al., 2008).

LEA_3

Este grupo también forma parte de las proteínas LEA atípicas, dado que poseen una mayor proporción de residuos hidrofóbicos, razón por la que en general, estas proteínas no son solubles después de la ebullición, lo que sugiere que adoptan una conformación globular. Comparte características con el grupo LEA_2. Son proteínas ácidas y poseen una masa molecular promedio de 18.1 kDa. La primera proteína descrita para este grupo fue D-73 y forma parte del subgrupo 5B (Battaglia, et al., 2008; Bies et al., 2008).

AtM

En la clasificación PFAM se ha incluido a este grupo de proteínas LEA, debido a la similitud de sus características. Este grupo presenta alta hidrofiliidad, altos niveles de expresión durante la embriogénesis tardía y/o en condiciones de estrés abiótico y carece de homología con otras familias de proteínas.

Tras realizar una búsqueda BLAST se encontró que los genes AtM están presentes únicamente en especies de *Brassicaceae*. Por lo que resulta interesante investigar si las diferencias entre especies tienen un significado funcional (Hundertmark, 2008).

Funciones de las proteínas LEA

Como se ha mencionado anteriormente, la mayor acumulación de las proteínas LEA se lleva a cabo en la etapa de embriogénesis tardía, cuando se inicia el proceso obligado de deshidratación de semillas ortodoxas. Sin embargo, aunque en menores niveles,

también se ha observado su acumulación en los órganos vegetativos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en respuesta a condiciones de limitación de agua impuestas por deshidratación, alta salinidad o por períodos de congelamiento (*Olvera et al.*,2010). Por esta razón se ha propuesto que la función que tienen las proteínas LEA es conferir resistencia a los tejidos vegetativos en estas condiciones, mediante la estabilización de otras proteínas y membranas celulares durante periodos de estrés (Mendez, 2019).

La sobreexpresión de genes que codifican para proteínas LEA puede mejorar la tolerancia al estrés de las plantas transgénicas. Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan a la proteína AtLEA4-5 del grupo LEA_1 en una etapa adulta, muestran mayor tolerancia a la sequía que plantas silvestres.

La sobreexpresión de la proteína AtLEA4-5 confiere mayor capacidad de recuperación después de un tratamiento de sequía severa, además induce un mayor número de yemas axilares y florales. Por el contrario, al realizar mutantes en las que se carece de la expresión de una, dos o las tres proteínas LEA del grupo LEA_1, las plantas muestran un fenotipo de mayor sensibilidad al déficit hídrico. Lo cual sugiere que este grupo de proteínas LEA tiene un papel importante en la tolerancia a la sequía (*Olvera et al.*, 2010).

Con la finalidad de determinar la función de este grupo de proteínas se han realizado ensayos *in vitro* en donde enzimas reporteras como lactato deshidrogenasa (LDH) o malato deshidrogenasa (MDH) se someten a tratamientos de deshidratación parcial o congelamiento/descongelamiento en contacto o ausencia las proteínas LEA de este grupo. Con base en estos ensayos se ha demostrado que las proteínas LEA del grupo LEA_1 son capaces de prevenir la inactivación de la enzima reportera. Y pueden evitar cambios conformacionales responsables por la pérdida de actividad ante estas condiciones (*Reyes et al.*, 2007; *Cuevas-Velázquez et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha propuesto que las proteínas LEA de los grupos SMP, LEA_2 y LEA_3 en contacto con 13 azúcares pueden formar un biocristal mediante puentes de hidrógeno, otorgando una mayor estabilidad a los azúcares durante la anhidrobiosis,

hipótesis conocida como “Reemplazo del agua”. Esta hipótesis se basa en ensayos realizados mediante espectroscopía FTIR (*Fourier Transformation Infra-Red*). Comparando los espectros de una muestra deshidratada de sacarosa y aquellos en los que se tenía una muestra de sacarosa con LEA_3 D-7 (proveniente del polen). Los puentes de hidrógeno y la temperatura de transición de formación de un biocristal fueron mayor en el último caso (Wolkers *et al.*, 2001).

La función que ha sido descrita para las Dehidrinas y que pareciera ser característica de este grupo, radica en su capacidad de unir iones calcio; tal es el caso de ciertas dehidrinas de *Arabidopsis* que parecen localizarse en vacuolas, lo que ha llevado a sugerir que actúan como buffers de calcio, o bien, cuya función protectora o localización depende de la unión a este ión. También actúan uniendo metales durante déficit hídrico, lo cual indica que pudieran controlar los niveles de especies reactivas de oxígeno que se generan en esta condición (Shih *et al.*,2008 ; Battaglia *et al.*,2008).

Aunque no hay información directa acerca de la función del grupo PvLEA18 de las proteínas LEA, estudios de deshidratación *in vitro* muestran que los miembros de este grupo no desempeñan un papel protector contra la inactivación de enzimas reporteras, lo que sugiere existencia de blancos distintos para este grupo particular (Reyes *et al.*,2005).

Retomando lo anteriormente mencionado, se ha demostrado que las proteínas LEA están estructuralmente desordenadas en solución, sin embargo, la alta osmolaridad y el apiñamiento macromolecular pueden inducir niveles significativos de hélice alfa (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2016). Estudios de análisis estructural por dicroísmo circular (DC) y por espectroscopía de infrarrojo (IR) muestran que las proteínas LEA carecen de estructura secundaria definida en solución acuosa, sin embargo, en presencia de sacarosa, glicerol o etilenglicol adoptan una estructura secundaria estable tipo hélice alfa (Shih *et al.*, 2008; Battaglia *et al.*,2008).

En este sentido, se ha demostrado que la región N-terminal de la proteína AtLEA4-5 (miembro del grupo LEA_1) se encuentra conservada y tiene la capacidad intrínseca de

plegarse en hélice alfa en condiciones de déficit hídrico, mientras que la región C-terminal ante esta condición, muestra un alto desorden estructural. Además, la región N-terminal de la proteína AtLEAA4-5 es necesaria y suficiente para ejercer un efecto protector sobre la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) después de ciclos de congelación-descongelación y deshidratación parcial a bajas proporciones molares. Lo que sugiere que modular el entorno de las proteínas LEA y alterar su estructura intrínsecamente desordenada están relacionados con sus funciones (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2016).

Se ha propuesto que la actividad enzimática protectora que ejercen algunas proteínas LEA ante condiciones de deshidratación sobre enzimas reporteras como LDH podría funcionar como las chaperonas moleculares específicas de la deshidratación. Sin embargo, las chaperonas no solo evitan la agregación de proteínas en estas condiciones de carencia de agua sino que también forman complejos transitorios específicos con sus proteínas blanco a través de parches hidrofóbicos (Ellis, 2005).

Sin embargo, para el caso de las proteínas LEA resulta difícil demostrar en un estado seco si son capaces de formar complejos transitorios específicos con proteínas blanco como las chaperonas, ya que a medida que se secan las soluciones, se fuerza la proximidad de las proteínas. El mecanismo de dicha actividad protectora de las proteínas LEA podría ser más simple donde se ha propuesto que funcionan como “escudos moleculares”, en donde se hipotetiza que las proteínas LEA forman una barrera física entre sus moléculas blanco vecinas y evitan el contacto entre ellas y por tanto, su agregación (Wise y Tunnacliffe 2004; Goyal *et al.* 2005).

El estudio de la estructura de proteínas intrínsecamente desordenadas como las proteínas LEA, se realiza mediante diferentes técnicas, sin embargo, en el presente trabajo se mencionarán y describirán algunas de ellas.

Técnicas para estudiar la estructura de proteínas LEA

Dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es una forma de espectroscopia de absorción de luz que mide la diferencia entre el coeficiente de absorción molar de la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda por parte de cromóforos. El CD se ha utilizado ampliamente para discernir la estructura secundaria de las proteínas en función de las transiciones electrónicas en la región de longitud de onda ultravioleta (UV) lejana (~240-170 nm) (Miles *et al.*, 2021).

Las bandas de CD en la región UV lejana son características de diferentes tipos de estructuras secundarias. La estructura de hélice alfa muestra el patrón de bandas más invariable: un espectro característico con una banda positiva a 190 nm y dos bandas negativas a 208 y 222 nm, la estructura de hebras beta presentan bandas negativas a 218 nm y bandas positivas a 193 nm y las proteínas que carecen de una estructura secundaria ordenada (espiral aleatoria) no tendrán ningún pico por encima de 210 nm como se muestra en la Figura 3 (Chemes *et al.*, 2012).

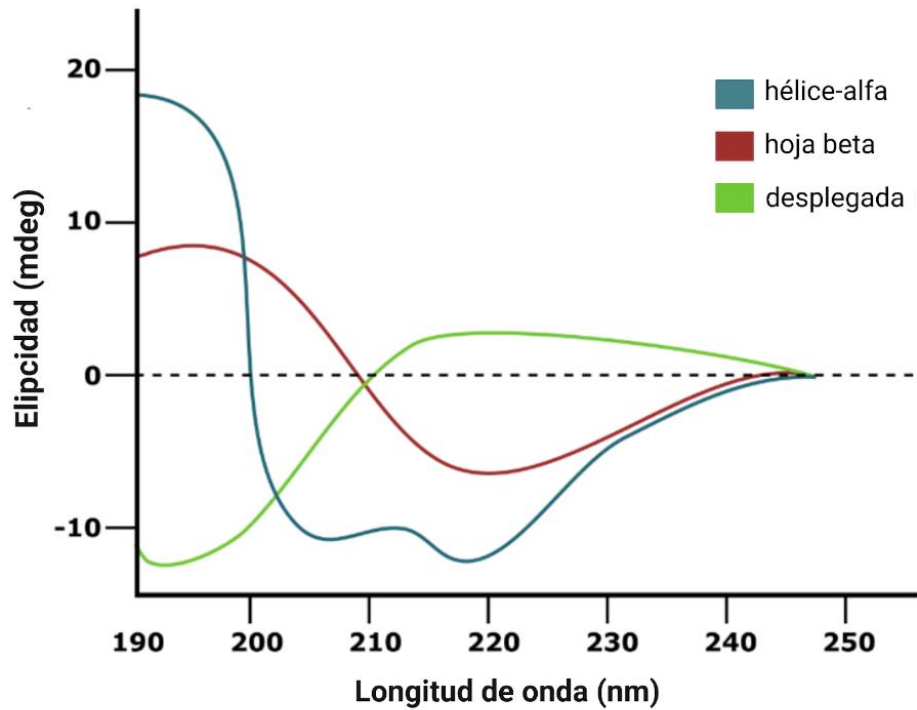


Figura 3. Espectros característicos de proteínas mediante CD. Gráfico simplificado que muestra los espectros de CD para los casos extremos de 100 % hélice-alfa (azul), 100 % hebra beta (rojo) y 100 % espiral aleatoria (verde). Modificada de Warwick 2022.

La espectroscopia de CD tiene una serie de ventajas con respecto a las técnicas estructurales de mayor resolución para estudiar la estructura de proteínas, como la cristalografía, la microscopía electrónica y la espectroscopia de RMN, ya que requiere cantidades relativamente pequeñas de muestra en condiciones (temperatura, concentración y componentes presentes) que pueden ser comparables a los que se encuentran en las células. Esto ha resultado en su uso generalizado tanto por parte de las comunidades bioquímicas como de biología estructural para complementar la información derivada de esos otros métodos biofísicos y evaluar la estructura de proteínas (Miles *et al.*, 2021). Además, se ha convertido en un método útil y sencillo para analizar proteínas intrínsecamente desordenadas como las proteínas LEA debido a su sensibilidad para informar diferentes transiciones conformacionales que implican cambios en la estructura secundaria (Chemes *et al.*, 2012).

Escaneo del espacio de solución (SSS, *Solution Space Scanning*)

El escaneo del espacio de solución (SSS, *Solution Space Scanning*) es un método experimental, computacional y analítico utilizado para la caracterización de alto rendimiento de la sensibilidad de las IDP. Este método, revela que las IDP pueden expandirse o compactarse en respuesta a cambios en el entorno de su solución. La dirección y la magnitud de los cambios conformacionales que sufran las IDP dependen tanto de la secuencia como de la identidad del cosoluto. Por ejemplo, algunos solutos, como las cadenas cortas de polietilenglicol, ejercen una expansión en algunas IDP y una compactación en otras. Sin embargo, a pesar de este comportamiento complejo, SSS permite interpretar racionalmente la capacidad de respuesta de las IDP a los cambios en la composición de la solución utilizando modelos de polímeros relativamente simples (Holehouse *et al.*, 2020).

El SSS *in silico* se realiza mediante simulaciones Monte Carlo de todos los átomos. Se utiliza el conjunto de simulaciones de CAMPARI, con el modelo solvente implícito ABSINTH. En Campari, el hamiltoniano es una combinación de 4 términos:

$$E_{\text{total}} = W_{\text{solv}} + U_{\text{LJ}} + W_{\text{el}} + U_{\text{corr}}$$

Donde: U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones entre residuos de proteínas, W_{el} es el potencial eléctrico (término basado en el potencial Coulombiano), U_{corr} es un término aplicado a los ángulos dihedros y W_{el} representa la interacción solución-proteína basado en el modelo de solvente implícito ABSINTH, que es equivalente a una transferencia de energía libre desde el vacío a una solución acuosa diluida.

El término W_{solv} se calcula inicialmente para cada secuencia en función de su conformación completamente expandida, lo cual, representa la máxima transferencia de energía libre (W_{maxsol}), ya que es la configuración de la proteína más expuesta al solvente. En SSS *in silico*, se modula la atracción/repulsión del solvente, modificando la fuerza total de interacción de la solución con el parámetro ψ donde:

$$\psi = \frac{W_{maxsolv(solucion)} - W_{maxsolv(agua)}}{W_{maxsolv(agua)}} \times 100\%$$

haciendo que las interacciones con el solvente sean más o menos atractivas (valores negativos o positivos, respectivamente).

Por otra parte, el SSS *in vitro* se aprovecha la técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) para informar sobre los cambios en la distancia promedio de construcciones de proteínas que comprenden una IDP de interés intercalada entre dos proteínas fluorescentes (FP), las cuales forman un par FRET.

Para generar un punto de referencia dependiente de la longitud, Moses y sus colaboradores midieron la eficiencia FRET (Ef) de una serie de enlazadores repetidos de Glicina-Serina (GS) de 16, 32, 48, 64 y 96 aminoácidos de longitud, intercalados entre dos FP: mTurquoise2 (mTQ2) como donadora y mNeonGreen (mNG) como aceptora.

La Ef para las construcciones utilizadas, se correlaciono linealmente con el número de repeticiones GS como se esperaba. Con base en esto, se realiza una interpolación de la Ef para un enlazador GS de una longitud determinada y se asigna una relación nombrada “ χ ”:

$$\chi = \frac{R_e^i}{R_e^{GS}} - 1$$

dónde R_e es la distancia de un extremo a otro entre la FP donante y aceptora. Los superíndices i o GS se refieren a una secuencia específica de IDP o un enlazador GS de longitud equivalente, respectivamente (Moses et. Al, 2020).

Un valor negativo de “ χ ” indica que una IDP intercalada entre dos FP se encuentra más compacta en una solución determinada con relación a un enlazador GS de longitud equivalente. Un valor positivo (color azul) indica que una IDP intercalada entre dos FP

estará más expandida en una solución determinada que un enlazador GS de longitud equivalente (Figura 4) (Moses et. Al, 2020).

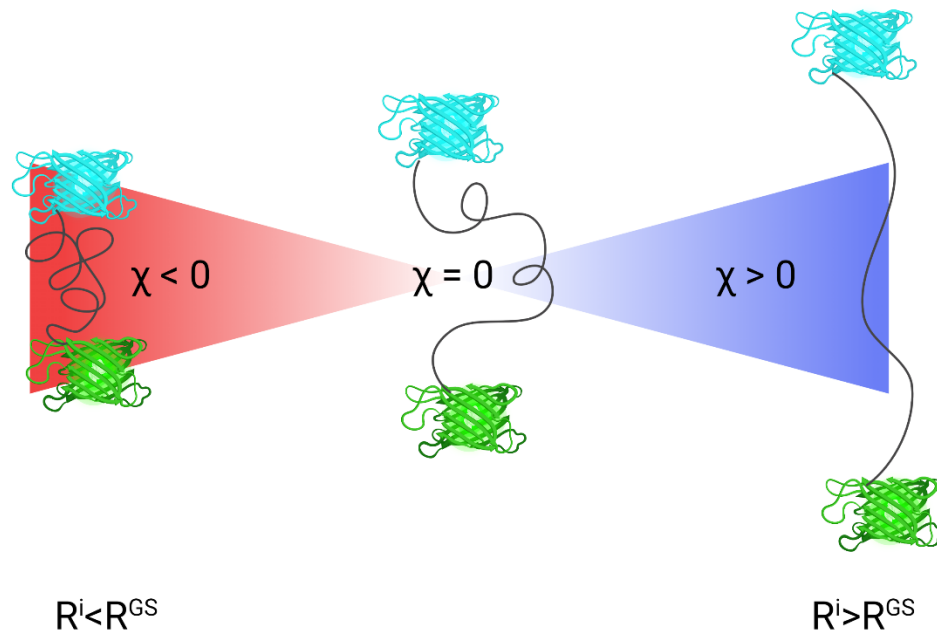


Figura 4. Valores asignados de χ en SSS. Un valor negativo (color rojo), indica que una IDP intercalada entre dos FP se encuentra más compacta en una solución determinada con relación a un enlazador GS de longitud equivalente. Un valor positivo (color azul) indica que una IDP intercalada entre dos FP estará más expandida en una solución determinada que un enlazador GS de longitud equivalente. Imagen modificada de Moses *et al.*, 2020.

II. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas LEA carecen de una estructura tridimensional bien definida, por lo que se pueden clasificar como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*). Sin embargo, una de las características más importantes de las proteínas LEA es la capacidad que presentan de adquirir estructura secundaria, particularmente hélices-alfa, durante condiciones de falta de agua y amontonamiento macromolecular (Wolkers *et al.* 2001; Tunnacliffe, 2007; Boudet *et al.* En 2006).

Al evaluar la estructura de proteínas del grupo LEA_4 de *A. thaliana* mediante dicroísmo circular, se ha demostrado que las proteínas COR15A, LEA11 y LEA21 se encuentran desordenadas en condiciones completamente hidratadas, pero en condiciones de alta osmolaridad inducidas con glicerol, aumenta gradualmente el contenido de hélices-alfa (Bremer *et al.* 2017). Otra proteína que pertenece a este grupo es la proteína LEA7, cuya estructura también ha sido determinada mediante dicroísmo circular. De forma similar a las proteínas COR15A, LEA11 y LEA21, la proteína LEA7 se encuentra en gran parte desordenada en un estado hidratado, pero en un estado desecado, incrementaba el porcentaje de estructura secundaria hélice-alfa (Popova, 2011). Por otro lado, las proteínas LEA del grupo LEA_4 de *Artemia franciscana*: AfrLEA2 y AfrLEA3m, también están intrínsecamente desordenadas en solución, sin embargo, en condiciones de desecación adquieren una estructura secundaria predominantemente de hélices-alfa (Boswell, 2014).

