



**Análisis de la participación de la región 3' no traducida
del gen *PvLEA-18* en la regulación de su
expresión en respuesta a déficit hídrico.**

Tesis para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas

Alumno: Marina E. Battaglia Rossi.

Director de Tesis: Dra Alejandra Covarrubias Robles.

Instituto de Biotecnología.
Universidad Nacional Autónoma de México.
2008.



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.

Resumen

Durante el déficit hídrico las plantas cambian su metabolismo y expresión genética para tolerar el estrés. En estas condiciones se inducen proteínas del tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins). En nuestro laboratorio se describió al gen que codifica para una proteína LEA de frijol, PvLEA18 (Colmenero 1995; 1997). El análisis de la expresión del gen en transgénicas de *Arabidopsis*, utilizando fusiones de su promotor con el gen *GUS* y con las regiones 3'PvLEA18 o 3'NOS, mostraron que la región 3'PvLEA18 produce un incremento de la actividad del reportero en condiciones de déficit hídrico, con respecto a la construcción con 3'NOS.

En este trabajo encontramos que la región 3'PvLEA18 en condiciones de déficit hídrico regula su expresión a nivel post-transcripcional. Esta regulación no depende de la estabilidad del mensajero. Al analizar el perfil polisomal de las plantas transgénicas en estrés, encontramos que el mensajero que lleva la región 3'PvLEA18 se localiza en la zona polisomal, favoreciendo la carga del mensajero a polisomas y la eficiencia traduccional del gen. Observamos que esta regulación se encuentra en las primeras 170 bases a partir del codón de terminación. El alineamiento de las regiones 3' de genes homólogos a PvLEA18 en otras leguminosas, mostró que hay dos cajas (C1 y C2) conservadas. Esta región del RNA es capaz de interactuar con proteínas; al mutar estas cajas encontramos una disminución en esta interacción, en particular, con la mutación en la caja 2. Ensayos *in vitro* sugieren que las cajas están involucradas en la traducción del mensajero.

Quiero agradecer a los que hicieron posible la realización de este tesis y mi estancia en México:

A Alejandra Covarrubias por darme la posibilidad de realizar esta tesis en su laboratorio, por su apoyo, sus discusiones y sus enseñanzas.

A mi comité tutorial de tesis, al Dr Jesús Aguirre y al Dr Mario Rocha y a mi Comité de Jurado de Tesis por el aporte que me brindaron durante y después de la realización de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de todos estos años.

Y por sobre todo las cosas a la UNAM por que hace posible el desarrollo de una educación y una investigación libre e independiente para el desarrollo de México.

Índice

Resumen	2
Agradecimientos	3
Abreviaturas	8
Introducción.	9
I.	El déficit hídrico en las plantas.
	10
	Déficit hídrico: definición.
	11
	Adaptaciones de las plantas a su ambiente.
	11
	La importancia del agua y las características hidráulicas de la célula vegetal.
	14
	El potencial hídrico, su importancia en el movimiento del agua en la célula vegetal.
	14
	La célula vegetal en déficit hídrico.
	16
	Ácido absícico (ABA): la hormona del estrés.
	17
	La planta en condiciones de estrés: consideraciones generales.
	19
	Proteínas LEAs.
	20
II.	La regulación post-transcripcional por la región 3' no traducida.
	23
	Breve reseña sobre la formación de las regiones no traducidas.
	24
	Formas del mensajero en el citoplasma.
	26
	Ejemplos de regulación post transcripcional por la región 3' no traducida en plantas .
	26
	Regulación de la vida media de un mensajero.
	27
III.	Traducción: la síntesis de proteínas y su regulación.
	29
	Traducción: la síntesis de proteínas y su regulación.
	30
	Expresión específica en órganos o durante el desarrollo modulada por la región 3' no traducida.
	Ejemplos que sugieren la regulación traduccional en plantas por la región 3' no traducida.
	35
	Traducción selectiva en condiciones particulares: stress y desarrollo.
	36
	Regulación por la región 3' no traducida en traducción: algunos modelos que no se han encontrado en plantas: Variación en el largo del poli (A) ⁺ .
	40
	Proteínas de unión a RNA. Algunos ejemplos en plantas asociados con condiciones de estrés
	40
IV.	<i>Phaseolus vulgaris</i> : Un estudio sustentable.
	43
Antecedentes.	46
PvLEA-18: Caracterización y expresión.	47
Regulación de la expresión por la región 3' no traducida del gen.	53
Hipótesis.	54
Objetivo general.	55

Objetivos particulares.	55
Resultados.	56
I. Regulación transcripcional.	57
II. Regulación post-transcripcional.	58
1. Estabilidad del mensajero.	59
2. Regulación post-transcripcional; asociación del RNA mensajero a polisomas.	62
3. Delimitación de la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> .	65
4. 170 bases en la región 3' no traducida de <i>PvLEA18</i> son importantes para la regulación traduccional.	73
5. La sobre-expresión del gen reportero no permite analizar la regulación que ejerce la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> .	75
6. Proteínas de unión a la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> .	77
7. Participación de las cajas encontradas en la región de 170 bases en la formación del complejo RNA-proteína con la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> .	81
8. Efecto de la mutación en la caja 2 en traducción <i>in vitro</i> .	83
9. Enriquecimiento de la proteína de unión a RNA.	84
Discusión.	87
Conclusiones	92
Perspectivas	93
Materiales y métodos.	94
1. Material Biológico.	95
2. Condiciones de crecimiento óptimas y generación del déficit hídrico.	95
3. Experimentos para definir la región 3' no traducida.	96
4. Aislamiento de núcleos de Arabidopsis y medición de la tasa transcripcional.	97
5. Reacción de transcripción.	97
6. Determinación de la vida media del mensajero.	98
7. Análisis de polisomas y del RNA unido a los polisomas.	98
8. Análisis fluorométrico de GUS.	98
9. Ensayos de interacción RNA-proteína.	99
10. Extractos proteicos.	100
11. Ensayos de entrecruzamiento RNA-proteína con UV.	100
12. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de RNA (REMSA; RNA Electrophoretic mobility shift assay)	100
13. Traducción <i>in vitro</i> .	100
Bibliografía.	101
Publicaciones	110

Índice de figuras.

Figura 1. Esquema de la secuencias o zonas requeridas para el procesamiento de la región 3' no traducida de un mensajero en plantas (tomado de Loke, <i>et al.</i> , 2005)	25
Figura 2: Vías de inicio de la traducción en procariotas y eucariotas (Hinnebusch AG, <i>et al.</i> , 2004)	32
Figura 3: Detalle del inicio de la traducción en eucariotas en un mecanismo dependiente del “cap” (Gebauer F y Hentze MW, 2004)	33
Figura 4. Principales productores mundiales de frijol.	44
Figura 5. Producción de frijol en Latinoamérica.	45
Figura 6. Rendimiento en Kg/ha en los principales países productores	45
Tabla 1. Características químicas teóricas de la proteína PvLEA-18 de frijol y en proteínas homólogas.	50
Tabla 2. Dominios conservados entre las proteínas del grupo 6 (PFAM_10714).	51
Figura 7. Diagrama en el que se muestra como se distribuyen los dominios que definen al grupo 6 de las proteínas LEA.	52
Figura 8. Comparación de los elementos potenciales en <i>cis</i> que se encuentran en los promotores del gen de <i>PvLEA18</i> de frijol y de los genes homólogos en <i>Arabidopsis</i> .	52
Figura 9. Esquema que representa las construcciones utilizadas para transformar plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	53
Figura 10. Actividad específica de GUS en las distintas líneas de las plantas transgénicas que llevan las construcciones <i>ProPvLEA18/GUS/PvLEA18 3'</i> y <i>ProPvLEA18/GUS/NOS 3'</i> .	54
Figura 11. Análisis de la tasa transcripcional de diferentes genes en las líneas homocigas de <i>ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18</i> o <i>ProPvLEA18:GUS:3'NOS</i> bajo condiciones óptimas de riego y en condiciones de déficit hídrico.	57
Figura 12. Optimización de las condiciones para la medida de la vida media en condiciones de déficit hídrico.	61
Figura 13. Efecto de la región 3' no traducida de <i>PvLEA18</i> sobre la vida media del reportero <i>GUS</i> en condiciones de déficit hídrico inducido por tratamiento con PEG.	62
Figura 14. Análisis del perfil de sedimentación de diferentes mRNAs obtenidos de plantas transgénicas sometidas a déficit hídrico.	64
Figura 15. Cuantificación del porcentaje del mensajero de <i>GUS</i> en la fracción monosomal y polisomal.	65
Figura 16. Resultado del experimento de amplificación específica de la región 3' no traducida de <i>PvLEA18</i> .	66
Figura 17. Diagrama que representa el transcrito del gen <i>PvLEA18</i> .	67
Figura 18. Alineamiento obtenido por el programa MEME en el cual se obtiene como motivo la caja 2.	68
Figura 19. Alineamiento de las secuencias de las regiones 3' no traducidas de genes de <i>Arabidopsis</i> , analizado con el algoritmo de MEME, en donde se obtiene como dominio la caja 2.	69
Figura 20. Tabla que representa los datos obtenidos a partir de las bases de datos de microarreglos de los genes que poseen la caja 2 en su secuencia 3' no traducida.	70/71

Figura 21. Motivo consenso de la caja 2.	72
Figura 22. Secuencias de genes que codifican para proteínas de tipo LEA y que tienen doble repetido de cajas en su secuencia 3' no traducida.	72
Figura 23. Análisis <i>in vivo</i> de la regulación de distintos fragmentos de la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> en plantas de <i>Arabidopsis</i> bajo tratamiento de déficit hídrico.	74
Figura 24. Expresión constitutiva del reportero GUS, utilizando el promotor CaMV35S, con la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> o del gen 3' <i>NOS</i> .	76
Figura 25. Interacción RNA-Proteína en un ensayo de entrecruzamiento de UV.	78
Figura 26. Detección de proteínas que interactúan con la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> (170 b y 300 b).	79
Figura 27. Ensayo de interacción entre RNA y proteína de <i>Arabidopsis</i> , utilizando la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> (a) y <i>NOS</i> (b) marcados radiactivamente.	80
Figura 28. Ensayo de retardo de RNA- Proteína, utilizando 170 bases de la región 3' no traducida.	81
Figura 29. Efecto de la mutación de la caja 1 o la caja 2 en el fragmento de 170 bases de la región 3' no traducida del gen <i>PvLEA18</i> sobre la formación del complejo RNA-proteína.	82
Figura 30. Actividad de GUS medida luego de la traducción <i>in vitro</i> utilizando construcciones del reportero GUS fusionadas con 170 bases de la región 3' del gen <i>PvLEA18</i> , en su secuencia silvestre o con la caja 1 (C1m) o la caja 2 mutadas (C2m).	84
Figura 31: Enriquecimiento de la fracción del sobrenadante de 80% por cromatografía de intercambio iónico (MonoQ).	85
Figura 32: Esquema de la estructura teórica del mRNA de <i>PvLEA18</i> utilizando el algoritmo de Zucker (MFold)	86
Figura 33: Modelo posible propuesto en el cual las proteínas de unión a RNA podrían interactuar con los factores de inicio de la traducción estabilizando la estructura circular del mensajero.	92

Abreviaturas.