Asimismo, una proteína de trigo (TdLEA3) que presenta homología en secuencia con el grupo de proteínas LEA_4 de *A. thaliana*, es desordenada en gran medida, en condiciones completamente hidratadas y adquiere estructura hélice-alfa al secarse (Koubaa, 2019). Algunas proteínas LEA_4, actúan como un protector de desecación en organismos anhidrobióticos como *Polypedilum vanderplanki*, también está estructuralmente desordenada en solución, pero adquieren una estructura predominantemente helicoidal durante el secado (Nishimoto, 2019).

En términos generales, las proteínas LEA que pertenecen al grupo LEA_4, se encuentran desordenadas en solución acuosa, pero en presencia de osmolitos como sacarosa, glicerol y etilenglicol (EG) experimentan transiciones estructurales hacia la formación de hélices-alfa (Knox, 2020). Tiene sentido que la información sobre la estructura de proteínas LEA del grupo LEA_4 sea extensa, dado que este grupo de proteínas es el más grande y la mayoría de las proteínas LEA identificadas en distintas especies de plantas u otros organismos no vegetales, forman parte de este grupo (Knox, 2020).

También existe información sobre la estructura de proteínas LEA pertenecientes a otros grupos, por ejemplo, la proteína AfLEA1 que se expresa en *Artemia franciscana* durante etapas en las que es tolerante a la desecación. AfLEA1 es miembro del grupo LEA_5 y experimenta una transición conformacional de desorden a estructura predominantemente de hélice-alfa en condiciones donde se reduce la disponibilidad de agua (Janis, 2022). Otras proteínas LEA de *A. Thaliana* que han sido caracterizadas y se ha demostrado que también experimentan un cambio conformacional pertenecen al grupo LEA_1. Las proteínas AtLEA4-2 y AtLEA4-5, miembros de este grupo, están estructuralmente desordenadas en solución acuosa, pero bajo condiciones de alta osmolaridad y amontonamiento macromolecular, pueden inducir niveles significativos de hélices-alfa (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2016).

Esto no es exclusivo de proteínas LEA de la planta modelo *A. thaliana* pues los homólogos de las proteínas LEA_1, por ejemplo, en soya (GmPM11, GmPM6 y GmPM30), poseen una estructura desordenada en solución acuosa, pero en desecación aumenta significativamente la proporción de conformaciones de hélice-alfa (Shin, 2012).

Las proteínas LEA de *A. thaliana* y de otros organismos, en condiciones de deshidratación, alta osmolaridad y/o amontonamiento macromolecular disminuyen su porcentaje de desorden y aumentan el porcentaje de estructura secundaria. En contraste, las proteínas con una estructura definida bajo condiciones de deshidratación sufren una pérdida de estructura y agregación (Wise, 2004). Esto ha sido demostrado para enzimas reporteras, incluidas las enzimas citrato sintasa (CS) y lactato deshidrogenasa (LDH) que cuando se secan o congelan/descongelan, forman agregados insolubles y pierden su

actividad enzimática. Sin embargo, la agregación de estas enzimas, se puede prevenir con la adición de proteínas LEA (Popova, 2015 ; Tunnacliffe, 2010).

La capacidad protectora que ejercen algunas proteínas LEA sobre enzimas reporteras bajo condiciones de desecación ha sido estudiada mediante ensayos *in vitro*. Por ejemplo, la proteína TdLEA3 confiere la estabilización de la enzima LDH después de someterla a condiciones de deshidratación, congelamiento y exposición a temperaturas elevadas (Koubaa, 2020). También proteínas LEA de *Xerophyta schlechteri* (XsLEAs), muestran esta capacidad de preservar la actividad enzimática de la LDH ante desecación, calor y estrés oxidativo *in vitro* (Artur, 2019).

Por otra parte, la dehidrina de trigo (DHN-5) tiene la capacidad de proteger la actividad enzimática de la LDH en estrés por deshidratación y mejorar la actividad y/o la termoestabilidad de enzimas fúngicas como β -glucosidasa (bglG) y glucosa oxidasa (GOD/POD) *in vitro* (Drira, 2013). Otra proteína que proporciona protección significativa de dos enzimas mitocondriales (fumarasa y rodanasa) cuando estas se someten a una desecación completa, es la proteína PsLEAm (Grelet, 2005).

De igual manera, la proteína AavLEA1 del nematodo anhidrobiótico *Aphelenchus avenae*, es capaz de proteger a la enzima reportera CS de la agregación causada por la desecación y el congelamiento (Goyal *et al.*, 2005). En conjunto, estos hallazgos muestran que algunas proteínas LEA pueden prevenir la inactivación de proteínas reporteras durante condiciones de desecación *in vitro*, sugiriendo una función tipo chaperona (Reyes *et al.*, 2005). De acuerdo con lo reportado por Cuevas-Velázquez *et al.* en 2016, tras evaluar la estructura de proteínas del grupo LEA_1 de *A. thaliana*, la región N-terminal de la proteína AtLEA4-5 es capaz de modificar su conformación de desorden a hélice-alfa bajo condiciones de amontonamiento macromolecular y, por otro lado, es la responsable de ejercer la función de estabilizar proteínas bajo limitación de agua. Tomando como referencia este antecedente, resulta relevante estudiar la sensibilidad estructural de proteínas LEA no solo del grupo LEA_1 de *A. thaliana* sino de otros grupos para dilucidar si esta sensibilidad estructural determina su función protectora.

III. HIPÓTESIS

La sensibilidad estructural al ambiente de proteínas LEA de distintos grupos de *Arabidopsis thaliana*, se correlaciona con su función protectora durante condiciones de desecación.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la relación entre la sensibilidad estructural al ambiente de algunas proteínas LEA de distintos grupos de *Arabidopsis thaliana* y su capacidad protectora durante condiciones de desecación *in vitro*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de proteínas LEA de *A. thaliana* y seleccionar un grupo representativo de estas proteínas.
- Determinar la sensibilidad estructural *in silico* de las proteínas LEA seleccionadas.
- Determinar la sensibilidad estructural *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas.
- Determinar la sensibilidad estructural *in vivo* de las proteínas LEA seleccionadas.
- Determinar la estructura secundaria *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas en solución acuosa y bajo condiciones de amontonamiento macromolecular.
- Caracterizar la función protectora durante condiciones de desecación *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cinco proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana*

Mediante una búsqueda de información en distintas bases de datos, se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas codificadas en la secuencia primaria de las 51 proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana*.

Para elegir un grupo de estas proteínas, se tomó en cuenta que pertenecieran a distintos grupos y que tuvieran las siguientes características fisicoquímicas:

- i. Longitud de aminoácidos de la proteína. Se obtuvo la longitud de aminoácidos de las 51 proteínas LEA de *A. thaliana*. Dado que la metodología de escaneo del espacio de solución está limitado a proteínas cuya longitud es ≤ 170 residuos. Se seleccionaron aquellas proteínas LEA que cumplen esta característica.
- ii. Alta proporción de aminoácidos polares, cargados y pequeños. Se seleccionaron las proteínas LEA que presentaran un enriquecimiento de aminoácidos cargados o polares y pequeños.
- iii. Selección de una proteína LEA control. Se seleccionó una proteína cuya sensibilidad estructural al ambiente y función protectora ya ha sido caracterizada.
- iv. Presencia de motivos conservados en la secuencia primaria de proteínas LEA 5. Tomando en cuenta las secuencias primarias de proteínas LEA_5 para elegir una proteína representativa de este grupo, se determinó la cantidad de veces que estaba presente uno de los motivos conservados característico de este grupo. En función del número de veces que se encontró este motivo, se seleccionó una proteína LEA _5.

- v. Abundancia de los transcritos en semilla seca de las proteínas PvLEA18. Se determinó la abundancia de los transcritos en semilla seca de las proteínas PvLEA18 de acuerdo con lo reportado en el navegador eFP Browser. Y se seleccionó la proteína PvLEA18 que presentó una mayor abundancia de los transcritos en semilla seca.

Escaneo del espacio de solución *in silico*

El escaneo del espacio de solución (SSS, *Solution Space Scanning*) *in silico* se realizó en colaboración con el estudiante de doctorado Feng Yu, del laboratorio del Dr. Shahar Sukenik de la Universidad de California, Merced (UC, MERCED). Se usaron simulaciones Monte Carlo de todos los átomos y el conjunto de simulaciones de CAMPARI con el modelo solvente implícito ABSINTH. Se moduló la atracción/repulsión del solvente para cada una de las secuencias de las proteínas LEA seleccionadas.

La fuerza total de interacción de la solución fue modificada, haciendo que las interacciones de las proteínas con el solvente fueran más o menos atractivas (valores negativos o positivos, respectivamente). Cada una de las secuencias de las proteínas LEA seleccionadas se simularon a 310 K (37°C) con 107 pasos de equilibrio, seguidos de 7x10 pasos de producción. Las conformaciones se escribieron cada 12,500 pasos, lo que resultó en un total de 5000 conformaciones para cada simulación. Cada secuencia se simuló en cinco repeticiones independientes, lo que resultó en un conjunto que contenía 30 000 conformaciones por secuencia. Posteriormente, se utilizó la biblioteca de python MDtraj para calcular el radio de giro de cada proteína LEA en cada condición.

Construcción del plásmido pET28a de expresión en células de bacteria

Los marcos de lectura abiertos de (ORF, *open reading frame*) de las proteínas LEA seleccionadas, fueron sintetizados por la compañía Gen Script en el plásmido de pET28a, utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* (*E. coli*). El plásmido pET28a contiene el promotor inducible T7, una etiqueta de afinidad 6xHis (que fue útil para purificar las proteínas seleccionadas mediante cromatografía de afinidad), un gen que le confiere resistencia a Kanamicina, y el gen que codifica para las

5 proteínas LEA en medio de los genes que codifican para las proteínas fluorescentes diferente (mTQ2 y mNG) (Figura 5).

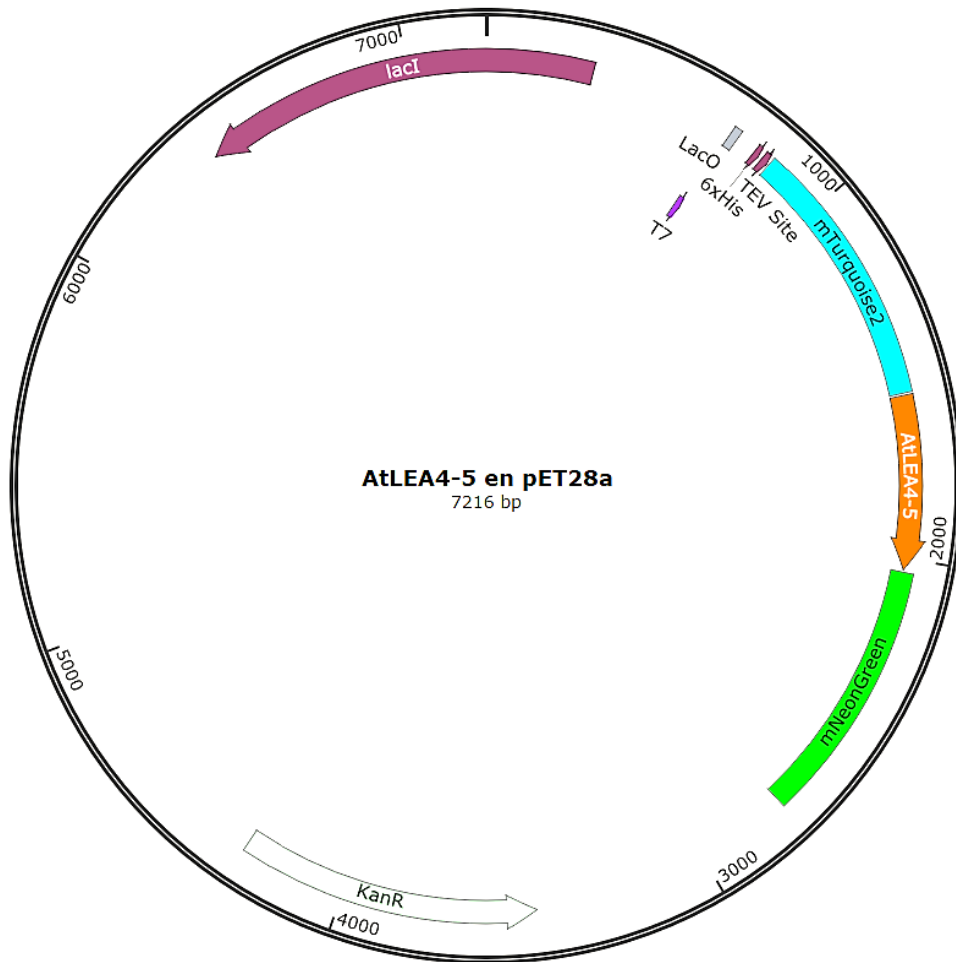


Figura 5. Ejemplo de la construcción correspondiente a la proteína AtLEA4-5 (At5g06760). La construcción contiene a la proteína AtLEA4-5 en medio del sistema FRET compuesto por las proteínas fluorescentes mNG y mTQ2 que fue utilizada como un control.

A continuación, se describirán el proceso de expresión y purificación de la proteína AtLEA4-5 como ejemplo, pero esta metodología fue realizada para expresar y purificar cada una de las construcciones que corresponde a las 5 proteínas LEA seleccionadas.

Expresión y purificación de las construcciones para las proteínas LEA recombinantes

Las construcciones que correspondían a cada una de las proteínas LEA seleccionadas fueron transformadas en la cepa BL21 de *E.coli* mediante el método de transformación por choque térmico. Posteriormente, las colonias transformantes fueron seleccionadas por resistencia a kanamicina. Se tomó una colonia para crecer un pre-cultivo de 100 mL de LB + 100 µL de kanamicina (50 mg/mL) y se cultivó toda la noche a 37°C y 225 rpm.

Al día siguiente, en un nuevo matraz con 1 L de LB + 1 mL de Kanamicina. Se dejó crecer a 37°C y 225 rpm hasta obtener una DO_{600} entre 0.6-0.8. Cuando se llegó a esta DO_{600} , se indujo la expresión de la proteína adicionando isopropil-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al 1 mM durante toda la noche a 16°C y 225 rpm. Las células se colectaron por centrifugación y se suspendieron en 20 mL de buffer de lisis (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, pH=8.0) + 1 tableta de inhibidor de proteasas. Se colocó toda la resuspensión en tubos falcon de 50 mL y se guardó a -80 °C.

Las células fueron lisadas por sonicación y el clarificado se obtuvo mediante centrifugación. Mediante cromatografía de afinidad, con una columna de Agarosa Ni-NTA de Qiagen, se adicionó el lisado soluble por la columna, luego se colocaron 50 mL de buffer de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH=8.0) y finalmente, con 9 mL de buffer de elución (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH=8.0) se eluyó la proteína purificada.

Una vez que se eluyó la proteína, se concentró mediante su adición un tubo Amicon Ultra-15 (10kDa) y se centrifugó durante 7 min a 4°C. Luego, la proteína concentrada obtenida en la cromatografía de afinidad se sometió a una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) con una columna HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg con el programa Superdex 200 16 60 Hi Load RUN durante 4 horas, 0.5 ml / min, para un total de 120 mL a -4°C.

Para comprobar que la purificación de las proteínas se había logrado satisfactoriamente, se realizó una Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE,

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) con las fracciones obtenidas y colectadas en la cromatografía de afinidad y exclusión molecular. El gel se corrió durante 45 min a 200 V, 400 mA.

Escaneo del espacio de solución *in vitro*

La caracterización de la sensibilidad estructural *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas, en respuesta a cambios en las características fisicoquímicas de la solución, se realizó mediante una estancia en UC-Merced con el grupo de investigación del Dr. Shahar Sukenik.

En placas de 96 pozos, por cada pozo se colocó buffer estándar (20 mM NaH₂PO₄ NaCl 100 mM, pH= 7.4) o (20 mM NaH₂PO₄, pH=7.4) según fuera el caso, proteína LEA purificada a una concentración 1 M y soluciones con distintos osmolitos a distintas concentraciones (tabla 3).

Una vez preparada la placa, se colocó correctamente en el lector de placas CLARIOStar (BMG LABTECH). Se eligió longitud de onda de excitación 420 nm y se midió la intensidad de la fluorescencia a un rango de longitud de onda de 450-600 nm. Se obtuvieron los espectros de emisión de la construcción FRET en cada uno de los pozos. Para el procesamiento de los datos, se utilizó el lenguaje de programación Python con el script creado por Moses *et al.*, 2020.

Tabla 3. Osmolitos utilizados y sus concentraciones.

Clase	Miembros	Concentraciones
Sales	KCl, NaCl	0.25 - 1.5 M
Polímeros (múltiples longitudes)	Polietilenglicol, ficoll, etilenglicol	4-24 %p/p
Osmolitos estabilizadores y metabolitos	Trehalosa, betaína, glicina, sorbitol, glicerol, sacarosa, trietilamina (TMAO) y sarcosina	4-24 %p/p TMAO (0.2-1.2 M)
Desnaturalizantes	Urea	0.25 - 1.5 M
Metabolitos y otras especies celulares	Aminoácidos libres: ácido glutámico (Glu) y Glicina (Gly)	2 - 12 %p/p

Construcción del plásmido pDRFLIP38 para expresión en células de levadura

Se amplificaron por PCR las regiones que codifican para estas proteínas contenidas en el vector pET28a utilizando oligonucleótidos específicos (tabla 4). Posteriormente, mediante la clonación de Gibson Assembly, estos productos de PCR fueron insertados en el vector pDRFLIP38 que contenía el par FRET (mTQ2 mNG).

Las construcciones resultantes (figura 6) se transformaron en células de *E. coli* mediante choque térmico, se seleccionaron mediante el uso de un medio de LB selectivo a Ampicilina y se confirmaron mediante PCR de colonia. Luego se purificó el DNA mediante el Kit Zymo PURE™ Plasmid miniprep de la marca Zymo Research. Para evaluar la sensibilidad estructural de las proteínas LEA seleccionadas *in vivo*, los plásmidos purificados fueron transformados en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) BJ5465 mediante el método de choque térmico. La selección de las células transformadas se realizó por auxotrofia en un medio carente de uracilo (SD-URA).

Las colonias transformadas con las construcciones correspondientes a las proteínas LEA seleccionadas, se verificaron mediante PCR de colonia de levadura con oligos específicos mostrados en la tabla 4, bajo condiciones específicas para cada construcción.