3'RACE: amplificación de los extremos 3' de un cDNA (Rapid Amplification of cDNA 3' Ends)

ABA: ácido absólico

AQP: acuaporinas

AREB: Factor de transcripción de respuesta a ABA (Abscisic acid responsive element binding protein)

CREB: cAMP response element binding protein

CS: sitio de corte (cleavage site)

D113: proteína LEA del grupo 4 (At5g06760)

DCMU: 3-(3,4-diclorofenil)-l,l-dimetilurea

DRE: elemento de respuesta a deshidratación (Dehydration responsive element)

DREB: Factor de transcripción de unión a elementos DRE (DRE binding transcription factor)

eIF: Factor de Iniciación Eucariótico (eucariotic Initiation Factor).

eIF4A1: factor de inicio de la traducción (At3g13920)

ERD10: proteína LEA del grupo 2, deshidrina (At1g20450)

FCA: Locus C de floración (flowering locus C)

FUE: elementos más lejanos al sitio de corte (far upstream element)

GCR2. Receptor acoplado a proteína G (G- protein- coupled receptor)

GNC2:

HSP: proteína de estrés por calor (Heat shock protein)

IF: factor de iniciación (Initiation Factor).

LEA: proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant Proteins).

LTI28: proteína LEA del grupo 2 (At5g52310)

MYC: factor transcripcional con similitud a los factores oncogénicos de tipo Myc.

MYB: factor transcripcional de la familia MYB. Derivan de los factores clásicos de tipo c-Myb

NAC: factor de transcripción de la familia NAC (NAM/ATAF1,2/CUC2 = transcription factors

NUE: elementos más cercanos al sitio de corte (near upstream element)

PABPs: proteínas de unión al poli (A)+ (Poly (A) binding proteins).

PEG: polietilenglicol.

PRP: Proteína rica en prolina (Proline Rich Protein)

RE: retículo endoplasmático.

RCE1: (RUB1, enzima conjugadora de ubiquitina (At4g36800)

ROS: especie reactiva de oxígeno (reactive oxygen specie)

SDS: sodium dodecyl-sulphate

SOD: superóxido dismutasa.

URE: elementos ricos en Uridina (Uridine Rich element).

UTP: Uridin-trifosfato

UV: Ultravioleta

INTRODUCCIÓN.

I. El déficit hídrico en las plantas.

Déficit hídrico: definición

Por definición, el déficit hídrico ocurre cuando el aporte de agua desde el suelo es menor que la tendencia de la planta a perder agua por transpiración (Hall, 1993). El déficit hídrico tiene un efecto limitante en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Desde el punto de vista agrícola, es el estrés que genera las mayores pérdidas en el rendimiento de los cultivos, ya que afecta no solo la producción del cultivo, sino también la calidad del mismo. Para tener una idea de la amplitud del efecto se estima que el 50% de las 230 millones de ha. de trigo que se siembran en el mundo son afectadas regularmente por la sequía (Trethowan y Reynolds, 2007).

Si bien es el ambiente el que genera las condiciones de déficit hídrico en las plantas también las malas prácticas agrícolas llevadas a cabo por el hombre han desencadenado condiciones adversas en el ambiente: tal es el caso de la desertificación y la salinización de los suelos, como resultado de la degradación y erosión de los mismos y del riego artificial. Además, la deforestación de los bosques y las selvas para ganar tierras de cultivo han propiciado la falta de retención de agua de estos suelos. Estos factores dan como resultado tener suelos vulnerables, de menor calidad y productividad y cualquier cultivo que se desarrolle en ellos, sufrirá condiciones de déficit hídrico (AAAS, 2001).

Desde el punto de vista biológico, el déficit hídrico provoca cambios en el desarrollo, en la fisiología y en la reproducción de las plantas, así que por esto y lo antes mencionado es importante conocer los mecanismos que se ven afectados, así como los mecanismos que promueve la planta para tolerar, para superar el estrés y para reproducirse en esas condiciones adversas.

Adaptaciones de las plantas a su ambiente

Revisar la historia evolutiva de las plantas permite comprender como se han adquirido los mecanismos de tolerancia frente al estrés.