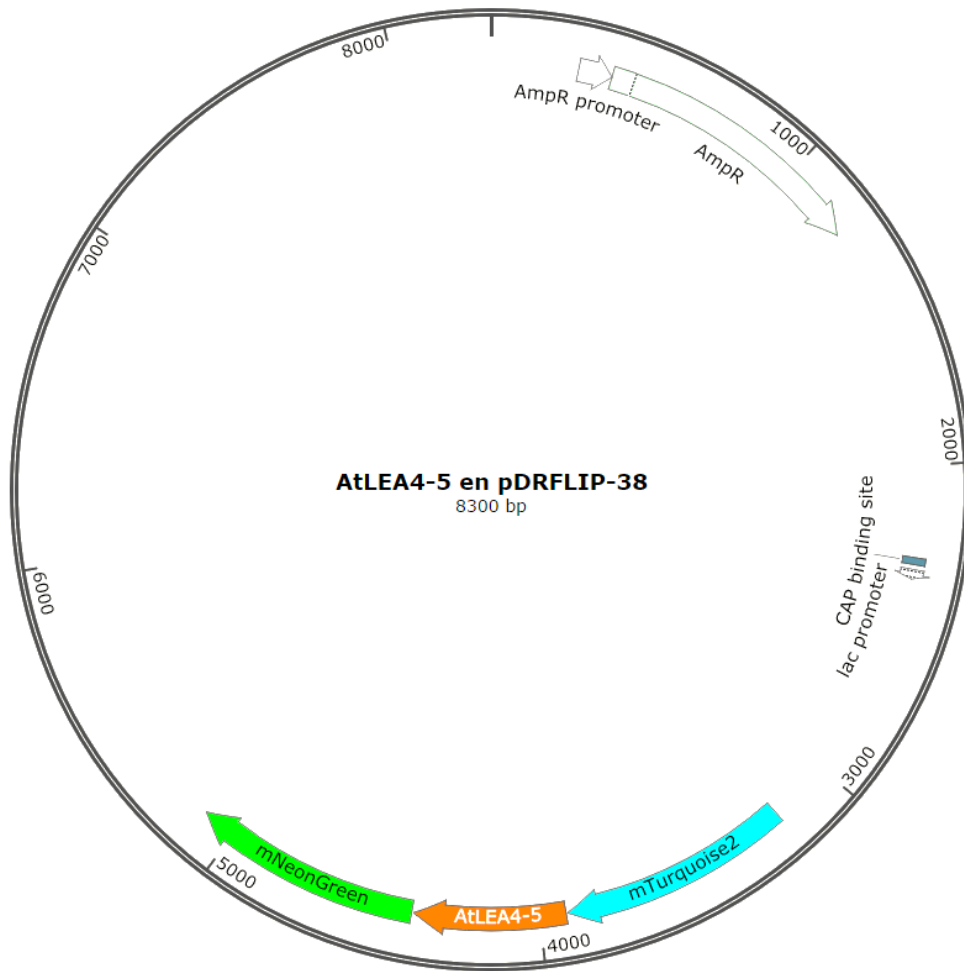


Figura 6. Ejemplo de la construcción correspondiente a la proteína AtLEA4-5 (At5g06760). La construcción contiene a la proteína AtLEA4-5 en medio del sistema FRET compuesto por las proteínas fluorescentes mNG y mTQ2 en el plásmido pDRFLIP38.

Ensayo FRET con células de levadura

Las colonias verificadas, se cultivaron en 3 mL de medio líquido YPD (extracto de levadura peptona-dextrosa, *Yeast Extract–Peptone–Dextrose*) a 200 rpm, 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600}) de 1 a 2. Posteriormente, 1 mL de este cultivo se colectó y lavó dos veces con buffer MES 50 mM, pH=6 y finalmente, se resuspendió en 1 mL de este buffer.

El ensayo FRET consistió en colocar en placas de 96 pozos mezclas de 50 μ L de levaduras con 150 μ L de las soluciones de NaCl a distintas concentraciones (0 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1000 mM y 1500 mM de NaCl) con la finalidad de ocasionar choque hiperosmótico en las células de levadura. Luego de aplicar los tratamientos con NaCl, las placas se colocaron en un lector de placas CLARIOStar (BMG LABTECH). Se eligió longitud de onda de excitación 420 nm porque es la longitud de onda de excitación de la proteína fluorescente donante (mTQ2) y se midió la intensidad de la fluorescencia a un intervalo de 450-600 nm. Una vez que el programa finalizó, se obtuvieron los espectros de emisión de la construcción FRET en cada uno de los pozos.

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia que codifica para cada proteína LEA del grupo selecto utilizados.

Identificador	Descripción	Secuencia (5' → 3')
DPN013	Forward para amplificar la proteína AtEM1	GGACGAACTGTATAAGGAGCTCG CGTCCAAACAGCTG
DPN014	Reverse para amplificar el vector de la proteína AtEM1	GCCCTTGCTAACCATAGATCTTTT GTTGGTGAATTTGGATTCCG
DPN015	Forward para amplificar la proteína LEA 7	GGACGAACTGTATAAGGAGCTCG CATCTCATCAAGAGCA
DPN016	Reverse para amplificar el vector de la proteína LEA7	GCCCTTGCTAACCATAGATCTTTTA CGTTGGGTCTCAC
DPN017	Forward para amplificar la proteína COR15A	GGACGAACTGTATAAGGAGCTCG CGATGTCGTTCTCAG
DPN018	Reverse para amplificar el vector de la proteína COR15A	GCCCTTGCTAACCATAGATCTTTT GTTGCATCTTTTGCCT
DPN019	Forward para amplificar la proteína AtLEA6-2	GGACGAACTGTATAAGGAGCTCGA GGCGGGTAAAACGCC
DPN020	Reverse para amplificar el vector de la proteína AtLEA6-2	GCCCTTGCTAACCATAGATCTTGG AGCCTTTGCATCCGT

Construcción del plásmido de expresión newpET28a

Con el propósito de evaluar la capacidad protectora de las proteínas LEA del grupo selecto, sus marcos de lectura abiertos de (ORF, *open reading frame*) fueron sintetizados por la compañía Gen Script en el plásmido newpET28a, utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* (*E. coli*).

El plásmido newpET28a contiene el promotor inducible T7, una etiqueta 6xHis (que fue de utilidad para purificar las proteínas mediante cromatografía de afinidad), un gen que le confiere resistencia a kanamicina, y el gen que codifica para las proteínas LEA seleccionadas (Figura 7).

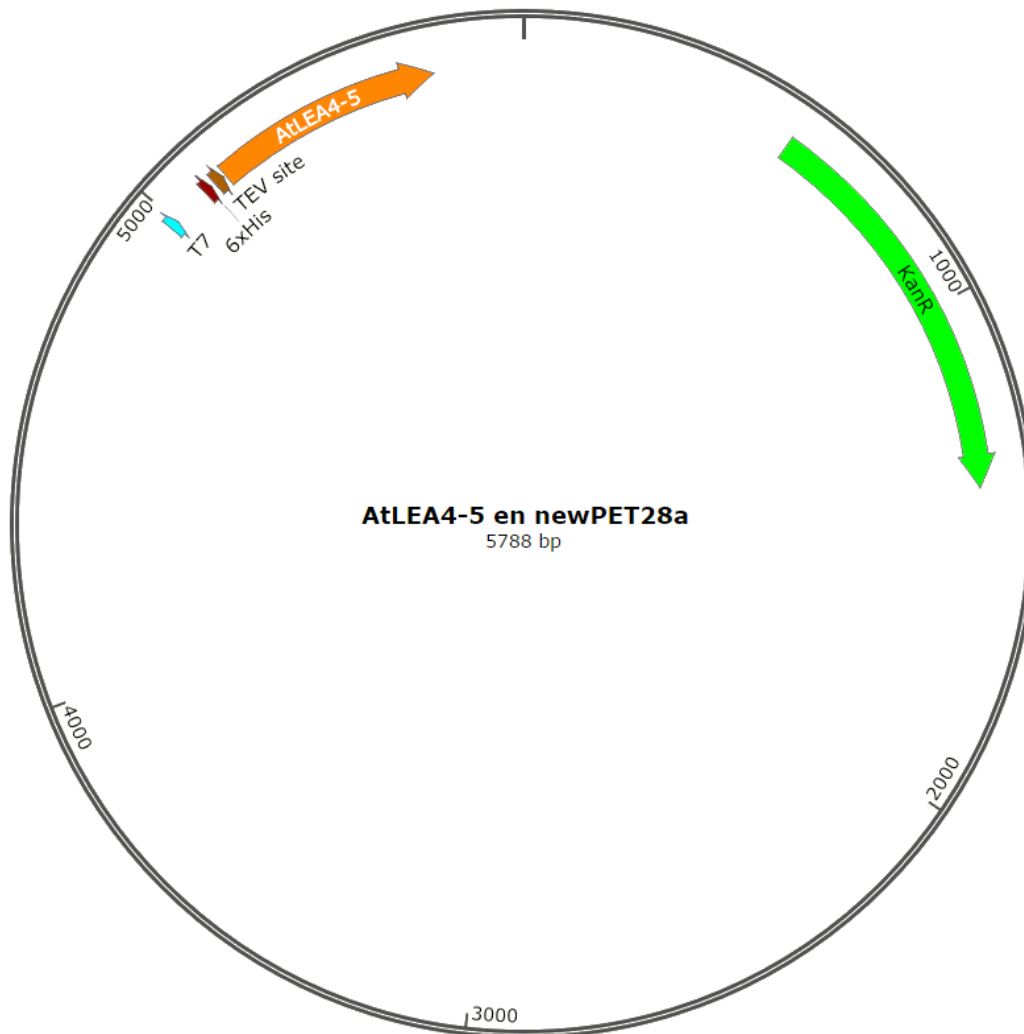


Figura 7. Ejemplo de la construcción correspondiente a la proteína AtLEA4-5 (At5g06760). La construcción contiene a la proteína AtLEA4-5 en el plásmido newPET28a.

La expresión y purificación de la proteína AtLEA4-5 se mostrará a continuación como ejemplo, pero esta metodología fue realizada para expresar y purificar cada una de las construcciones que corresponden a las 5 proteínas LEA del grupo selecto.

Expresión y purificación de las proteínas LEA recombinantes

Cada una de las construcciones fue transformada en la cepa BL21 de *E.coli* mediante el método de transformación por choque térmico. Posteriormente, las colonias transformantes fueron seleccionadas por resistencia a Kanamicina. Se tomó una colonia para crecer un pre-cultivo de 100 mL de LB + 100 μ L de Kanamicina (50 mg/mL) y se cultivó toda la noche a 37°C y 225 rpm.

Al día siguiente, en un nuevo matraz con 1 L de LB + 1 mL de kanamicina. Se dejó crecer a 37°C y 225 rpm hasta obtener una DO_{600} entre 0.6-0.8. Cuando se llegó a esta DO_{600} , se indujo la expresión de la proteína adicionando isopropil-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al 1 mM durante toda la noche a 16°C y 225 rpm debido a que fueron las condiciones óptimas para lograr una expresión adecuada de las proteínas LEA seleccionadas. Las células se colectaron por centrifugación y se suspendieron en 14 mL de buffer de lisis (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, pH=8.0) y se almacenó a -80°C.

La suspensión de células se descongeló en hielo y se sometieron a un choque térmico de 100°C por 10 min debido a que se ha descrito que algunas proteínas LEA son estables en condiciones acuosas a alta temperatura (Hatanaka *et al.*, 2013). Posteriormente, la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Agarosa Ni-NTA de Roche, el lisado se adicionó a la columna, posteriormente la columna se lavó con 50 mL de buffer de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH=8.0) y finalmente, la proteína se eluyó con 9 mL de buffer de elución (50 mM NaH_2PO_4 , 0.5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH=8.0).

Una vez que se eluyó la proteína, esta se desalinizó, mediante el uso de una cromatografía PD-10, se realizó un intercambio de buffer para tener a la proteína purificada en un buffer de 50 mM NaH_2PO_4 a pH=8.0. Con el propósito de incrementar la concentración a la proteína purificada, mediante el uso de un SpeedVac, se sometió a una pérdida de agua por 30 min.

Para comprobar que la purificación de la proteína se había logrado satisfactoriamente, se realizó una Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE,

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) con las fracciones obtenidas y colectadas en la cromatografía de afinidad y exclusión molecular. El gel se corrió durante 1 hr 30 min a 200 V, 400 mA.

Finalmente, las proteínas LEA purificadas (AtEM1, AtLEA4-5, LEA7 y AtLEA6-2) fueron identificadas por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LCMS) en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM. Las muestras fueron fragmentadas por un método enzimático utilizando tripsina para obtener sus constituyentes peptídicos. Posteriormente, utilizando la información contenida en bases de datos y comparando con el proteoma de *A. thaliana* fue posible identificar las proteínas con gran precisión.

Ensayo de Actividad Enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron mediante el uso de la enzima reportera Lactato deshidrogenasa (LDH) del músculo de conejo de Sigma-Aldrich. La LDH se diluyó hasta obtener una muestra de 50 μ L una concentración de 1 μ M (monómero) en ausencia o presencia de las proteínas LEA del grupo selecto purificadas anteriormente. Se colocó en un tubo eppendorf una relación molar 1:1 (proteína LEA: LDH) y se colocaron en un concentrador SpeedVac durante 1 hr 30 min para lograr una pérdida de agua 98% un ciclo de desecación. Posterior a este ciclo de desecación, las muestras se resuspendieron en 50 μ L de H₂O, se tomaron 20 μ L y se pusieron en contacto con 1 mL de Buffer de reacción (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM piruvato, 0.15 mM NADH) para determinar la actividad de la enzima LDH mediante un espectrofotómetro. La actividad enzimática de la LDH se determinó siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm (pendiente) como resultado de la conversión de NADH a NAD⁺.

El 100% de la actividad de la LDH fue considerada como el promedio de la pendiente de 3 repeticiones y 3 réplicas, en las que se midió la actividad de dicha enzima antes de someterse al ciclo de desecación. Posteriormente se obtuvo la proporcionalidad de actividad de la enzima con las muestras sometidas al tratamiento.

Dicroísmo circular

La determinación de estructura secundaria se llevó a cabo mediante Dicroísmo circular gracias al apoyo de la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig en el Instituto de Química de la UNAM.

Se realizaron 3 mezclas distintas para cada proteína recombinante purificada: una de ellas consistió en diluir las proteínas purificadas en Buffer 50 mM NaH_2PO_4 pH=8.0, para llevar a cabo el ensayo se emplearon 300 μL de proteína a una concentración de 0.03 mg/mL. Las otras dos consistieron en mezclar polietilenglicol 3350 y 8000 al 20% con 0.03 mg/mL de proteína en un volumen final de 300 μL . Todas las muestras se sometieron a la medición de DC de UV lejano mediante el uso de un espectropolarímetro de la marca Jasco J-1500 con una longitud de paso óptico de 0.1 cm. Se adquirieron espectros en un rango de 190-250 nm a 25°C de temperatura. Se promediaron tres espectros por cada muestra y la señal fue suavizada para disminuir el ruido. Los espectros se obtuvieron cada 1 nm con un tiempo promedio en cada punto de 2 segundos.

Posteriormente, los datos obtenidos se sometieron a un análisis posterior que permitió obtener en términos de porcentaje, los niveles de estructura secundaria realizado por el servidor Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>). Las cantidades relativas de hélice α y hoja β se determinaron sumando las contribuciones de la hélice 1 más la hélice 2 y la hebra 1 más la hebra 2, más turn, respectivamente. La estructura aleatoria se obtuvo directamente del resultado arrojado por el servidor.

VI. RESULTADOS

Selección y caracterización de cinco proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana*

Para determinar cómo se altera la estructura de las proteínas en respuesta a cambios en las condiciones de su entorno, se caracterizaron las propiedades codificadas en la secuencia primaria de las 51 proteínas LEA de *A. thaliana*. La caracterización fue útil para seleccionar solo cinco proteínas para su posterior análisis experimental.

La primera característica que nos permitió reducir las 51 proteínas LEA a 26 fue la longitud de aminoácidos. Esta característica es de suma importancia porque el método de escaneo del espacio de solución (SSS, *Solution Space Scanning*) está limitado a proteínas cuya longitud de aminoácidos sea menor a 170 residuos. Las 26 proteínas seleccionadas se muestran en la Tabla (5).

Tabla 5. Proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana* que poseen una longitud de aminoácidos menor o igual a 170 aminoácidos.

Número	Código AGI	Grupo	Longitud de aminoácidos
1	At1g01470	LEA_2	151
2	At1g02820	LEA_3	91
3	At1g32560	LEA_1	134
4	At1g52690	LEA_4	169
5	At1g54410	Dehidrina	98
6	At2g23110	PvLEA18	92
7	At2g23120	PvLEA18	83
8	At2g33690	PvLEA18	71
9	At2g35300	LEA_1	97
10	At2g40170	LEA_5	92

11	At2g41280	AtM	107
12	At2g42530	LEA_4	141
13	At2g42540	LEA_4	139
14	At2g46140	LEA_2	166
15	At3g02480	LEA_4	68
16	At3g50980	Dehidrina	128
17	At3g51810	LEA_5	152
18	At3g53770	LEA_3	124
19	At4g02380	LEA_3	97
20	At4g13230	LEA_4	120
21	At4g15910	LEA_4	109
22	At4g38410	LEA_3	87
23	At4g39130	Dehidrina	163
24	At4g39130	Dehidrina	151
25	At5g06760	LEA_1	158
26	At5g53270	SMP	159

El método SSS es útil en el estudio de los cambios estructurales de proteínas intrínsecamente desordenadas. Una de las características de las IDPs es su abundancia de aminoácidos cargados o polares como lisina (K), ácido glutámico (E), asparagina (N), glutamina (Q), ácido aspártico (D), histidina (H), arginina (R), así como de aminoácidos pequeños como glicina (G) y alanina (A). Por lo que se tomó esta característica como segundo criterio para la selección de las proteínas LEA.

A partir de este criterio se seleccionaron 10 proteínas LEA, de las cuales 6 pertenecían al grupo LEA_4. Los porcentajes de aminoácidos polares y pequeños de estas 6 proteínas LEA eran muy similares, así que decidimos elegir únicamente 2 de este grupo (la proteína LEA con un mayor porcentaje de aminoácidos polares y pequeños y la proteína LEA con menor porcentaje de aminoácidos polares y pequeños).

Además, 2 proteínas LEA de las 10 pertenecían al grupo LEA_1. Decidimos elegir a la proteína AtLEA4-5 (At5g06760), debido a que es una proteína cuya sensibilidad estructural al ambiente y función protectora ya han sido caracterizadas anteriormente, lo que es conveniente para nuestro estudio para utilizarla como una referencia.

De esta manera, se logró obtener un grupo de 7 proteínas LEA (tabla 6).

Tabla 6. Proteínas LEA seleccionadas en función de su tamaño y contenido de AA polares, cargados y pequeños.

Número	Código AGI	Grupo	Longitud de aminoácidos	Porcentaje de aminoácidos polares, cargados y pequeños
1	At1g52690	LEA_4	168	76
2	At2g23120	PvLEA18	83	76
3	At2g33690	PvLEA18	71	76
4	At2g40170	LEA_5	92	80
5	At2g42540	LEA_4	139	60
6	At3g51810	LEA_5	152	79
7	At5g06760	LEA_1	158	69

Hasta el momento, el grupo de proteínas LEA estaba formado por 7 proteínas que cumplían con los criterios antes mencionados y pertenecían a distintos grupos. No obstante, contiene dos proteínas pertenecen al grupo LEA_5. Para seleccionar una de

ellas, tomamos en cuenta la presencia del motivo conservado característico de esta familia, debido a que se ha reportado que algunos motivos de proteínas LEA pueden promover la tolerancia a la desecación *in vivo* (Hibshman *et al.*, 2021).

La proteína LEA_5 (At2g40170) sólo tenía una copia del motivo conservado de este grupo con secuencia: **RKEQLGHEGY**. Mientras que la proteína LEA_5 (At3g51810) tenía cuatro copias de este motivo (Tabla 7). Este fue el criterio para elegir a la proteína LEA_5 (At3g51810) (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencia primaria de las proteínas LEA_5 (At3g51810) y (At2g40170). Se muestran los motivos conservados en las secuencias de estas proteínas.

LEA_5 (At3g51810)	LEA_5 (At2g40170)
MASKQLSREELDEKAKQGETVVPGGTGGHSLEAQEHLAEG RSKGGQ TRKEQLGEGY QEIGHKGGEAR KEQLGHEGY QEM GHKGGEAR KEQLGHEGY QEMGHKGGEAR KEQLGHEGY K EMGRKGGLSTMEKSGGERAEIEIDESKFTNK	MASQQEKKQLDERAKKGETVVPGG TGGKSFEAQQHLAEGRSRGGQ TR KEQLGEGY QQMGRKGGGLSTGDKP GGEHAEIEIDESKFR

Por otra parte, en el grupo de proteínas LEA también se encontraban 2 proteínas LEA del grupo PvLEA18. Para elegir una de ellas, se tomó en cuenta los niveles de expresión en semilla seca de acuerdo a lo reportado en eFP browser (Tabla 8).

La proteína PvLEA18 (At2g23120) se expresa abundantemente en semilla seca, mientras que la proteína PvLEA18 (At2g33690) se expresa muy poco. En función a esto decidimos elegir a la proteína cuya abundancia de transcritos en semilla seca fuese mayor, es decir, la proteína PvLEA18 (At2g23120) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de los niveles de expresión de transcritos que codifican para las proteínas PvLEA18 (At2g23120) y (At2g33690) en semilla seca obtenidos de eFP Browser.

Código AGI	Grupo	Abundancia de los transcritos
At2g23120	PvLEA18	2657.82
At2g33690	PvLEA18	8.37

Finalmente, de acuerdo con las características mencionadas anteriormente, se obtuvo el grupo final de 5 proteínas LEA para su posterior estudio (tabla 9).

Tabla 9. Proteínas LEA seleccionadas.

Código AGI	Nombre	Familia Pfam	Longitud de aminoácidos	Porcentaje de aminoácidos polares cargados y pequeños
At1g52690	LEA7	LEA_4	169	75.74
At2g23120	AtLEA6-2	PvLEA18	83	75.90
At2g42540	COR15A	LEA_4	139	60.43
At3g51810	AtEM1	LEA_5	152	78.95
At5g06760	AtLEA4-5	LEA_1	158	69.07

Determinación de la sensibilidad estructural *in silico* de las proteínas LEA seleccionadas

Con el objetivo de caracterizar la sensibilidad estructural *in silico* de las 5 proteínas LEA de *A. thaliana* en respuesta a la atracción/repulsión del solvente, utilizamos la metodología de SSS *in silico*.

La fuerza total de interacción de la solución fue modificada, haciendo que las interacciones de las proteínas con el solvente fueran más o menos atractivas y en función del valor de Radio de giro (Rg) calculado para cada proteína LEA, determinamos la capacidad de compactarse o extenderse al incrementar la repulsión del solvente. Un valor bajo de Rg indica que la proteína se encuentra más compacta y de manera opuesta, un valor alto de Rg sugiere que la proteína se encuentra más extendida (Figura 8).

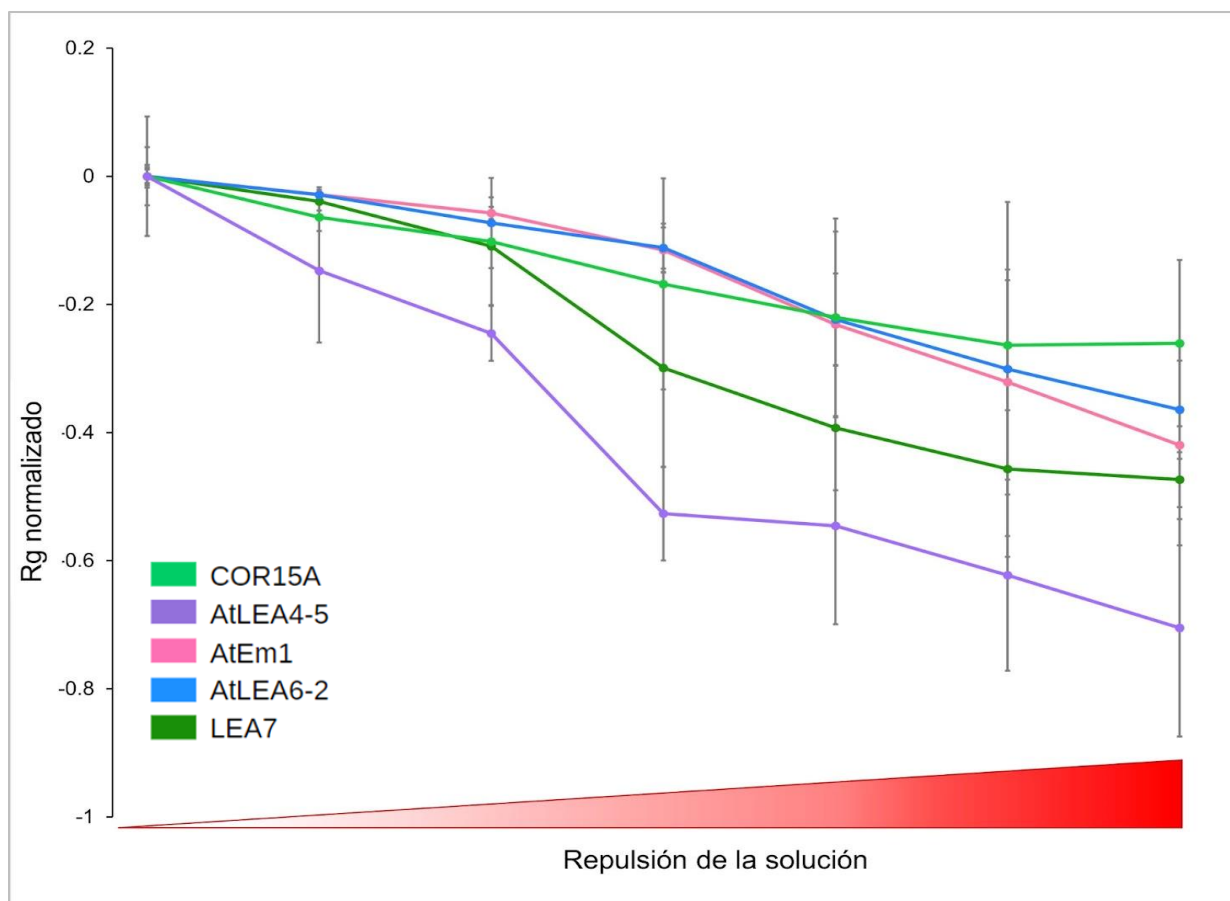


Figura 8. Caracterización estructural *in silico* de las 5 proteínas LEA seleccionadas mediante SSS *in silico*. El radio de giro normalizado (Rg) de las proteínas LEA se muestra de distintos colores. En el eje x se muestra de color rojo la repulsión de la solución (de baja a alta repulsión de la solución de la cadena polipeptídica). Media \pm DE $n = 5$ simulaciones independientes.

Como se observa en la Figura 8, al obtener los valores de Rg modulando la repulsión de la solución para las 5 proteínas LEA seleccionadas, no encontramos diferencia significativa entre los valores de Rg obtenidos. Dicho de otra manera, la sensibilidad estructural *in silico* de estas proteínas LEA es similar en un entorno en el que incrementa la repulsión de la solución.

Determinación de la sensibilidad estructural *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas.

Para obtener una amplia caracterización de la sensibilidad estructural de las proteínas LEA seleccionadas en un contexto *in vitro*, utilizamos la metodología SSS *in vitro*. Para ello se expresaron y purificaron independientemente las 5 proteínas recombinantes fusionadas a un par FRET (mTurquoise2 y mNeonGreen).

Esta metodología, nos permitió someter a las proteínas LEA a 21 osmolitos distintos y a distintas concentraciones. En función de un parámetro definido como " χ " logramos revelar el grado de compactación o expansión de las proteínas LEA en relación con una referencia (repetidos de Gly-Ser de longitud equivalente). En este sentido, valores negativos de χ indican que la proteína LEA en cierta condición, se encuentra compacta. Contrariamente, cuando los valores de χ eran positivos mostraban que la proteína LEA en cierta condición se encuentra expandida (Figura 9).

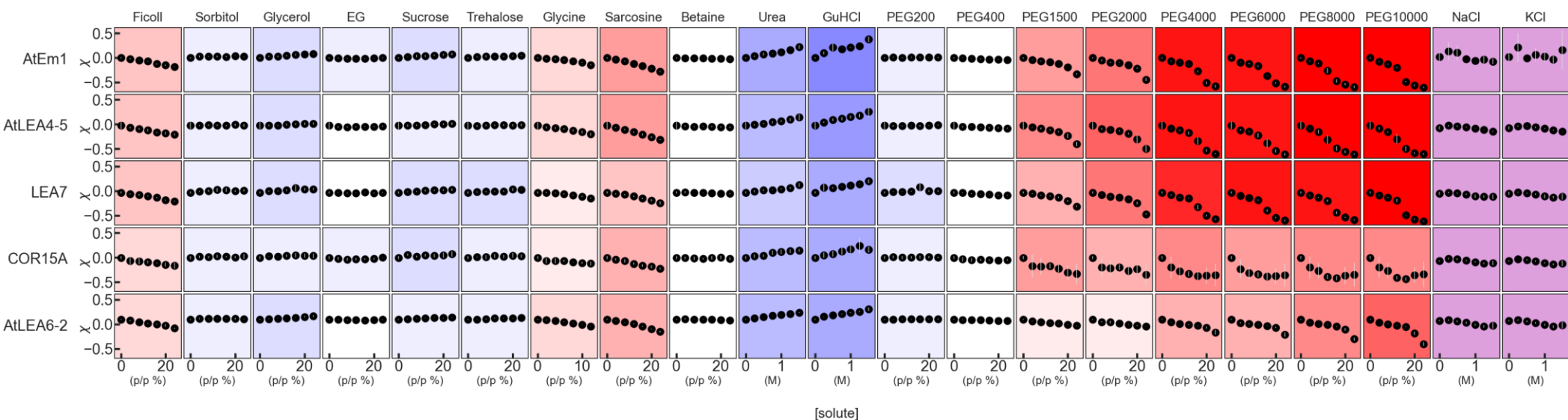


Figura 9. SSS *in vitro* de las 5 proteínas LEA seleccionadas. Cada punto de datos muestra el valor de χ frente a la concentración de cada osmolito específico probado para cada proteína LEA. El color de fondo representa la sensibilidad del cambio a la adición del osmolito. Los colores más intensos indican una mayor sensibilidad y los menos intensos una menor sensibilidad. Los tonos rojos indican compactación y los tonos azules indican expansión de las proteínas LEA al osmolito expuesto. El fondo morado indica un comportamiento no monótono. El fondo blanco indica que no hay un cambio significativo.

Contrario a lo que esperábamos, a pesar de las diferencias en las características fisicoquímicas de las proteínas LEA seleccionadas, su sensibilidad estructural fue muy similar en la mayoría de los osmolitos probados. Por ejemplo, a medida que las concentraciones de Ficoll, Glicina y Sarcosina aumentaban, el valor de χ adquiere valores menores a cero, indicando que ante estos osmolitos las proteínas LEA seleccionadas se compactan más que el linker de G-S de tamaño equivalente (Figura 9).

En un entorno con agentes desnaturalizantes como urea y cloruro de guanidinio (GuHCl), a medida que las concentraciones de estos incrementaron, el valor de χ adopta valores mayores a cero, indicando que las proteínas LEA se expanden más que el linker G-S de tamaño equivalente (Figura 9).

Al probar sales como NaCl y KCl para la proteína AtEM1 se observó un comportamiento no monótono, es decir, el valor de χ adopta valores crecientes y decrecientes, pero esto no se relaciona linealmente con el aumento en la concentración de estos osmolitos. Para el resto de las proteínas seleccionadas este comportamiento se replicó, pero el incremento y decaimiento en el valor de χ fue muy sutil (Figura 9).

En osmolitos como sorbitol, glicerol, etilenglicol, trehalosa y PEG200, el valor de χ que adquieren las proteínas LEA seleccionadas es similar al de su referencia, lo cual muestra que ante estos osmolitos la estructura de las proteínas LEA es poco sensible. En osmolitos como betania y PEG400 el valor de χ de las proteínas LEA seleccionadas no cambió en relación con el valor obtenido para los repetidos de Gly-Ser de longitud equivalente, dicho de otro modo, ante estos osmolitos la estructura de las proteínas LEA es insensible (Figura 9).

En conjunto, estos resultados muestran que al menos *in vitro*, las proteínas LEA seleccionadas presentan una sensibilidad estructural similar en 15 de los 21 osmolitos probados. Sin embargo, en entornos con PEG 1500, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000, el comportamiento de AtLEA6-2 y COR15A fue diferente al de las otras proteínas LEA seleccionadas (Figura 9). El decaimiento (valores negativos) en el valor de χ fue más

dramático para COR15A en relación con su referencia y en relación con el resto de las proteínas LEA. Esto nos permitió inferir que la proteína COR15A en estas condiciones, se compacta más y es más sensible que el resto de las proteínas LEA seleccionadas.

En contraste, el decaimiento en el valor de χ para la proteína AtLEA6-2 fue menor en relación con su referencia y menor que el valor de χ obtenido para el resto de las proteínas LEA (Figura 9). Esto indica que la proteína AtLEA6-2 se compacta menos y por tanto, su estructura es menos sensible o resistente ante un ambiente de amontonamiento macromolecular simulado con PEG de alto peso molecular.

Determinación de la sensibilidad estructural *in vivo* de las proteínas LEA seleccionadas.

Con el propósito de determinar la sensibilidad estructural *in vivo* de las proteínas LEA pertenecientes a nuestro grupo representativo, células de levadura vivas que expresaban independientemente las construcciones de las proteínas LEA seleccionadas fueron expuestas a un ambiente de choque osmótico con NaCl a distintas concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 M).

Mediante el uso de FRET (*transferencia de energía de resonancia de Förster*), los niveles de sensibilidad estructural fueron cuantificados mediante el cambio en la razón de FRET. Dicha razón se obtuvo dividiendo la emisión de fluorescencia del aceptor (mTQ2) a 474 nm entre la emisión de fluorescencia del aceptor (mNG) 505 nm (DxAm/DxDm) (Figura 10).

Como se observa en la Figura 10, no encontramos diferencias en el cambio de la razón FRET que experimentan las células de levadura que expresan las proteínas LEA seleccionadas ante el choque osmótico ocasionado por NaCl.

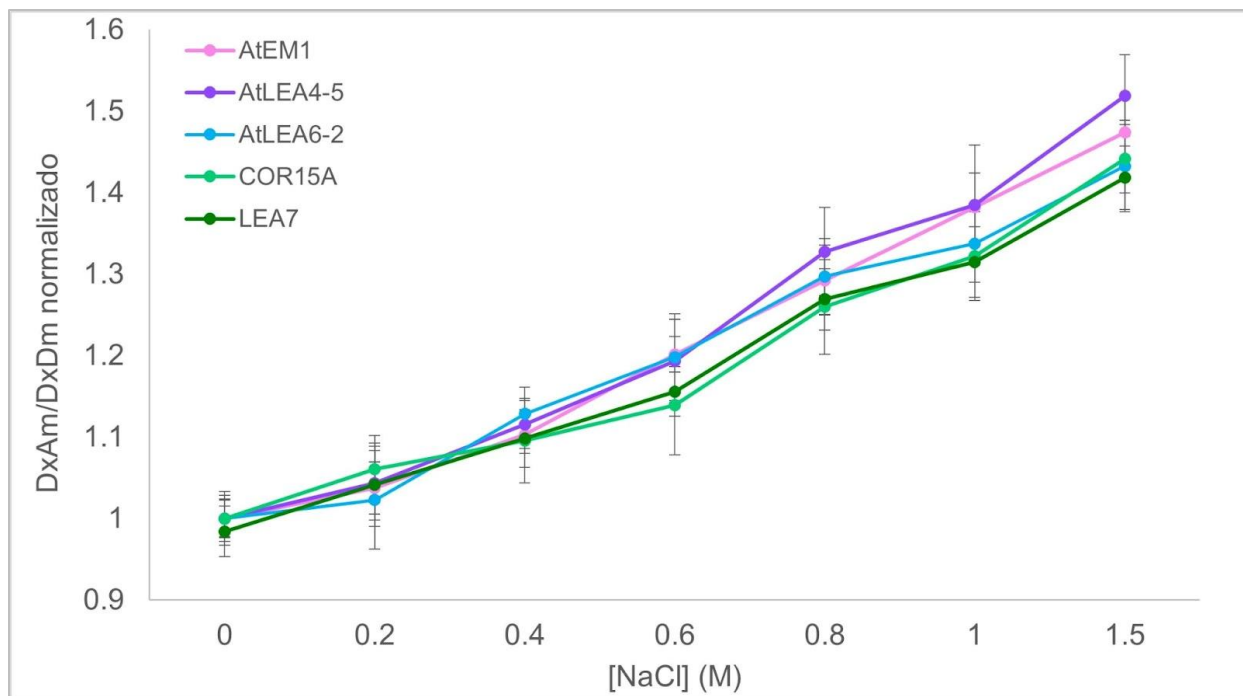


Figura 10. Cambio de la razón FRET (DxAm/DxDm) normalizado en condiciones de choque hiperosmótico en levaduras. Se muestra el cambio en la razón de FRET (DxAm/DxDm) de las células de levadura vivas que expresan a las construcciones de las proteínas LEA del grupo selecto. Las células se trataron con (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 M de NaCl). Cada tratamiento se midió por triplicado y se realizaron 3 mediciones independientes para cada construcción. Se muestran las medias \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Determinación de la estructura secundaria *in vitro* de proteínas LEA seleccionadas en solución y bajo condiciones de amontonamiento macromolecular

Para determinar si la compactación estructural de las proteínas LEA observada en SSS *in vitro* era resultado de la capacidad de adquirir estructura secundaria, realizamos la purificación de las proteínas LEA recombinantes sin etiquetas fluorescentes, como se describió en la sección de materiales y métodos (Figura 11). Posteriormente, para confirmar la identidad de las muestras purificadas, se realizó la identificación por huella peptídica (anexos). Logramos purificar las proteínas recombinantes AtEM, AtLEA4-5, AtLEA6-2 y LEA7 (Figura 11). Desafortunadamente, no logramos purificar a la proteína COR15A.