Las plantas terrestres, las embriofitas, han evolucionado a partir de un ancestro común cuyo hábitat era el agua y muy probablemente podría ser clasificado dentro del grupo de las algas verdes carófitas (Graham *et al.* 2000). La colonización y la supervivencia en la tierra de aquellos primeros organismos requería de nuevas estrategias para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales que favorecían la desecación. Las primeras plantas que aparecieron hace más de 400 millones de años, habían adquirido ciertas características exitosas que les permitieron sobrevivir en este nuevo ambiente, como fue la presencia de una cutícula cerosa que evitaba la pérdida de agua de la superficie de la planta. Estos organismos fueron los ancestros de las briofitas (el grupo de las briofitas esta compuesto por las hepáticas, los antoceros y los musgos) y algunas de las características de ellos se mantienen en las briofitas modernas donde se observa que no poseen un sistema vascular verdadero (xilema y floema), solo poseen un grupo de células poco diferenciado que puede conducir agua o nutrientes (células hidroides y leptoides) y gran parte del agua se absorbe directamente de la superficie de la planta. Tampoco poseen estomas y algunas

(como los gametofitos de hepáticas) solo tiene poros que se mantienen siempre abiertos y que aseguran el intercambio gaseoso (Stern *et al.* 2003). Los integrantes de este grupo requieren de un ambiente externo húmedo para poder reproducirse. Sin embargo, algunas especies dentro de los grupos de plantas inferiores, de tamaño muy pequeño, adquirieron y mantuvieron a lo largo de la evolución la tolerancia a la desecación casi total del organismo; estas plantas pueden perder hasta el 90% de su contenido de agua y luego de un tiempo pueden ser rehidratadas sin sufrir ningún tipo de daño celular. Esta característica de tolerancia a la desecación se propone que fue crucial para la colonización de la tierra. Pero la tolerancia a la desecación implica un costo metabólico muy alto que se ve reflejado en el tamaño reducido que tienen estas especies (Oliver *et al.* 2000). Evolutivamente esta característica, la tolerancia a la desecación, se fue perdiendo pero se adquirieron otras que involucraron la conservación y el movimiento interno del agua, debido a la aparición y la diferenciación de los tejidos vasculares y de los estomas, con lo cual se pudo regular no solo el movimiento del agua, sino evitar su pérdida y regular el intercambio gaseoso. El poder controlar el contenido de agua de la planta permitió que los organismos adquirieran mayor tamaño y complejidad siendo una de las características exitosas que participaron en la diversificación y en la colonización terrestre (Oliver *et al.* 2000).

Los estudios realizados en especies modernas que toleran la desecación mostraron que acumulan proteínas LEAs (por sus siglas en inglés: Late Embryogenesis Abundant Proteins) previo a la desecación y en algunos casos, como en *Tortula ruralis*, también se acumula una proteína con características similares durante la rehidratación (Velten y Oliver, 2001). A la vez se almacenan carbohidratos, principalmente la sacarosa y derivados de ella, como la trealosa y la rafinosa (Rascio y La Rocca, 2005). Actualmente, solo un reducido grupo de especies vegetales mantienen la capacidad de tolerar la desecación total del organismo, la mayoría de las especies se incluyen dentro de las plantas inferiores, como las algas, las briofitas, los líquenes y en las plantas superiores solo algunos helechos (60 especies) y algunas pocas angiospermas (60-70 especies), aunque sí se mantiene esta característica en ciertas estructuras comunes a todas las plantas: como son el grano de polen y la semilla madura.

Evolutivamente las plantas han seleccionado diferentes características para poder responder, tolerar y adaptarse a los cambios ambientales adversos. Se denomina adaptación a cualquier carácter o conjunto de caracteres que les permite a los individuos que los poseen superar con éxito a uno o más agentes selectivos. La modificación evolutiva de un carácter bajo selección, tiene como consecuencia una ventaja funcional en un ambiente determinado, con respecto a poblaciones ancestrales que no lo poseen. Las adaptaciones se pueden dar a nivel de la morfología externa, a través de cambios histológicos, o bien de especializaciones de tipo fisiológico, metabólico o de comportamiento las cuales aparecen en un grupo de la población y que se explican a nivel molecular por mutaciones heredables en el DNA. El estudio de la relación de un organismo con su entorno ambiental permite interpretar su historia evolutiva; en particular,

el estudio de aquellas adaptaciones al medio que le permiten sobrevivir a un rango de condiciones ambientales sumamente amplias y extremas (Begon *et al.* 2006).

Las plantas pueden clasificarse de acuerdo a distintos parámetros, uno de ellos es su capacidad de contender con la disponibilidad de agua en el medio ambiente. En este caso, las plantas se han clasificado en tres tipos principales:

a. Las plantas que requieren abundante suelo, agua y viven en regiones de óptima disponibilidad de agua durante todo el año, se denominan **mesófitas**. Si bien este grupo de plantas no posee adaptaciones para contender con largos periodos de deshidratación, evolutivamente han desarrollado mecanismos de tolerancia para contender con condiciones periódicas de estrés. La mayor parte de los cultivos de interés agronómico pertenecen a este grupo.

b. Las plantas que crecen sobre la superficie del agua o están sumergidas en suelos que normalmente están saturados por el agua, se denominan **hidrófitas**.

c. Otras especies viven en regiones donde el suministro de agua es deficiente o fluctúa ampliamente durante las estaciones del año, estas plantas se denominan **xerófitas**. Habitan en las regiones más secas, como desiertos o semidesiertos. Representan un grupo altamente diversificado y estructuralmente complejo que exhibe adaptaciones que promueven el aprovechamiento del agua. Esto les permite sobrevivir y reproducirse en un ambiente de bajas precipitaciones y baja humedad, condiciones que promueven la rápida pérdida de agua. Dentro de este grupo de plantas podemos distinguir tres diferentes estrategias adaptativas:

1. Especies que **escapan** a la sequía porque completan un ciclo de vida corto durante la etapa del año en que las condiciones ambientales son favorables.

2. Especies que **evaden** la sequía que son aquellas plantas capaces de reducir o compensar la pérdida de agua, porque poseen estructuras especializadas, como la presencia de un sistema radicular extenso.