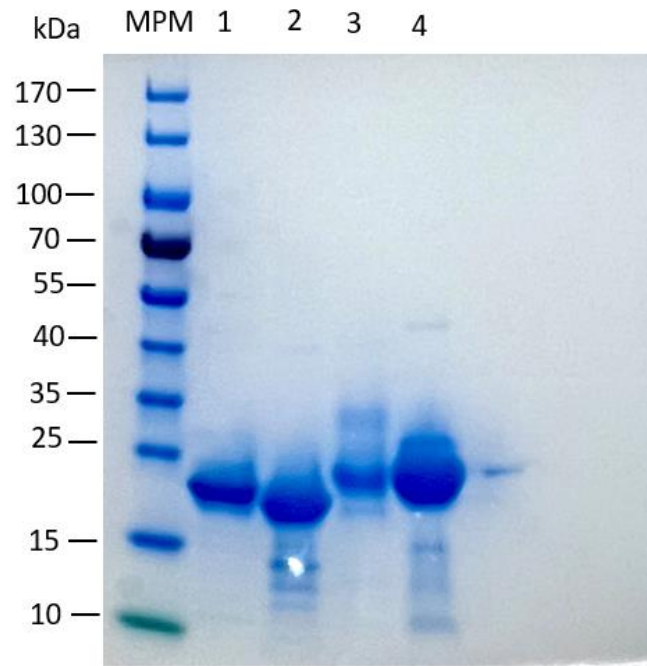


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE con las proteínas LEA recombinantes puras. Gel de gradiente 4-20% en condiciones reductoras. Carril 0: Marcador de peso molecular (kDa). Carril 1: proteína AtEM1 (16.61 kDa). Carril 2: proteína AtLEA4-5 (14.60 kDa). Carril 3: proteína AtLEA6-2 (8.48 kDa). Carril 4: proteína LEA7 (17.88 kDa).

Posteriormente, analizamos los niveles de estructura secundaria de las proteínas LEA seleccionadas en tres soluciones diferentes: Buffer 50 mM NaH_2PO_4 pH=8.0, PEG 3350 al 20% y PEG 8000 al 20%. Se optó por usar PEG de estas masas moleculares y al 20% para replicar las condiciones de SSS *in vitro*, en las que observamos que las proteínas COR15A presenta mayor sensibilidad estructural y la proteína AtLEA6-2 presenta menor sensibilidad estructural respecto al resto de las proteínas seleccionadas.

Mediante espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC), los espectros obtenidos se muestran en las Figuras 12, 15, 18 y 21, con el servidor Dichroweb cuantificamos los niveles de estructura secundaria en cada condición (Figuras 13, 16, 19 y 22).

Adicionalmente, con la finalidad de cuantificar los niveles de estructuras tipo hélice-alfa, consideramos el cociente R (Figuras 14, 17, 20 y 23).

Este cociente toma en cuenta el valor de elipticidad mayor a 222 nm y el valor de elipticidad menor a 205 nm.

$$R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{205}}$$

Cuando el cociente R adquiere valores entre 0.1 y 0.4, se considera que el tipo de hélice es predominantemente hélice 3_{10} . Los valores obtenidos en cada condición fueron graficados y se muestran en las Figuras 14, 17, 19 y 23.

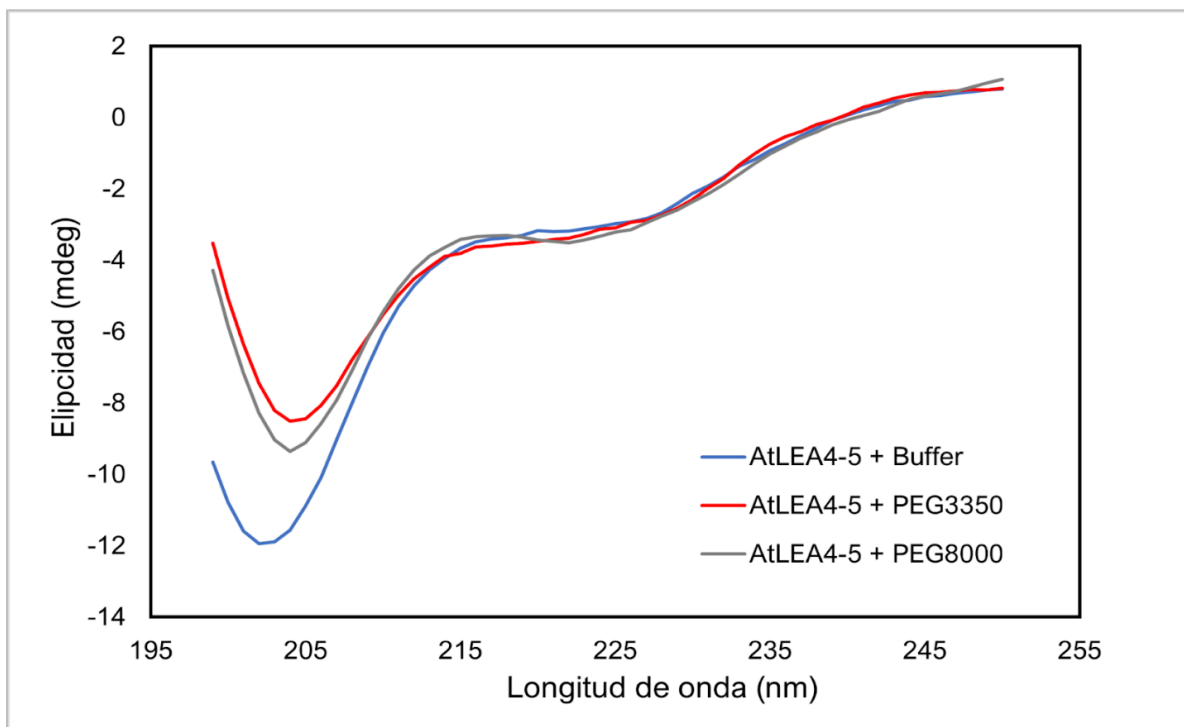


Figura 12. Espectro de DC de la proteína AtLEA4-5 en diferentes condiciones. Se muestra el espectro de la proteína AtLEA4-5 en buffer (color azul), PEG3350 (color rojo) al 20% y PEG8000 (color gris) al 20%.

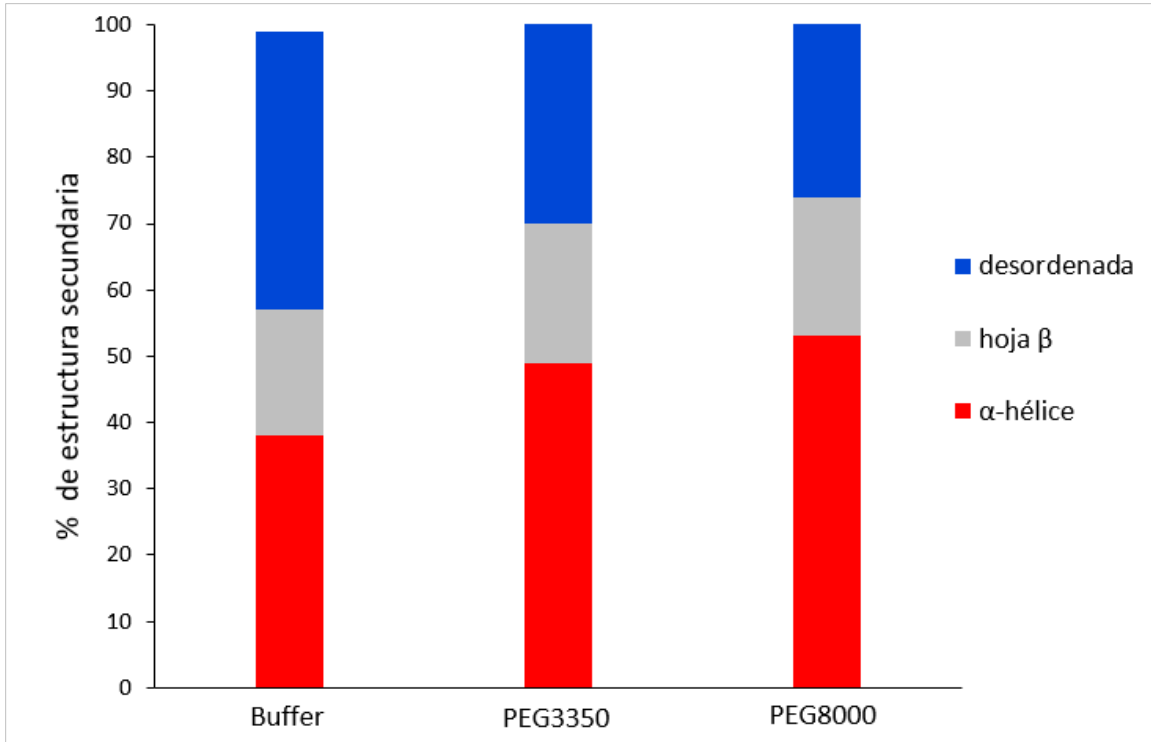


Figura 13. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína AtLEA4-5. Se muestran los porcentajes de estructura calculados por el servidor DichroWeb para la proteína AtLEA4-5.

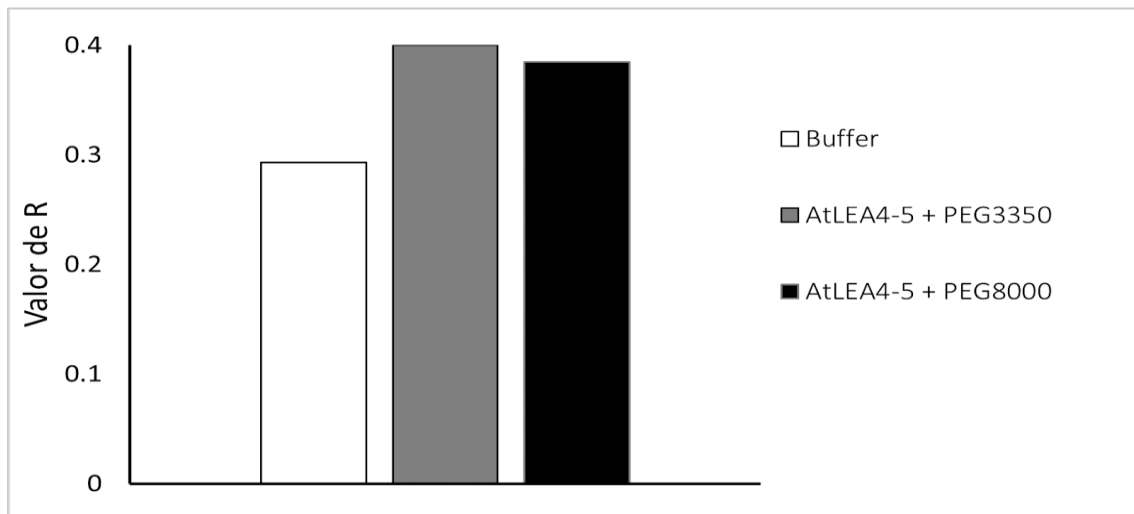


Figura 14. Cociente R calculado para la proteína AtLEA4-5 en diferentes condiciones. Se muestra el valor de R en 3 condiciones distintas: Buffer 50 mM NaH₂PO₄ pH=8.0 (color blanco), en PEG3350 al 20% (color gris) y PEG8000 al 20% (color negro).

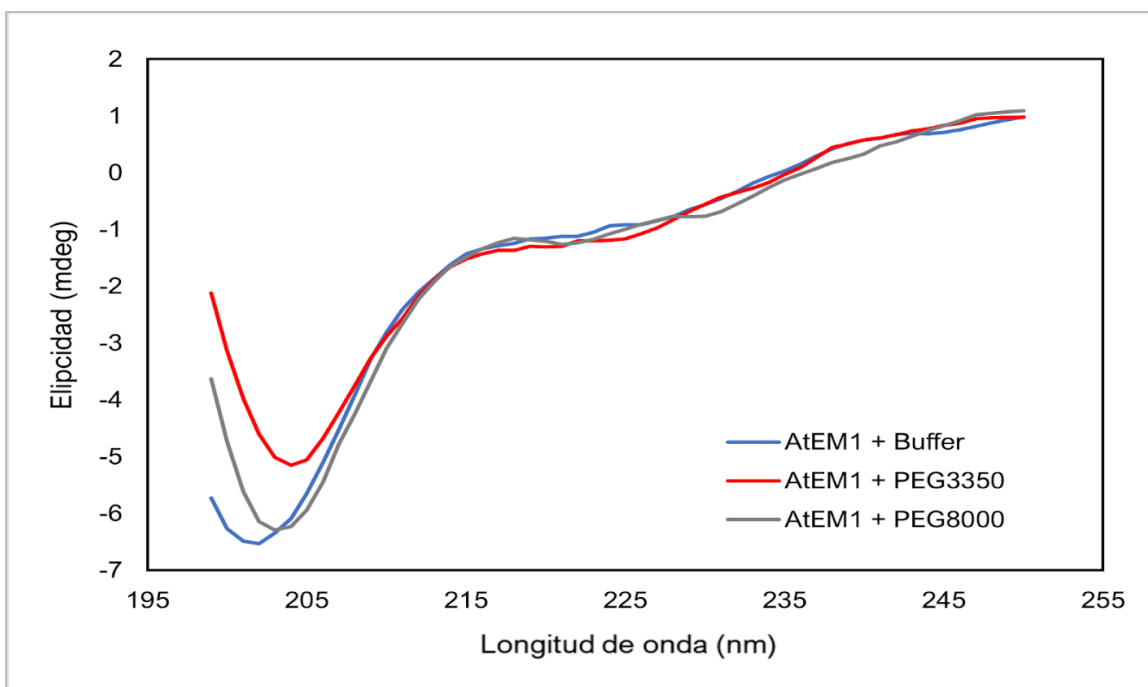


Figura 15. Espectro de DC de la proteína AtEM1 en diferentes condiciones. Se muestra el espectro de la proteína AtEM1 en buffer (color azul), PEG3350 (color rojo) al 20% y PEG8000 (color gris) al 20%.

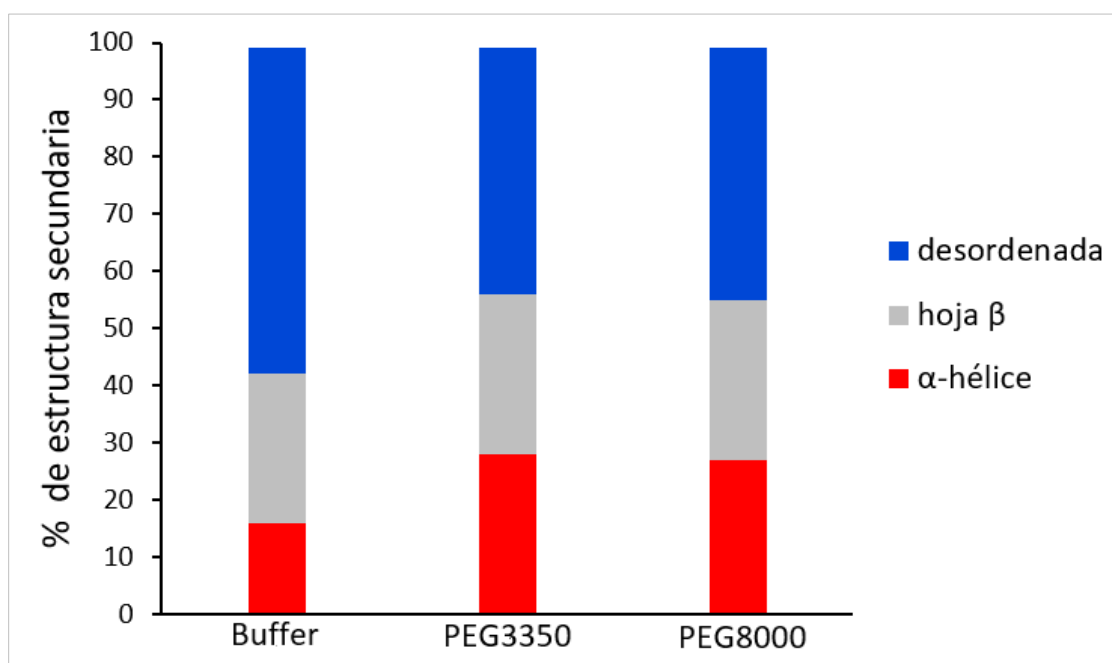


Figura 16. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína AtEM1. Se muestran los porcentajes de estructura calculados por el servidor DichroWeb para la proteína AtEM1.

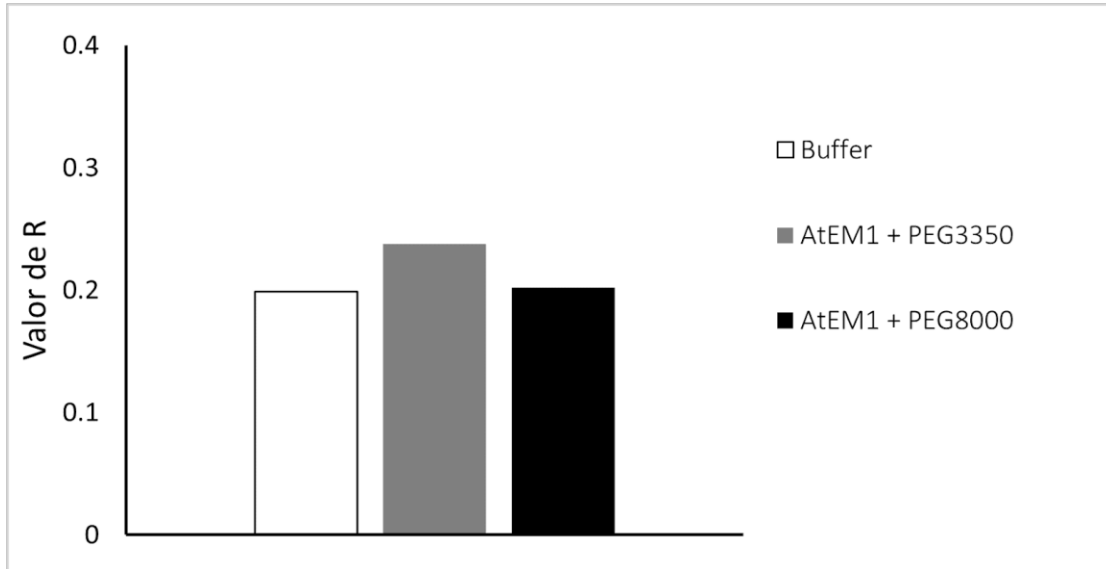


Figura 17. Cociente R calculado para la proteína AtEM1 en diferentes condiciones. Se muestra el valor de R en 3 condiciones distintas: Buffer 50 mM NaH₂PO₄ pH=8.0 (color blanco), en PEG3350 (color gris) al 20% y PEG8000 al 20% (color negro).