3. Especies que **soportan** la sequía, plantas que son capaces de sobrevivir aún cuando la captación de agua se vea reducida o sea nula. En este grupo incluimos especies con un número de especializaciones altamente divergentes, como son el cambio en el ángulo de la hoja, el enrollamiento o plegado de la lámina de la hoja o adaptaciones permanentes como la succulencia o las hojas reducidas a espinas, como en las cactáceas. El incremento en el grosor de las paredes celulares de las células epidérmicas o en el grosor de la cutícula, así como, una mayor densidad de los tricomas y la reducción en el número de estomas por área, contribuyen también a evitar la pérdida de agua (Dickinson, 2000).

Como se explicó anteriormente, la mayoría de los cultivos de interés agronómico necesitan un aporte de agua sostenido, cualquier disminución tiene efectos en el crecimiento vegetativo de la planta y principalmente en el rendimiento (granos o frutos), por lo que el estudio de la respuesta de las plantas al

déficit hídrico adquiere relevancia adicional por el impacto que podría tener el conocimiento que se obtenga sobre el mejoramiento a nivel agrícola.

La importancia del agua y las características hidráulicas de la célula vegetal

El agua es vital para todos los organismos, constituye aproximadamente el 70-90% del peso fresco de la mayoría de las especies no arbóreas. Sus propiedades fisicoquímicas, como su estructura bipolar, el alto punto de fusión y ebullición, el alto calor de vaporización y las propiedades de cohesión-tensión, permiten el funcionamiento celular. Es el solvente por excelencia de la célula y el medio en el que se distribuyen a través de la planta tres tipos de compuestos: compuestos **orgánicos polares**, como aminoácidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, pequeños RNAs y hormonas; **iones**, como algunos de los nutrientes de la planta, o los encargados de mantener la homeostasis celular (Na^+ , K^+) y aquellos que sirven como 2^{dos} mensajeros (Ca^{+2}); y **moléculas inorgánicas**, como los gases (CO_2 , O_2 , N_2). Por otro lado excluye a los componentes no polares, como los lípidos. El agua es esencial para el metabolismo, ya que participa en las reacciones químicas y se requiere para el correcto funcionamiento metabólico: la concentración de agua determina la actividad de las enzimas y el transporte a través de las membranas. Además de ser fuente de O_2 , se requiere para disipar la energía que se produce durante la fotosíntesis.

También funciona como un regulador de la temperatura de las hojas, debido a su alto calor de vaporización. Por otro lado, las propiedades de tensión-cohesión del agua posibilitan el transporte de agua y solutos a través del sistema vascular de la planta sin importar su tamaño (Nobel, 2000; Fitter y Hay, 2002).

El agua cumple un papel fundamental en el crecimiento vegetal. El crecimiento en un organismo se da tanto por división celular, que solo ocurre en los tejidos meristemáticos, como por elongación, la cual se produce por la entrada de agua a la célula, favorecida por un gradiente de potencial hídrico y la concomitante expansión de la pared celular que se induce por un ablandamiento provocado por la actividad de enzimas hidrolíticas y de expansinas (Boyer y Silk, 2004).

El potencial hídrico, su importancia en el movimiento del agua en la célula vegetal

El agua se mueve a través de la planta por diferencia de potenciales de agua. El potencial de agua se calcula a partir de la actividad del agua pura y considerando los factores que la modifican. El potencial de agua de la célula (Ψ_w) se define como:

$$\Psi_w = \Psi_P + \Psi_{\Pi} + \Psi_m + \Psi_g$$

cuyos componentes son: el potencial de presión (Ψ_P), el potencial osmótico (Ψ_{Π}), el potencial mátrico (Ψ_m) y el potencial gravitacional (Ψ_g). La pared celular vegetal de una célula madura es lo suficientemente rígida, como para impedir la elongación celular y permitir que la presión hidrostática en el interior de la

célula vegetal sea alta, a diferencia de la célula animal cuya presión hidrostática es muy pequeña. El otro componente importante es el potencial osmótico generado por los solutos celulares que disminuyen la actividad del agua y por lo tanto el potencial hídrico. El potencial mátrico solo se considera en la superficie líquido-sólido, como la de un coloide (coloide: partículas sólidas de 0.002 a 1 μm de diámetro, por ejemplo, proteínas, ribosomas, organelos. La superficie de estas partículas tiende a disminuir la actividad del agua). El potencial gravitacional solo se tiene en cuenta cuando consideramos la diferencia de potencial en regiones localizadas a diferentes alturas, por ejemplo, al calcular la diferencia de potencial hídrico entre la raíz y las hojas de un árbol (Nobel, 2005). La suma de estos componentes da como resultado el potencial hídrico y su diferencia entre los tejidos o células permite saber hacia donde se moverá el agua o si un tejido se encuentra en condiciones de déficit hídrico. Cuando una hoja o un tallo están turgentes significa que el potencial de presión es mayor que su potencial osmótico. Cualquier proceso de deshidratación provocará la salida de agua desde la célula hacia el apoplasto y como consecuencia disminuirá el potencial de presión y aumentará el potencial osmótico (en valores negativos), por lo tanto la suma de ambos da como resultado una disminución en el potencial hídrico, lo cual se observa en la pérdida de turgencia celular. Esta salida de agua proviene del citoplasma y de la vacuola, que constituye la mayor parte del volumen de la célula vegetal (80-95% del volumen celular). El transporte de agua entre estos dos compartimentos se produce por la presencia de acuaporinas (canales de agua) integradas en la membrana del tonoplasto (membrana vacuolar).

El déficit hídrico o la sequía son los estreses asociados directamente con la disminución del potencial hídrico celular. Sin embargo, hay otros estreses que provocan el mismo efecto de deshidratación en la célula, como son el congelamiento, el estrés osmótico y la salinidad. Las temperaturas de congelamiento (menores a 0°C) provocan la formación de hielo en el espacio intercelular, en los vasos del xilema y las traqueidas, provocando la salida de agua desde la célula hacia el espacio extracelular y la deshidratación celular. El estrés osmótico, generado por una solución hiperosmótica, provoca la salida de agua desde el interior de la célula debido a la disminución del potencial hídrico en el medio. Los efectos del estrés osmótico a nivel celular dependerán del tipo y del tamaño de soluto que provoca el estrés, si son pequeños (sales, manitol, PEG < 6000) pueden penetrar a la célula, porque atraviesan la pared y la membrana celular. Los solutos de mayor peso molecular (PEG \geq 6000, dextranos \geq 6500) son impermeables a la pared celular y provocan la salida de agua por la disminución del potencial hídrico en el exterior de la célula de forma similar a lo que ocurre en el momento de la sequía (Carpita *et al.* 1979; Oparka, 1994). La salinidad también tiene un componente osmótico al que se suma el componente iónico que puede tener efectos tóxicos en la célula.

Los cambios en el volumen celular que se generan ante un cambio osmótico pueden inducir señales en la célula. Estos cambios se perciben a través de moléculas mecano-sensoras (canales iónicos), cuya

actividad promueve la entrada de iones (Ca^{+2} y K^{+}) a la célula con el fin de recuperar el volumen celular normal (Zonia y Munnik, 2007). En esta respuesta también participan las proteínas conocidas como acuaporinas (AQPs), las cuales son proteínas integrales de membrana (plasmática y de tonoplasto) que funcionan como canales de agua. Estas proteínas son activas en aquellos tejidos en crecimiento, donde el flujo de agua es muy activo; en déficit hídrico su expresión y su actividad es variable, en general se ha observado que disminuye su expresión (Bartels y Sunkar, 2005). Su actividad esta regulada por modificaciones post-traduccionales y a través de su compartimentalización, lo que permite modular el número de canales por área de membrana (Maurel *et al.* 2008). Algunos ejemplos muestran que el ácido absísico (ABA) puede regular la expresión de algunas acuaporinas en raíces de arroz durante el déficit hídrico, lo cual favorecería la captación del agua desde suelo acorde con la función del ABA como mediador de la respuesta a esta situación de estrés (Lian *et al.* 2004).

La célula vegetal en déficit hídrico

El estrés hídrico afecta la fisiología y el metabolismo de la planta, la tolerancia al estrés depende de la respuesta que se genera en la planta. Esta respuesta al estrés se produce a nivel celular y molecular y comprende principalmente un cambio en la inducción y la expresión de varios genes; así como, la regulación a niveles post-transcripcional, traduccional y post-traduccionales. Los productos génicos pueden estar involucrados tanto en la respuesta primaria (proteínas o RNAs reguladores), como en la respuesta secundaria (proteínas protectoras o enzimas, entre otras) (Ingram y Bartels, 1996; Seki *et al.* 2001; 2002 a; 2002 b; Kawaguchi *et al.* 2003; 2004; Bray, 2004; Bartels y Sunkar, 2005; Matsui *et al.* 2008).

Los genes que se expresan y cuyos productos participan en las **vías de señalización** de la respuesta a la limitación de agua son las proteínas implicadas en las vías mediadas por ABA o en las vías independientes de ABA, las cuales pueden ser cinasas, fosfatasa, proteínas G, ubiquitin-ligasas, factores transcripcionales (DREB1A, DREB2A, DREB2B, AREB, NAC, MYC, MYB, NAC)(Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006); proteínas con afinidad a Ca^{+2} , como calcineurina, entre otras. Otro grupo de proteínas de respuesta están involucradas en las funciones de **protección** y de **reparación celular**, como son las proteínas LEAs (Late Embryogenesis Abundant Proteins), las chaperonas (HSPs: Heat Shock Proteins), las proteínas de unión a RNA, las enzimas que participan en la vía de síntesis de osmorreguladores, como la prolina, la glicil-betaína (P5CS, ProDH: vía de la prolina), las enzimas de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como las enzimas: MnSOD (superóxido dismutasa dependiente de Mg), Cu/ZnSOD (superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn), peroxidasas; los inhibidores de proteasas (Bartels y Sunkar, 2005) y las proteínas que modifican la estructura de pared celular primaria y secundaria, como las proteínas ricas en prolina (PRPs: Proline Rich Proteins)(Covarrubias, 1995), las xiloglucanasas, etc.

Estos genes se expresan *de novo* en condiciones en las cuales la célula disminuye su metabolismo: la traducción disminuye y solo se sintetizan aquellas proteínas que se requieren para tolerar el estrés (Hsiao, 1970; Dhindsa y Cleland, 1975, Bensen *et al.* 1988; Bailey-Serres, 1999).

El ácido absísico (ABA): la hormona del estrés

Uno de los principales actores en la respuesta de tolerancia al estrés es la hormona ABA que por estar asociada a la respuesta a numerosos estreses ambientales se le conoce como la hormona del estrés (Daie y Campbell, 1981, Campalans *et al.* 1999; Fedoroff, 2002).