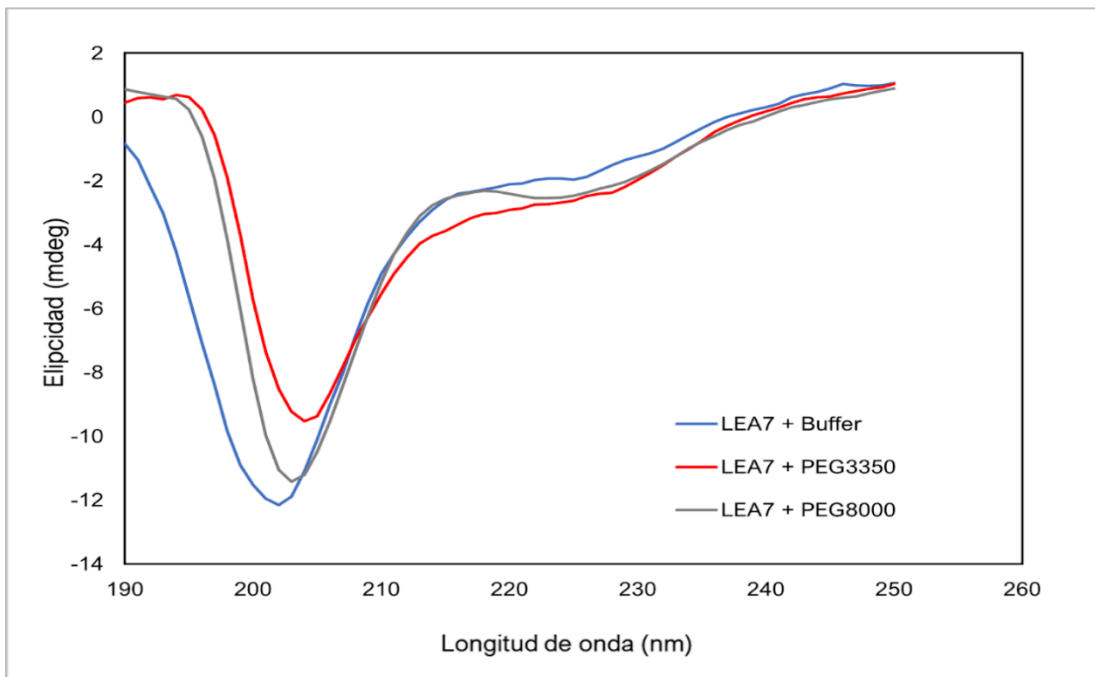


Figura 18. Espectro de DC de la proteína LEA7 en diferentes condiciones. Se muestra el espectro de la proteína LEA7 en buffer (color azul), PEG3350 al 20% (color rojo) y PEG8000 (color gris) al 20%.

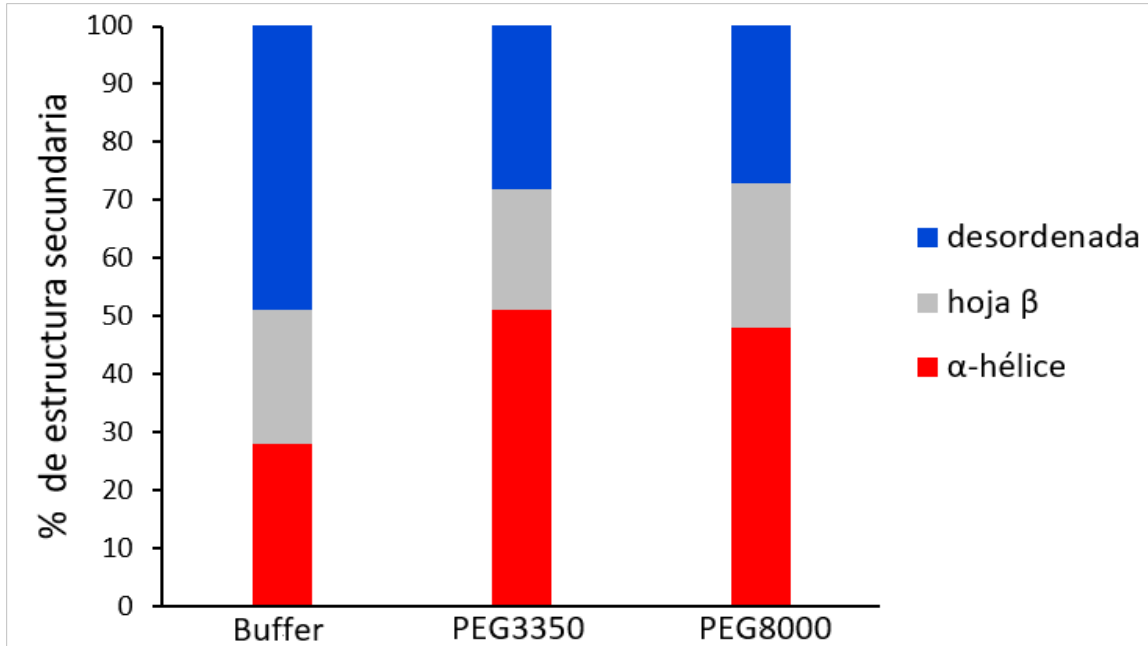


Figura 19. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína LEA7. Se muestran los porcentajes de estructura calculados por el servidor Dichroweb para la proteína LEA7.

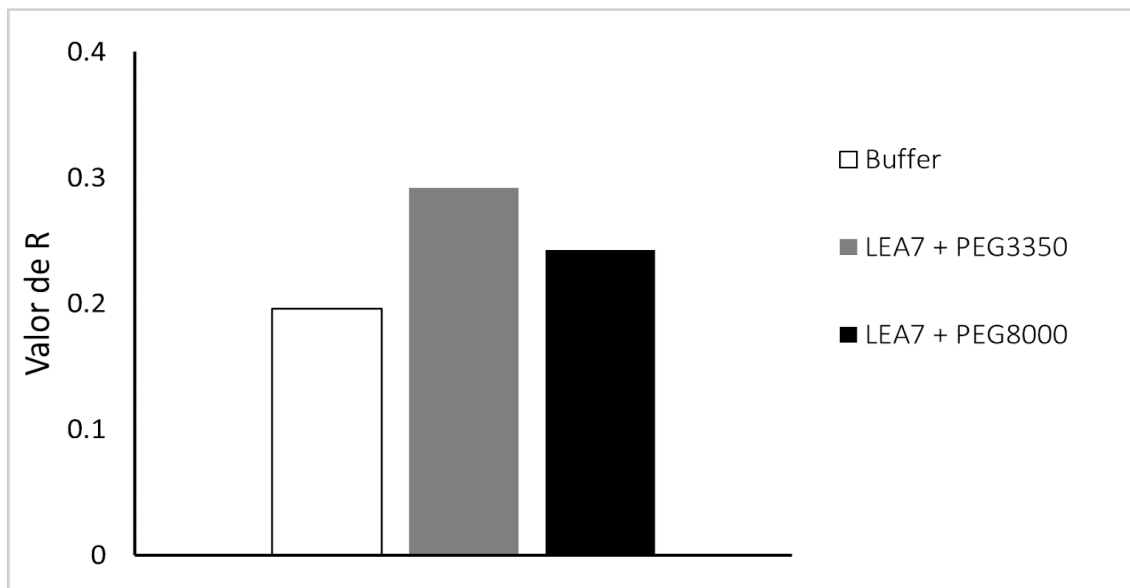


Figura 20. Cociente R calculado para la proteína LEA7 en diferentes condiciones. Se muestra el valor de R en 3 condiciones distintas: Buffer 50 mM NaH₂PO₄ pH=8.0 (color blanco), en polietilenglicol 3350 al 20% (color gris) y PEG8000 al 20% (color negro).

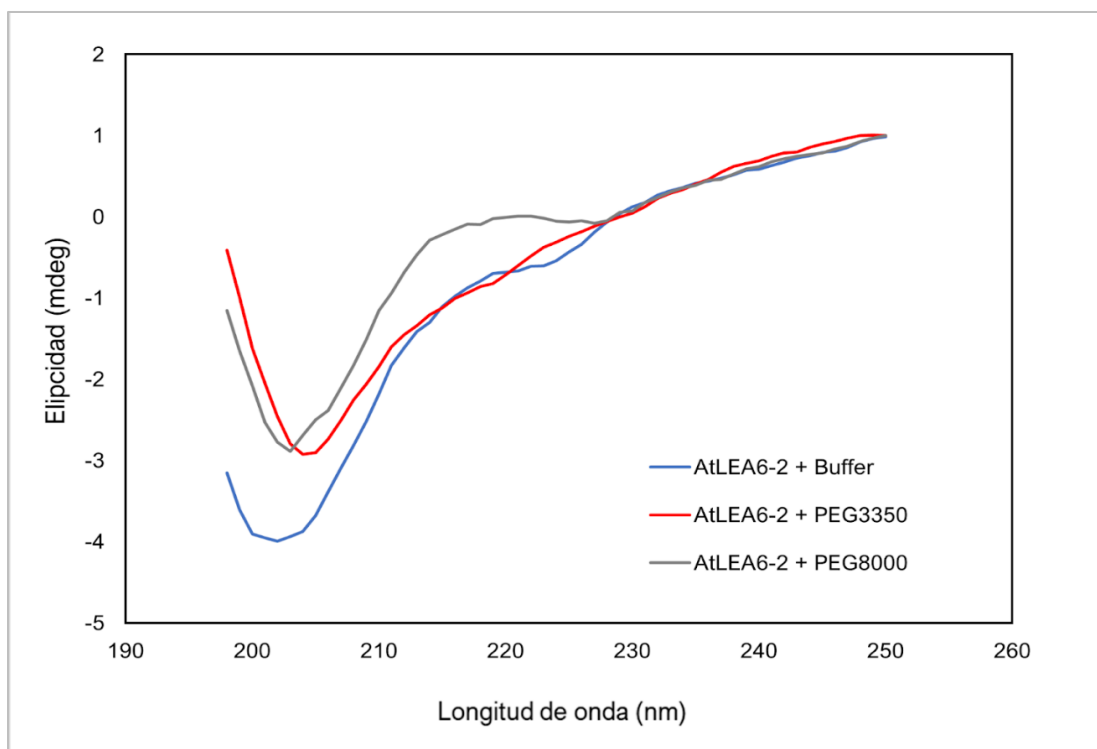


Figura 21. Espectro de DC de la proteína AtLEA6-2 en diferentes condiciones. Se muestra el espectro de la proteína AtLEA6-2 en buffer (color azul), PEG3350 al 20% (color rojo) y PEG8000 (color gris) al 20%.

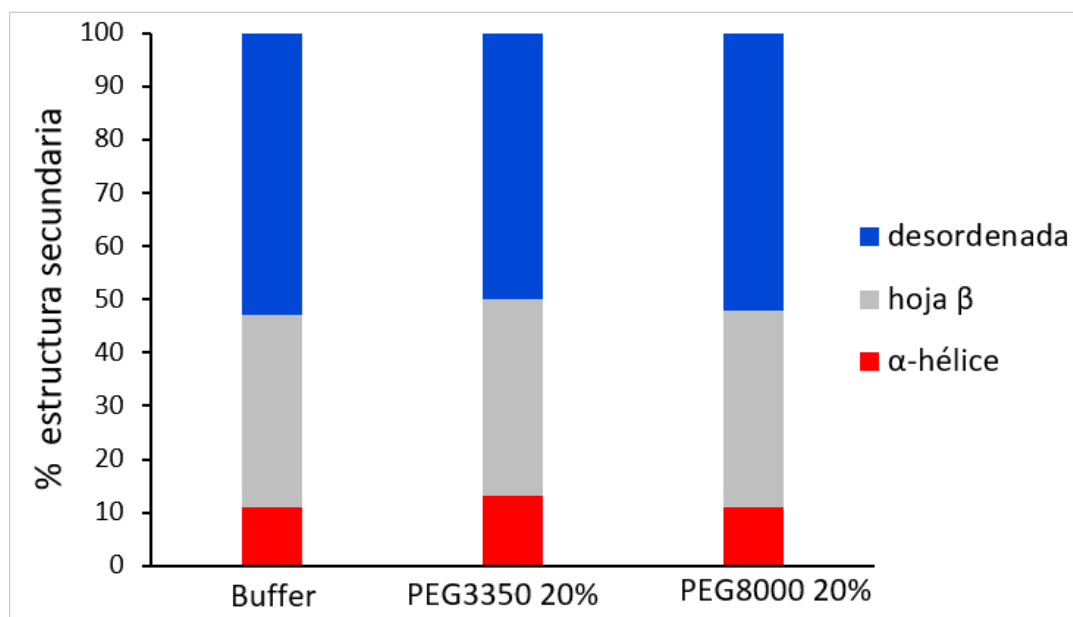


Figura 22. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína AtLEA6-2. Se muestran los porcentajes de estructura calculados por el servidor Dichroweb para la proteína AtLEA6-2.

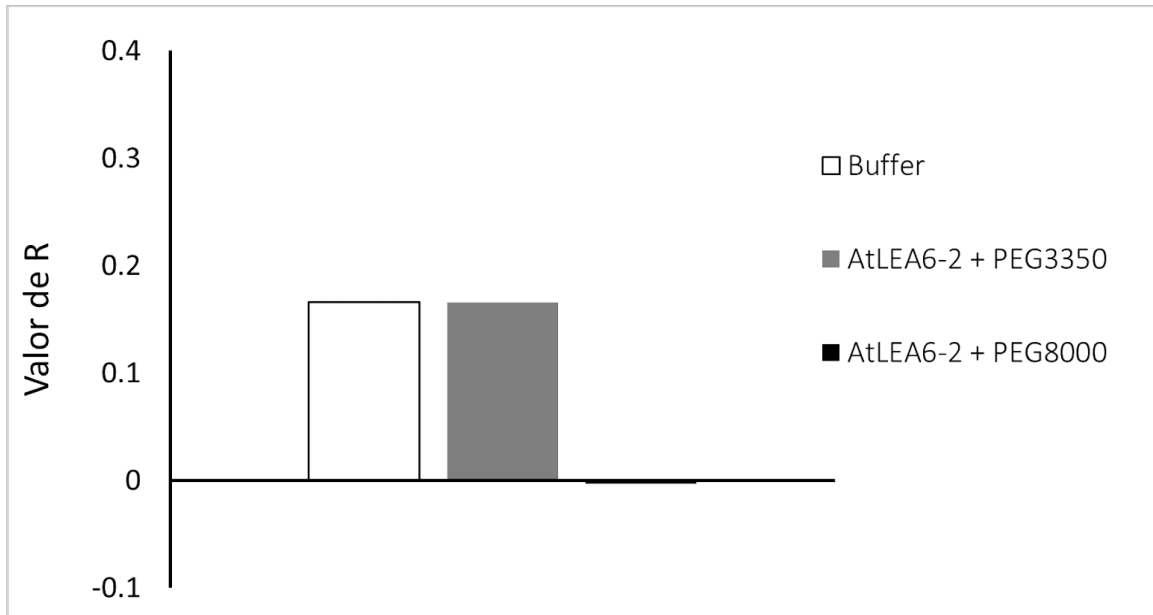


Figura 23. Cociente R calculado para la proteína AtLEA6-2 en diferentes condiciones. Se muestra el valor de R en 3 condiciones distintas: Buffer 50 mM NaH₂PO₄ pH=8.0 color blanco), en PEG3350 al 20% (color gris) y PEG8000 al 20% (color negro).

Estos resultados en conjunto muestran que las proteínas AtLEA4-5, LEA7 y AtEM1 experimentan cambios estructurales de desorden a hélice-alfa predominantemente, en un entorno de amontonamiento macromolecular simulado con PEG. Por el contrario, la estructura de la proteína AtLEA6-2 parece ser resistente a este entorno ambiental. Particularmente, la proteína AtLEA6-2 en PEG 3350 al 20% presentó una ganancia de estructura hélice-alfa únicamente del 2%. Pero en PEG 8000 al 20% no presentó ningún cambio estructural, es decir, permaneció desordenada. Estos resultados, concuerdan con lo anteriormente observado en el SSS *in vitro*.

Caracterización de la función protectora durante condiciones de desecación *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas

Con el fin de correlacionar la función protectora *in vitro* de las proteínas LEA seleccionadas, con su sensibilidad estructural, realizamos ensayos de actividad enzimática mediante el uso de la enzima reportera Lactato deshidrogenasa (LDH) del músculo de conejo. En presencia o ausencia de las proteínas LEA seleccionadas, la enzima LDH se sometió a desecación *in vitro*, logrando la pérdida de 98% del agua.

Las relaciones molares utilizadas de proteínas LEA y LDH fueron 1:1. El porcentaje de actividad máximo de la LDH fue considerado como la actividad de esta enzima antes de ser sometida a desecación. La actividad de la enzima LDH se midió mediante la disminución de absorbancia a 340 nm como resultado de la conversión de NADH a NAD⁺ (Figura 24).

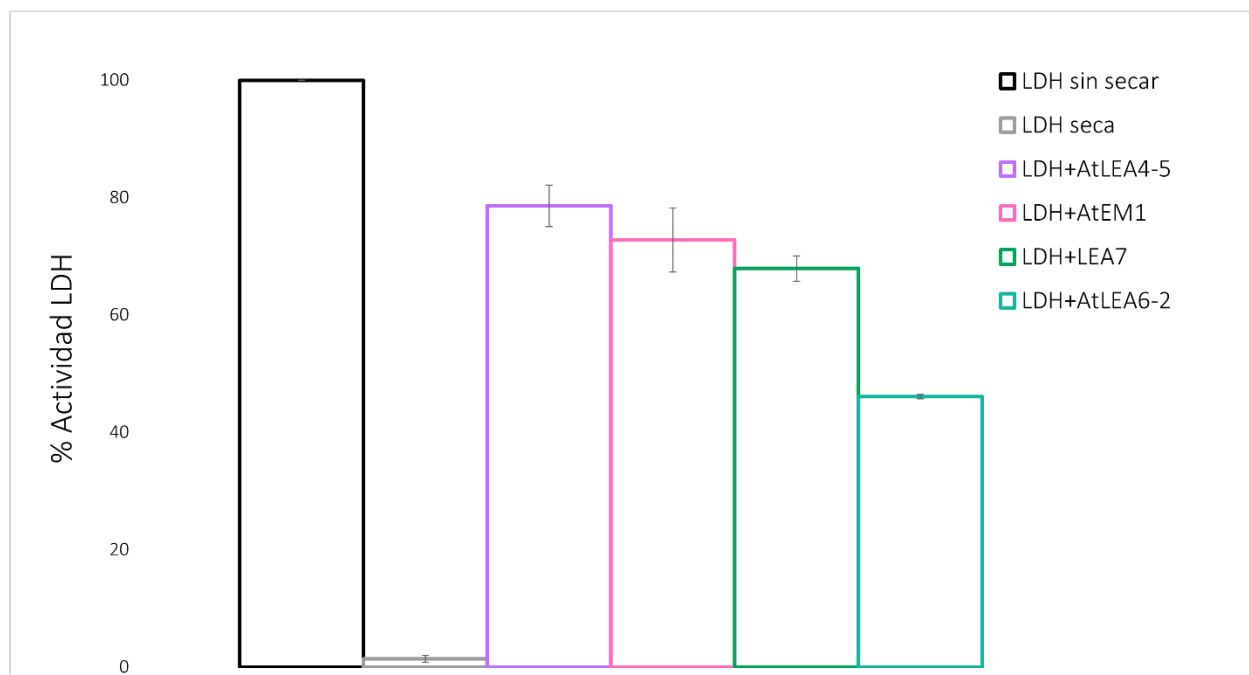


Figura 24. Porcentaje de la actividad enzimática de la LDH sometida a desecación. Se midió la actividad de la enzima LDH en presencia y ausencia de las proteínas LEA del grupo selecto purificadas utilizando una relación molar 1:1 (proteína LEA: LDH).