Los primeros experimentos con ABA la describieron como una hormona involucrada en la abscisión y en la inhibición del crecimiento. Esta hormona participa en múltiples eventos fisiológicos y de desarrollo en condiciones normales de crecimiento (Wasilewska *et al.* 2008), entre ellos destacan: el cerrado estomático, que previene la pérdida de agua por transpiración; la regulación del tiempo de floración y el desarrollo de raíces laterales (Bradyz *et al.* 2003; De Smet *et al.* 2006). Además el ABA cumple un papel fundamental durante la embriogénesis de la semilla, ya que modula el crecimiento del embrión y regula la síntesis de moléculas que se encargan de proteger al embrión durante el proceso de desecación (Marcotte *et al.* 1989; Finkelstein *et al.* 2002), lo cual se ha relacionado con los dos puntos de acumulación de la hormona durante la embriogénesis, el primero corresponde al ABA materno y el segundo es el que sintetiza el embrión (Yang y Zeevaart, 2006; Finkelstein *et al.* 2008). El ABA que se acumula en la fase tardía de la embriogénesis es responsable de la adquisición de la tolerancia a la desecación del embrión (Blackman *et al.* 1995) y del fenómeno de dormancia. Este efecto se observa en las mutantes de maíz que carecen de la enzima NCED (9-cis-epoxi-carotenoide dioxigenasa) que interviene en síntesis de ABA, y también en las mutantes de maíz que carecen del factor transcripcional ABI3 denominadas *viviparous14* (*vp14*) por que pierden la dormancia y germinan sobre la mazorca (Oono *et al.* 2003; Finkelstein *et al.* 2002; Taíz y Zeiger, 2003). Por otro lado, el ABA también participa en la inhibición del crecimiento cuando las condiciones ambientales son adversas, promoviendo la endodormancia de los primordios foliares de árboles caducifolios durante el invierno (Horvath *et al.* 2003) y evitando la germinación precoz de la semilla. En este sentido, el ABA también cumple un papel importante durante el establecimiento de la plántula, al quinto día desde la imbibición, la plántula *Arabidopsis thaliana* puede inhibir el proceso de germinación si percibe que las condiciones ambientales son adversas, por ejemplo si no hay disponibilidad de agua; este proceso es mediado por los factores transcripcionales ABI5-ABI3, componentes importantes de la vía de señalización de ABA (López-Molina *et al.* 2002).

El ABA se encuentra en todas las plantas en condiciones óptimas de crecimiento, aunque la concentración de su forma activa puede variar por degradación, conjugación (como ésteres de glucosa) y compartimentalización (en vacuolas y en el apoplasto), lo que permite que haya una cantidad de ABA

inactivo que puede ser rápidamente activado cuando se inicia el estrés (Cutler y Krochko, 1999; Nambara y Marion-Poll, 2005; Lee *et al.* 2006; Schroeder y Nambara, 2006). Su actividad no solo depende de su vía de señalización, sino de la interacción con otras hormonas durante el desarrollo de la planta, el estrés, la formación de la semilla y la dormancia (Koornneef *et al.* 1998; Beaudoin *et al.* 2000, Gazzarrini *et al.* 2006; Penfield *et al.* 2006). Si bien se conoce la vía catabólica y anabólica de la hormona, la(s) vía(s) de señalización no se ha(n) aclarado completamente. El uso de mutantes en la vía de síntesis de ABA o de señalización permitió esclarecer estas vías y su conexión con otras hormonas, así como dilucidar el papel que esta hormona cumple en la regulación de genes asociados con los mecanismos de respuesta a estrés (Gosti *et al.* 1999; Finkelstein y Lynch, 2000; Hoth *et al.* 2002).

Tres proteínas se han propuesto como posibles receptores de ABA, cada una de ellas interviene en procesos diferentes. Las tres son capaces de unir ABA en ensayos *in vitro*, e *in vivo* se han observado los efectos que provoca la falta de cada una de éstas proteínas en la fisiología y el desarrollo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas que se reportaron como receptores son: la proteína FCA nuclear (proteína de unión a RNA) que interviene en la transición vegetativa-floral de los meristemos (Razem *et al.* 2006); la Mg-quelatasa, que participa en la síntesis de clorofila y estaría implicada en la comunicación núcleo-cloroplasto (Shen *et al.* 2006) y la proteína GCR2 (G-protein coupled receptor 2) (Liu *et al.* 2007), que interactúa con la proteína G, GPA1 (G-protein α) y participa en la vía de percepción de ABA en los estomas, regulando el movimiento estomático y al parecer, también el proceso de germinación (Pandey y Assmann, 2004). Hasta la fecha aún se desconoce si alguno de éstos u otro participa como el receptor de ABA durante el déficit hídrico (McCourt y Creelman, 2008).