Como se observa en la figura 24, la actividad de la enzima LDH se pierde totalmente tras el tratamiento de desecación. La incubación con las proteínas AtLEA4-5, AtEM1 y LEA7 preservó la actividad de la enzima en un 80%, 72 % y 68% respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de protección de la proteína AtLEA6-2 fue menor que el de las otras proteínas LEA probadas, siendo únicamente del 46%, lo que sugiere una correlación entre la sensibilidad estructural y la función protectora en las proteínas LEA seleccionadas (Figura 24).

VII. DISCUSIÓN

Las proteínas LEA han sido consideradas como proteínas protectoras durante el estrés abiótico en plantas. La mayoría se predicen no estructuradas en un estado hidratado, pero en condiciones de deshidratación parcial o completa, congelamiento, amontonamiento macromolecular y alta osmolaridad experimentan un plegamiento predominantemente de hélice-alfa (Wang *et al.*, 2003). Se han sugerido varias funciones moleculares para estas proteínas, principalmente la estabilización de enzimas reporteras durante el secado y la congelación *in vitro*. Sin embargo, aún no está claro si se requiere que las proteínas LEA sufran un plegamiento estructural para llevar a cabo una función y si estas características pueden ser generalizadas a todas las proteínas LEA de distintos grupos.

Actualmente, existen pocos estudios en los que se incluyan varias proteínas LEA de distintos grupos en los análisis comparativos de estructura-función. Por esta razón, en el presente trabajo, se seleccionaron 5 proteínas LEA de *A. thaliana* de distintos grupos y, por tanto, distintas características en su secuencia. Con la finalidad de esclarecer si la sensibilidad estructural de las proteínas LEA ante cambios en su entorno está relacionada con su función.

In silico, mediante el uso de la metodología el escaneo del espacio de solución (SSS, *Solution Space Scanning*) logramos modular la repulsión del solvente para cada una de las secuencias de las proteínas LEA del grupo selecto. Posteriormente, usando la biblioteca de Python MDtraj se calculó el Radio de giro (Rg) de cada proteína LEA. El Rg es una manera de medir la compactación de la estructura de la proteína: un valor bajo de Rg sugiere que la proteína se encuentra más compacta y de manera opuesta, un valor alto de Rg sugiere un comportamiento más relajado. Modulando la repulsión del solvente de las proteínas LEA seleccionadas, los valores de Rg fueron muy similares. Denotando que la sensibilidad estructural *in silico* de las proteínas LEA es semejante. Esto suscita una pregunta respecto a si la información obtenida mediante SSS *in silico* es inherente a una familia de proteínas o es particular de cada proteína y si los homólogos de proteínas LEA tendrán el mismo patrón dinámico (Fernández *et al.*, 2023).

No obstante, como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, las proteínas LEA son intrínsecamente desordenadas y a diferencia de las proteínas globulares, carecen de una estructura terciaria bien definida. Al comparar el comportamiento de las proteínas LEA en SSS *in silico*, con el comportamiento de una de las proteínas globulares más estudiadas (el dominio B1 de la proteína G).

Resulta que, en una solución repulsiva, el valor de R_g de las proteínas LEA adopta valores altos, lo que indica que se encuentran extendidas. Pero en las mismas condiciones, el dominio B1 de la proteína G se encuentra compacto y estable. En una solución atractiva, el valor de R_g de las proteínas LEA adopta valores pequeños, indicando que se compacta mientras que el dominio B1 de la proteína G, se encuentra expandido y se desestabiliza (Guseman, 2017). Esta comparación, destaca que la sensibilidad estructural de las proteínas LEA es única y diferencial respecto a las proteínas globulares.

La evaluación *in vitro* de la sensibilidad estructural de las proteínas LEA seleccionadas utilizando SSS nos permitió someter a estas proteínas a distintos entornos fisicoquímicos. Probamos un total de 21 entornos físicoquímicos distintos, a distintas concentraciones para cada proteína LEA y por triplicado.

Dentro de los osmolitos utilizados, incluimos algunos estabilizadores, desnaturalizantes, polímeros, sales y aminoácidos libres. En función del valor de χ y en relación con una referencia, determinamos los niveles de compactación y expansión de las proteínas LEA en los entornos probados.

Nos sorprendió que en 15 de los 21 osmolitos, a pesar de las diferencias a nivel de secuencia de las proteínas LEA, todas mostraron una sensibilidad estructural similar. No obstante, en un ambiente que simula amontonamiento macromolecular *in vitro* con PEG, la proteína COR15A mostró una mayor compactación estructural respecto a las demás, siendo estructuralmente más sensible, contrariamente la proteína AtLEA6-2 mostró ser menos sensible, ya que presentó una menor compactación estructural respecto a las demás.

Con base en esto, nos preguntamos si los niveles de compactación de las proteínas LEA estaban relacionados con su capacidad de plegarse en estructuras hélice-alfa en condiciones de amontonamiento macromolecular simuladas con PEG. Para responder este cuestionamiento realizamos una caracterización de la estructura secundaria de estas proteínas purificadas mediante dicróismo circular en solución acuosa y en PEG. Utilizamos PEG de masa molecular 3350 y 8000 al 20%, para imitar las condiciones del ensayo SSS *in vitro*. Las proteínas AtEM1, AtLEA4-5 y LEA7 presentaron un incremento en la formación de estructura secundaria, primordialmente hélice-alfa en PEG. Por el contrario, la proteína AtLEA6-2 presentó un incremento en la formación de estructura hélice-alfa en PEG3350 únicamente del 2%. Y en PEG8000 no incrementó el porcentaje de la formación de hélice-alfa. Con estos resultados, inferimos que la estructura de la proteína AtLEA6-2 no es sensible en un entorno de amontonamiento macromolecular simulado con PEG. La caracterización de la estructura secundaria de la proteína COR15A no fue posible, debido a que no logramos expresarla. Ante esto, realizamos algunas modificaciones en el protocolo de expresión que utilizamos para el resto de las proteínas LEA seleccionadas. Intentamos optimizar algunos parámetros de crecimiento y expresión independientes. Uno de ellos fue la temperatura de inducción, probamos con 4°C, 15°C, 24°C, 32°C y 37°C, otro fue el tiempo de inducción, probamos por 2 hrs, 4hrs, 16 hrs, 24 hrs y 48 hrs. Finalmente, modificamos la concentración de IPTG, probamos 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM. Pero no tuvimos éxito en ninguno de los casos (Singh, 2020; Graether, 2018). Adicionalmente, la proteína COR15A posee una secuencia señal N-terminal para la importación de cloroplastos, razón por la que, en algunos reportes su expresión adecuada requiere que la secuencia de ADNc que codifica para la proteína COR15A madura, se amplifique mediante PCR y se inserte en un vector de expresión Gateway pENTR.SD.D-TOPO. Además, la construcción pDEST17.COR15A se transforma en la cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Tomando en cuenta estos antecedentes, actualmente nos encontramos expresando dicha proteína en la cepa de *E. coli* Rosetta sin escindir la secuencia señal N-terminal y parece ser una opción de expresión más adecuada (Thalhammer, 2010).

Con los porcentajes de estructura secundaria obtenidos, calculamos el cociente R. Las proteínas AtLEA4-5, AtEM1 y LEA7, en buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH=8.0) adquieren valores en un rango de (0.1-0.4), que corresponde a una estructura hélice 3₁₀. Sin embargo, en PEG3350 y PEG8000 al 20% el valor de R incrementó. Esto resulta interesante ya que se ha propuesto que las hélices 3₁₀ pueden ser una conformación intermedia entre la formación y el despliegue de una estructura hélice-alfa (Viera, 2010). De esta manera, el incremento en los valores del cociente R, nos podría proporcionar información sobre el inicio del plegamiento hélice-alfa.

Por otra parte, los valores de R calculados para la proteína AtLEA6-2 en buffer también corresponden a estructuras hélice 3₁₀ y este valor se conserva tras la exposición a PEG3350 al 20%. Sin embargo, en PEG8000 al 20% el valor de R tuvo valores negativos. Esto podría sugerir que la poca sensibilidad estructural observada en SSS *in vitro* de la proteína AtLEA6-2, se debe a que no es capaz de incrementar el plegamiento de hélice-alfa y permanece desordenada.

Comparando nuestros resultados con un estudio previo en el que determinaron la sensibilidad estructural de una proteína del grupo PvLEA18, encontramos que a diferencia de nosotros, ellos sí observaron que en la exposición de agentes de hacinamiento como PEG la proteína del grupo PvLEA18 mostró una ganancia de estructura hélice-alfa, aunque en pequeña medida. Sin embargo, cabe resaltar que los autores utilizaron concentraciones de PEG mayores al 20%. Lo cual sugiere que las proteínas PvLEA18 de *A. thaliana* podrían requerir condiciones más extremas de amontonamiento macromolecular para modular su estructura y refuerza lo que nosotros concluimos; la estructura de la proteína AtLEA6-2 respecto a las proteínas LEA de otros grupos, es menos sensible (Rivera-Nájera *et al.*, 2014).

La gran mayoría de la evidencia experimental sobre la sensibilidad estructural de proteínas LEA proviene de experimentos *in vitro*, siendo la información sobre esta característica de las proteínas LEA *in vivo* limitada (Brown, 2020).

Tomando en cuenta esto, en el presente trabajo, optamos por caracterizar también la sensibilidad estructural de las proteínas LEA seleccionadas *in vivo*, expresándolas en

levadura (*S. cerevisiae*). Dicha caracterización se realizó mediante la obtención del cambio en la razón de FRET (DxAm/DxDm) de las células de levadura vivas que expresaron las construcciones de las proteínas LEA del grupo selecto, sometidas a estrés osmótico con NaCl. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores del cambio en la razón FRET de las proteínas LEA probadas.

Tiene sentido que no hayamos observado diferencias en la sensibilidad estructural *in vivo* ya que es mucho más complejo que un contexto *in vitro*. En un ambiente celular, las proteínas LEA seleccionadas no sólo están expuestas al estrés osmótico inducido con NaCl, también interactúan con altas concentraciones de macromoléculas y andamios celulares que podrían contribuir a su modulación estructural. Por lo que resulta difícil realizar una relación directa de nuestros hallazgos *in vitro* a un contexto fisiológico (Shou, 2019).

Con la intención de simular en un contexto *in vitro* lo que podría estar ocurriendo *in vivo*, Rivera-Nájera *et al.* en 2014 determinaron la estructura secundaria mediante dicroísmo circular de una proteína LEA del grupo PvLEA18, sometiendo a esta proteína a dos osmolitos, glicerol y PEG, para simular condiciones de baja disponibilidad de agua y amontonamiento macromolecular, respectivamente. Sin embargo, no observaron cambios significativos adicionales a los observados con PEG solamente sobre la estructura de esta proteína. Lo cual podría sugerirnos que el cambio en la estructura secundaria de las proteínas LEA se debe principalmente al amontonamiento macromolecular y, dado que dentro de las células existen diversos iones, osmolitos, macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, el cambio estructural de las proteínas LEA en general, podría ser similar (Rivera-Nájera, 2014).

Finalmente, con la intención de encontrar una correlación respecto al cambio estructural de las proteínas LEA y su función, retomamos la evidencia que se ha acumulado respecto a que una de las funciones de las proteínas LEA es estabilizar y preservar la actividad enzimática de enzimas modelo *in vitro*, después de la desecación (Goyal *et al.* 2005; Reyes *et al.*, 2008). El ensayo más utilizado para probar esta función de las proteínas LEA, consiste en medir la actividad de algunas enzimas reporteras como la enzima

lactato deshidrogenasa (LDH) que bajo condiciones de desecación forma agregados insolubles, pero la agregación de esta enzima reduce notablemente en presencia de proteínas LEA (Pouchkina *et al.* 2007 ; Kovacs *et al.* 2008).

Mediante ensayos de desecación, se observó que AtLEA4-5 y AtEM1 tienen una capacidad mayor de estabilizar a la la enzima LDH que AtLEA6-2, acorde a la medición de su actividad enzimática que fue casi dos veces menor en presencia de esta última. Lo cual, es consistente con lo que se ha reportado en la literatura, es decir, que la función de las proteínas LEA no es universal, e incluso pares de proteínas LEA muy similares pueden llevar a cabo tareas muy diferentes *in vitro* (Pouchkina *et al.*, 2007). Además, mediante estudios de deshidratación *in vitro* se muestra que algunos miembros del grupo PvLEA18 de las proteínas LEA, como la AtLEA6-2 no desempeñan un papel protector contra la inactivación de enzimas reporteras, lo que se sugiere que puedan existir blancos distintos para este grupo particular de proteínas (Reyes *et al.*,2005).

Estos resultados en conjunto nos permitieron proponer una posible relación entre la sensibilidad estructural de las proteínas LEA en respuesta a un entorno de amontonamiento macromolecular *in vitro* y su función protectora. Ahora, surge la necesidad de comprender qué diferencias a nivel de secuencia primaria determinan que unas proteínas LEA tengan una menor sensibilidad estructural *in vitro* y una menor capacidad protectora, en contraste con aquellas que presentan una mayor sensibilidad estructural *in vitro* y una mayor capacidad protectora.

IX. CONCLUSIONES

En el presente estudio, logramos caracterizar la sensibilidad estructural de un grupo de 5 proteínas LEA de *A. thaliana* con distintas características codificadas en su secuencia. La caracterización de la sensibilidad estructural se realizó *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Aunque *in silico* e *in vivo* no observamos diferencias en los niveles de sensibilidad de las proteínas LEA seleccionadas, *in vitro*, logramos identificar que la proteína COR15A es la más sensible y la proteína AtLEA6-2 la menos sensible ante un entorno que simula condiciones de amontonamiento macromolecular con PEG.

Adicionalmente, la proteína AtLEA6-2 fue la proteína que tuvo una menor capacidad protectora, lo que nos lleva a inferir la existencia de una correlación entre el nivel de sensibilidad estructural al ambiente de proteínas LEA y su capacidad protectora al menos en un contexto *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a entender como la sensibilidad estructural de las proteínas desordenadas en respuesta a cambios en su entorno se relaciona con su función protectora, lo que puede tener un impacto en diversas áreas de la bioquímica, biofísica de proteínas y biotecnología.

X. PERSPECTIVAS

- Expresar la proteína COR15A en otra cepa de *E.coli* para expresar proteínas heterólogas y purificarla.
- Determinar la propensión a formar hélice-alfa de la proteína COR15A y su capacidad protectora *in vitro*.
- Determinar cuáles son las diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos que determinan una mayor y menor flexibilidad estructural.
- Probar la capacidad protectora de las proteínas LEA seleccionadas sobre otras enzimas reporteras bajo condiciones de desecación.
- Realizar una estandarización del cambio de la razón de FRET de los repetidos de Gly-Ser expresados en células de levadura para realizar una comparación más justa del comportamiento de las proteínas LEA *in vivo*.
- Determinar la estructura secundaria de las proteínas LEA seleccionadas en concentraciones más altas de PEG (3350 y 8000), por ejemplo, al 45%.

XI. REFERENCIAS

Artur, M. A. S., Rienstra, J., Dennis, T. J., Farrant, J. M., Ligterink, W., & Hilhorst, H. (2019). Structural plasticity of intrinsically disordered LEA proteins from *Xerophyta schlechteri* provides protection in vitro and in vivo. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1272. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01272>

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, *148*(1), 6-24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>

Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., & Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *67*(1-2), 107-124. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9304-x>

Boswell, L. C., Menze, M. A., & Hand, S. C. (2014). Group 3 late embryogenesis abundant proteins from embryos of *Artemia franciscana*: structural properties and protective abilities during desiccation. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, *87*(5), 640-651. <https://doi.org/10.1086/676936>

Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F. A., Rogniaux, H., Larré, C., Satour, P., & Leprince, O. (2006). Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, *140*(4), 1418-1436. <https://doi.org/10.1104/pp.105.074039>

Bremer, A., Wolff, M., Thalhammer, A., & Hinch, D. K. (2017). Folding of intrinsically disordered plant LEA proteins is driven by glycerol-induced crowding and the presence of membranes. *The FEBS Journal*, *284*(6), 919-936. <https://doi.org/10.1111/febs.14023>

Chemes, L. B., Alonso, L. G., Noval, M. G., & de Prat-Gay, G. (2012). Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains. *Methods in*

Molecular Biology (Clifton, N.J.), 895, 387-404. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-927-3_22

Cuevas-Velazquez, C. L., Saab-Rincón, G., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2016). The unstructured N-terminal region of Arabidopsis group 4 late embryogenesis abundant (LEA) proteins is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(20), 10893-10903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720318>

Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., & Bansal, K. C. (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from Brassica napus plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology*, 139(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.014>

Denes Kovacs, Eva Kalmar, Zsolt Torok, Peter Tompa. (2008). Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins, *Plant Physiology*, volumen 147, número 1, páginas 381–390. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118208>

Drira, M., Saibi, W., Brini, F. et al. (2013). Los segmentos K de la deshidrina de trigo DHN-5 son esenciales para la protección de las actividades in vitro de lactato deshidrogenasa y β -glucosidasa. *Mol Biotechnol* 54, 643–650. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9606-8>

Dure, L., & Chlan, C. (1981). Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination : XII. PURIFICATION AND PROPERTIES OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS. *Plant physiology*, 68(1), 180–186. <https://doi.org/10.1104/pp.68.1.180>

Ellis, R.J. (2005). From chloroplasts to chaperones: how one thing led to another. In: Govindjee, Beatty, J.T., Gest, H., Allen, J.F. (eds) Discoveries in Photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 20. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_67

Fernández, M., & Marino Buslje, C. (2023). Edu.Ar. Recuperado el 23 de febrero, <https://ri.itba.edu.ar/server/api/core/bitstreams/c05d0cc2-5bf0-4be0-9601-8298b00dd05d/content>

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5668-5674. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>

Graether, S. P. (2018). Troubleshooting guide to expressing intrinsically disordered proteins for use in NMR experiments. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 118. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00118>

Goyal, K., Walton, L. J., & Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 151-157. <https://doi.org/10.1042/BJ20041931>

Guseman, A. J., & Pielak, G. J. (2017). Cosolute and crowding effects on a side-by-side protein dimer. *Biochemistry*, 56(7), 971–976. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01251>

Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., & Macherel, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology*, 137(1), 157-167. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052480>

He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Estrés abiótico: defensas generales de las plantas terrestres y posibilidades de ingeniería de tolerancia al estrés múltiple. *Fronteras en la ciencia vegetal*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>

Hibshman, JD, Goldstein, B. (2021). Los motivos LEA promueven la tolerancia a la desecación in vivo. *BMC Biol* 19, 263. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01176-0>

Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 61(6), 1041-1052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x>

Holehouse, A. Sukenik, S. (2020). Controlling Structural Bias in Intrinsically Disordered Proteins Using Solution Space Scanning. Junio 2021 de ACS. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00604>

Hong, S. (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. Junio 2021, de ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.017>

Hong-Bo Shao, Li-Ye Chu, Cheruth Abdul Jaleel, Chang-Xing Zhao. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants, *Comptes Rendus Biologies*, Volume 331. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.01.002>

Imen, A. (2012). Abiotic stress in plants: Late Embryogenesis Abundant proteins. Junio, de UB. <https://www.tdx.cat/handle/10803/83820#page=24>

Janis, B., Belott, C., Brockman, T., & Menze, M. A. (2022). Functional and conformational plasticity of an animal group 1 LEA protein. *Biomolecules*, 12(3), 425. <https://doi.org/10.3390/biom12030425>

10.1016/j.gene.2004.09.012

Kim, H.-S., Lee, J. H., Kim, J. J., Kim, C.-H., Jun, S.-S., & Hong, Y.-N. (2005). Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene*, 344, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.012>

Knox-Brown, P., Rindfleisch, T., Günther, A., Balow, K., Bremer, A., Walther, D., Miettinen, M. S., Hinch, D. K., & Thalhammer, A. (2020). Similar yet different-structural and functional diversity among *Arabidopsis thaliana* LEA_4 proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2794. <https://doi.org/10.3390/ijms21082794>

Koubaa, S., Bremer, A., Hinch, DK et al. (2019) Propiedades estructurales y función de estabilización enzimática de la proteína LEA_4 intrínsecamente desordenada TdLEA3 del trigo. *Informe científico* 9, 3720. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39823-w>

Koubaa, S., & Brini, F. (2020). Functional analysis of a wheat group 3 late embryogenesis abundant protein (TdLEA3) in *Arabidopsis thaliana* under abiotic and biotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 396–406. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.028>

Mendez C. (2019). Mecanismos de respuesta al estrés abiótico: hacia una perspectiva de las especies forestales. Junio, 2021. de Inifap Sitio web: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.567>

Miles, AJ, Janes, RW y Wallace, BA (2021). Herramientas y métodos para la espectroscopia de dicroísmo circular de proteínas: una revisión tutorial. *Revisiones de la Sociedad Química*, 50 (15), 8400–8413. <https://doi.org/10.1039/d0cs00558d>

Moreno, F. (2009). Plant responses to water deficit stress. Junio, 2021, de UNC Sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11131>

Moses, D. Yu, F. Garrett M. Ginell, N. Shamoan, M. Patrick S. Koenig, A. Holehouse, S and Shahar S. (2020). Revealing the Hidden Sensitivity of Intrinsically Disordered Proteins to their Chemical Environment. Junio. 2021. De Physical Chemistry. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c02822>

Munns, R. and M. Tester. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. Junio, 2021 de Annual Review of Plant Biology. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.

Nagaraju M, Kumar SA, Reddy PS, Kumar A, Rao DM, Kavi Kishor PB. (2019). Genome-scale identification, classification, and tissue specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L. PLoS One. Jan 16;14(1):e0209980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209980>

Nishimoto, T., Takahashi, Y., Miyama, S., Furuta, T., & Sakurai, M. (2019). Replica exchange molecular dynamics simulation study on the mechanism of desiccation-induced structuralization of an intrinsically disordered peptide as a model of LEA proteins.

Biophysics and Physicobiology, 16(0), 196–204.
https://doi.org/10.2142/biophysico.16.0_196

Paes de Melo, B.; Carpinetti, P.d.A.; Fraga, O.T.; Rodrigues-Silva, P.L.; Fioresi, V.S.; de Camargos, L.F.; Ferreira, M.F.d.S. (2022). Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. *Plants*, 11, 1100. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>

Pouchkina-Stantcheva NN, McGee BM, Boschetti C, Tolleter D, Chakrabortee S, Popova AV, Meersman F, Macherel D, Hinchka DK, Tunnacliffe A. (2007) Divergencia funcional de alelos anteriores en un antiguo invertebrado asexual. *Ciencia* 318: 268–271

Popova, A. V., Hundertmark, M., Seckler, R., & Hinchka, D. K. (2011). Structural transitions in the intrinsically disordered plant dehydration stress protein LEA7 upon drying are modulated by the presence of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(7), 1879–1887. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.009>

Popova, A. V., Rausch, S., Hundertmark, M., Gibon, Y., & Hinchka, D. K. (2015). The intrinsically disordered protein LEA7 from *Arabidopsis thaliana* protects the isolated enzyme lactate dehydrogenase and enzymes in a soluble leaf proteome during freezing and drying. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854(10 Pt A), 1517–1525. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.05.002>

Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, Shang M, Chen S, Pardo JM, Guo Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell*. Junio, 2021 de *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042291>

Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., & Covarrubias, A. A. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell & Environment*, 31(12), 1781–1790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01879.x>

Rivera-Nájera, L. Y., Saab-Rincón, G., Battaglia, M., Amero, C., Pulido, N. O., García-Hernández, E., Solórzano, R. M., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2014). A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 31995–32009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583369>

Sangwan V, Orvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J*. 2002. <http://doi.org/10.1105/tpc.106.042291>

Shih, M.-D., Hsieh, T.-Y., Jian, W.-T., Wu, M.-T., Yang, S.-J., Hoekstra, F. A., & Hsing, Y.-I. C. (2012). Functional studies of soybean (*Glycine max* L.) seed LEA proteins GmPM6, GmPM11, and GmPM30 by CD and FTIR spectroscopy. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 196, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.012>

Singh, K. K., & Graether, S. P. (2020). Expression and purification of an intrinsically disordered protein. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2141, 181-194. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0524-0_8

Shou, K., Bremer, A., Rindfleisch, T., Knox-Brown, P., Hirai, M., Rekas, A., Garvey, C. J., Hinch, D. K., Stadler, A. M., & Thalhammer, A. (2019). Conformational selection of the intrinsically disordered plant stress protein COR15A in response to solution osmolarity - an X-ray and light scattering study. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 21(34), 18727–18740. <https://doi.org/10.1039/c9cp01768b>

Thalhammer, A., Hundertmark, M., Popova, A. V., Seckler, R., & Hinch, D. K. (2010). Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(9), 1812-1820. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.015>

Taiz, L. y E. Zeiger. (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkozje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=717115](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkozje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=717115)

Trivedi, R., & Nagarajaram, H. A. (2022). Intrinsically disordered proteins: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14050. <https://doi.org/10.3390/ijms232214050>

Tolletier D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel MH, Macherel D. (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*. May;19(5):1580-9. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050104>.

Tunnacliffe, A., Wise, M.J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**, 791–812. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>

Tunnacliffe, A., Hinch, D. K., Leprince, O., & Macherel, D. (2010). LEA proteins: Versatility of form and function. In *Dormancy and Resistance in Harsh Environments* (pp. 91–108). Springer Berlin Heidelberg.

Vieira-Pires RS, Morais-Cabral JH. (2010). 3(10) helices in channels and other membrane proteins. *J Gen Physiol*. Dec;136(6):585-92. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010508>.

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14.

Wehner, F., H. Olsen, H. Tinel, E. Kinne-Saffran y R.K.H. Kinne. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148, 1-80.

Wise, M. J., & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.012>

Wolkers, WF, McCready, S., Brandt, WF, Lindsey, GG y Hoekstra, FA (2001). Aislamiento y caracterización de una proteína LEA D-7 a partir de polen que estabiliza vidrios in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1544 (1–2), 196–206. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00220-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00220-x)

Yancey, ME Clark, SC Hand, RD Bowlus, GN Somero. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Junio, 2021. De Science. <https://doi.org/10.1126/science.7112124>

Zhang H, Zhu J, Gong Z, Zhu JK. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet.* Feb;23(2):104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>.

Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Junio 2021. De Rev. Plant Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

XII. ANEXOS

Método de transformación por choque térmico en células de *E. coli*

1. Configurar la centrifuga de “enfriamiento rápido” a 4 °C y encender el baño de calor a 42 °C
2. Obtener células BL21 de -80°C y el plásmido pET28-a de -20°C con las proteínas LEA y poner ambas en hielo
3. Verter los plásmidos 2 veces para mezclar. Luego girarlos durante 30 seg a 13,000 rpm a 4 °C
4. Colocar alícuotas de 50 µL de células competentes en un nuevo tubo eppendorf
5. Añadir 2 µL de plásmido a una alícuota de células competentes, mezclar pipeteando arriba/abajo 2 veces
6. Incubar en hielo por 30 min
7. Preparar las incubadoras y el área de trabajo estéril (con mechero) y precalentar LB a 37°C
8. Hacer choque térmico a las células (usando rejilla de espuma flotante) a 42 °C por 45 seg.
9. Colocar en hielo por al menos 2 minutos (2-5 min)
10. Tomar 500 µL LB previamente caliente y adicionar en el tubo con el plásmido + BL21
11. Incubar por 1 hr a 37°C y poner a T. ambiente una placa de Agar LB + Kanamicina. Preparar un área esteril (mechero)
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min. a 4 °C
13. Remover el sobrenadante de LB (450 µL)
14. Mezclar bien los 50 µL restantes pipeteando hacia arriba/abajo
15. Colocar 2 gotas en el centro de la placa y esparcir
16. Incubar a 37 °C por 16 hrs
17. Tomar la placa de la incubadora y envolverla con parafilm. Conservar 4°C

Solution space scanning in vitro

- Preparación de la proteína

La concentración elegida del stock de la proteína fue 17 μM . De esta manera, al realizar el ensayo de SSS la concentración final de proteína dentro de placas de 96 pozos fue de 1 μM .

Para lograrlo, se colocaron las proteínas purificadas en hielo y se centrifugaron a 4°C, 14,000 rpm por 5 min evitando los agregados moleculares. Posteriormente, se realizó una dilución tomando 10 μL de proteína + 190 μL de buffer de elución y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 280, 434 (máxima excitación mTurquoise2) y 506 (máxima excitación mNeonGreen), se colocaron las muestras en un tubo y se agregó la cantidad necesaria de Buffer de elución para obtener la concentración del stock (17 μM).

La longitud de onda 280 nm corresponde al pico máximo de absorbancia de las proteínas (causado por los aminoácidos aromáticos), 434 nm (máxima excitación mTurquoise2) y 506 nm (máxima excitación mNeonGreen).

Para calcular la concentración de proteína, se tomó el valor de absorbancia a λ_{506}

Fórmula para calcular la concentración de proteína:

$$\frac{Fd \times Abs_{506} \times 1000000}{116\ 000}$$

Donde:

Fd es el factor de dilución= 20

116 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = coeficiente de extinción molar de mNeonGreen

Ejemplo de cálculo para AtLEA4-5:

$$\frac{20 \times 0,928\ \text{cm} \times 1000000\ \mu\text{M}}{116\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}} = 160\ \mu\text{M}$$

Los procesos de expresión de proteína, purificación y preparación para SSS se hicieron de la misma manera para el resto de las proteínas LEA que para la proteína AtLEA4-5.

- Preparación de las soluciones

Composición de los Buffers utilizados:

Buffer estándar 1: 20 mM NaH_2PO_4 NaCl 100 mM, pH= 7.4. Se utilizó para preparar soluciones cuando el soluto no era una sal.

Buffer de elución: 50 mM NaH_2PO_4 0.5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH=8.0

Buffer estándar 2: 20 mM NaH_2PO_4 pH=7.4 (sin cloruro de sodio). Se utilizó para soluciones en cuyo soluto es una sal.

Las soluciones con concentraciones en [mol/L] se obtuvieron calculando el peso de soluto necesario para el volumen de solución deseado, midiendo ese peso de soluto en un tubo cónico de 50 mL y agregando el buffer adecuado para alcanzar el volumen correcto.

Para preparar soluciones con concentraciones expresadas en % w/w , se colocó un peso arbitrario de cosoluto en un tubo cónico de 50 mL, se calculó un peso objetivo basado en la masa de soluto agregada y la concentración deseada en % w/w, y se adicionó buffer estándar 1 o 2, según fuera el caso, para alcanzar el peso objetivo. Una vez que las soluciones fueron preparadas, fueron filtradas con un filtro para jeringa de 0.2 μm y guardadas a T. ambiente.

TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA

1. Preparar un inóculo de YPD (3 mL) con levadura WT (BJ5465) un día antes
2. Colectar 1 mL de cultivo de levadura en tubos eppendorf estériles y centrifugar a 12,500 rpms por 1 min y remover el SN
3. Resuspender en 1 mL de TE (Tris 10 mM pH=7.5)
4. Centrifugar 12,500 rpms por 1 min, remover el SN
5. Resuspender en 500 μ L de Lazy bones/ pipetear
6. Anadir 25 μ L de esperma de salmón (previamente caliente a 100°C/ 5 min y después en hielo 5 min)
7. Añadir DNA plasmídico 500 ng
8. Vortexear 1 min
9. Mantener a temperatura ambiente por 12 hrs
10. Choque de calor por 12 min a 42°C, luego se colocó en hielo por 12 min
11. Centrifugar a 13,400 rpms 1 min y remover el SN
12. Resuspender en 1 mL de TE
13. Plaquear en medio SD-URA e incubar a 30°C por 2 -3 días (200 μ L) y guardar el resto a -20°C.

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS LEA PURIFICADAS

Muestra 1. AtLEA4-5

La Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM

[Identificación de proteínas LCMS](#)

Usuario: Laura Daniela Palomino Navarrete

E. mail: dann.navarrete1@gmail.com

Jefe de Grupo: Dr. César Luis Cuevas Velázquez

Número de Muestras: 01

Organismo: *Arabidopsis thaliana*

Tipo de servicio: Identificación de proteínas

Accession	Description	PLGS Score	Coverage (%)	Digest Peptides	mW (Da)	pI (pH)
LEA46_ARATH	Late embryogenesis abundant protein 46 OS Arabidopsis thaliana OX 3702 GN LEA46 PE 2 SV 1	7935.752	73.4177	11	16168	9.9111

Muestra 2. AtEM1

La Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM

[Identificación de proteínas LCMS](#)

Usuario: Laura Daniela Palomino Navarrete

E. mail: dann.navarrete1@gmail.com

Jefe de Grupo: Dr. César Luis Cuevas Velázquez

Número de Muestras: 01

Organismo: *Arabidopsis thaliana*

Tipo de servicio: Identificación de proteínas

Accession	Description	PLGS Score	Coverage (%)	Digest Peptides	mW (Da)	pI (pH)
A0A178V532_ARATH	GEA1 OS Arabidopsis thaliana OX 3702 GN AXX17 At3g46180 PE 3 SV 1	38238.86	62.5	24	16601	5.7026

Muestra 3. AtLEA6-2

La Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM

Identificación de proteínas LCMS

Usuario: Laura Daniela Palomino Navarrete

E. mail: dann.navarrete1@gmail.com

Jefe de Grupo: Dr. César Luis Cuevas Velázquez

Número de Muestras: 01

Organismo: *Arabidopsis thaliana*

Tipo de servicio: Identificación de proteínas

Accession	Description	PLGS Score	Coverage (%)	Digest Peptides	mW (Da)	pI (pH)
A0A5S9X0S2_ARATH	Uncharacterized protein OS Arabidopsis thaliana OX 3702 GN C24 LOCUS8547 PE 4 SV 1	25832.15	90.3614	15	8549	4.1865

Estimación de los niveles de estructura secundaria calculados con Dichroweb

AtLEA4-5	Porcentaje hélice- alfa (%)	Porcentaje hoja- beta (%)	Porcentaje de desorden (%)
Buffer (50 mM NaH ₂ PO ₄ a pH=8.0)	38	19	42
PEG 3350 al 20%	49	21	30
PEG 8000 al 20%	53	21	26
AtEM1	Porcentaje hélice- alfa (%)	Porcentaje hoja- beta (%)	Porcentaje de desorden(%)
Buffer (50 mM NaH ₂ PO ₄ a pH=8.0)	16	26	57
PEG 3350 al 20%	28	28	43
PEG 8000 al 20%	27	28	44
LEA7	Porcentaje hélice- alfa (%)	Porcentaje hoja- beta (%)	Porcentaje de desorden(%)
Buffer (50 mM NaH ₂ PO ₄ a pH=8.0)	28	23	49
PEG 3350 al 20%	51	21	28
PEG 8000 al 20%	48	25	27
AtLEA6-2	Porcentaje hélice- alfa (%)	Porcentaje hoja- beta (%)	Porcentaje de desorden(%)
Buffer (50 mM NaH ₂ PO ₄ a pH=8.0)	11	36	53
PEG 3350 al 20%	13	37	50
PEG 8000 al 20%	11	37	52

DICROISMO CIRCULAR PARA PROTEÍNAS LEA

La concentración de las proteínas LEA fue obtenida mediante a 280 nm aplicando el método BSA en un Espectrofotómetro NanoDrop One.

A continuación, se muestra un ejemplo de cómo se realizó el ensayo de dicroismo circular para la proteína AtLEA4-5, sin embargo, esto se hizo para cada proteína LEA purificada.

Concentración de la proteína AtLEA4-5: 1.061 mg/mL

- Cantidad de LEA para obtener [0.03 mg/mL] en 300 μ L

$$V1 = (0.03 \text{ mg/mL})(300 \mu\text{L}) / 1.061 \text{ mg/mL} = 8.48 \mu\text{L}$$

Muestra	Buffer 50 mM NaPO ₄ , pH=8.0	AtLEA4-5	PEG 3350/8000
Control	291.52 μ L	8.48 μ L	-
Prueba PEG 3350/8000	171.52 μ L	8.48 μ L	120 μ L

ENSAYO LDH - ACTIVIDAD

Se muestra un ejemplo de cómo se realizó el ensayo actividad enzimática tras desecación para la proteína AtLEA4-5, pero esto se hizo para cada proteína LEA purificada.

- **Preparación de los buffers utilizados**

Tris-base PM= 121.14 g/mol

Solución 25 mM Tris, pH= 7.5, vol. = 100 mL

$$0.025 \text{ mol/L} \times \frac{121.14 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} = 0.3028 \text{ g}$$

Solución 1 M Tris, pH= 7.5, vol. = 100 mL

$$1 \text{ mol/L} \times \frac{121.14 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} = 12.11 \text{ g}$$

Solución 1 M KCl, vol. = 100 mL

$$1 \text{ mol/L} \times \frac{74.55 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} = 7.455 \text{ g}$$

Buffer de reacción

Piruvato

0.44 mg/ μ L , vol= 200 μ L

0.44 mg/ μ L x 200 μ L = 88 mg = 0.088g

NADH

0.105 mg/ μ L , vol= 200 μ L

0.105 mg/ μ L x 200 μ L = 21 mg = 0.021g

- **Ensayo de Actividad enzimática**

Cálculos para enzima LDH

14.1 mg/mL

14.1 mg/mL x $\frac{1}{10}$ = 1.41 μ g/ μ L x $\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ uL}}$ = 1410 μ g/mL

35 μ g/mL (monómero) \rightarrow 1 μ M

x= 8.75 μ g/mL ----- 0.25 μ M

$$V1 = \frac{600 \text{ uL} \times 8.75 \text{ ug/mL}}{1400 \text{ ug/mL}} = 3.75 \text{ } \mu\text{L} \text{ debo tomar esto de LDH 1:10}$$

Se toman 50 μ L y se colocan en tubos eppendorf. Se secan en el SpeedVac por 1 hr 30 min.

- Se preparan 20 mL de Buffer de reacción
- Después de secar, se resuspenden los tubos en 50 μ L de H₂O y se mezcla
- Se centrifugan los tubos a 13,400 rpms por 10 min, se toma el SN y se transfiere a un nuevo tubo eppendorf. Elet se resuspende en 50 μ L de H₂O

Se mide la actividad de la LDH sola y en contacto con la AtLEA4-5 a 340nm.