En condiciones de estrés por déficit hídrico, el ABA aumenta considerablemente en horas, no solo se utiliza el ABA almacenado (que se activa por β -glucosidasas) (Lee *et al.* 2006) sino que también hay síntesis *de novo* en las células acompañantes de los haces vasculares de las hojas, lo que permite la rápida distribución de la hormona en la planta (Christmann *et al.* 2005, 2007; Endo *et al.* 2008; Wasilewska *et al.* 2008). El aumento de ABA es generalizado en la planta, por ejemplo, hojas de *Phaseolus* cortadas y deshidratadas tienen un aumento de 45 veces la concentración de ABA de condiciones óptimas en solo 5 h de deshidratación y al rehidratar se revierte a la concentración basal en solo 1 h (Yang y Zeevaart, 2006). Experimentos similares en tomate detectan un aumento de ABA de 23 veces durante la deshidratación (Bray, 1988). El aumento de ABA durante el déficit hídrico induce la expresión de muchos de los genes por la vía dependiente de la hormona, para ello se inducen factores transcripcionales que son los que modulan su expresión; aunque la expresión de muchos otros genes se regula por una vía independiente de ABA. Por esta última vía el único factor transcripcional descrito hasta el momento es DREB1 (del inglés: Drought Response Element Binding protein), que reconoce elementos en *cis* del tipo DRE. Un estudio comparativo realizado con microarreglos, en plantas de *Arabidopsis*

sometidas a diferentes estreses (deshidratación, frío y sal) o al tratamiento con ABA, muestra que de los 299 genes que se inducen en deshidratación, 153 (52%) se incrementan por ABA. El resto de los genes que se inducen lo hacen por una vía independiente de ABA (Seki *et al.* 2002b). Aunque también cabe mencionar que la expresión de algunos de estos genes de respuesta puede ser regulada por ambas vías, probablemente dependiendo de la severidad del estrés o del tejido en el cual se expresen.

Es interesante notar que consistente con la función del ABA como inhibidor del crecimiento, esta hormona también tiene un efecto sobre el proceso de traducción. Plantas tratadas con ABA muestran un perfil polisomal muy similar al que se obtiene de plantas sometidas a déficit hídrico, el cual muestra una clara inhibición en la síntesis de proteínas correlativo con una disminución en la abundancia de polisomas (Bensen *et al.* 1988).

La planta en condiciones de estrés: consideraciones generales

Las plantas sometidas a déficit hídrico muestran cambios en el crecimiento y en el desarrollo, dependiendo del tiempo y de la severidad del estrés. Diariamente, al mediodía en época de calor, las plantas sufren de estrés hídrico y cierran los estomas para evitar la pérdida de agua y para alcanzar su estado hídrico óptimo durante la noche. Este estrés, que se produce diariamente y cuya respuesta es modulada por ABA, no produce un efecto fenotípico en la planta. En cambio, durante las estaciones secas, las lluvias pueden llegar a ser insuficientes durante un largo período, provocando un cambio drástico y visible en las plantas muy alejado de un crecimiento óptimo. El efecto temprano que se observa es la disminución en el tamaño de las hojas, debido a una menor expansión celular, pero que ayuda a tener una menor superficie de evaporación. La altura de la planta disminuye, por que la parte aérea detiene su crecimiento, pero la raíz sigue creciendo aún en condiciones de estrés, como se ha observado en plantas de soya y maíz sometidas a condiciones de déficit hídrico por tiempos largos (Creelman *et al.* 1990; Sharp *et al.* 2004). Esto se debe, en parte, a que durante el déficit hídrico los fotosintatos tienden a moverse hacia la raíz, a menos que la planta tenga flores en cuyo caso se ha observado que la planta privilegia como destino de translocación de carbono y nitrógeno al fruto y en particular, destina el carbono a la formación de las semillas. En maíz se ha observado la importancia que tiene el aporte de fotosintatos durante la fecundación o durante la formación del embrión; si en esta etapa se interrumpe el movimiento de carbono (glucosa y fructosa) hacia el grano o se inactivan las invertasas del destino no se forman los granos y abortan las semillas (Zinselmeier *et al.* 1999).

La tasa fotosintética también se afecta en la planta y si el estrés es severo se inhibe el proceso. Esta inhibición proviene en gran parte del daño que sufren los cloroplastos y no tanto por la disminución en el intercambio de CO₂ (Taíz y Zeiger, 2003).

En algunas especies vegetales el mecanismo que se favorece para aliviar la pérdida de agua es el ajuste

osmótico, que consiste en incrementar la concentración intracelular de algún o algunos solutos compatibles (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos). Estos solutos no intervienen en el metabolismo de la planta y su aporte es hacer más negativo el potencial osmótico, lo cual disminuye el potencial hídrico de la célula y, por lo tanto, se evita la pérdida de agua y la célula puede mantener su turgencia a potenciales hídricos más bajos. La síntesis de estos compuestos se induce durante el estrés, por este motivo se han estudiado estas vías con fines biotecnológicos para tratar de obtener tolerancia al estrés. Tal es el caso de la sobre-expresión de la vía de síntesis de prolina (Kishor *et al.* 1995; Hong *et al.* 2000) y de glicin-betaína (Chen *et al.* 2008), a través de lo cual se han llegado a obtener plantas tolerantes al déficit hídrico a nivel experimental. La sobre-expresión de los genes de síntesis de trealosa de levadura en tabaco (bajo un promotor constitutivo o uno inducido por la sequía) ha demostrado mejorar la tolerancia de las plantas a estrés abiótico (Karim *et al.* 2007), lo mismo sucede con plantas de arroz transformadas con los genes de síntesis de trealosa (*otsA* y *otsB*) de *E.coli* (Garg *et al.* 2002). En ambos casos se observó que si bien la cantidad de trealosa solo aumenta entre 3-10 veces con respecto a la silvestre, es posible obtener tolerancia a una menor disponibilidad de agua. Estos resultados indican que, al menos en estos casos, no es la acumulación de trealosa la responsable de conferir tolerancia como osmorregulador y sugiere que el efecto de la trealosa es a través de su actividad con señalizador en el metabolismo de carbono o de la actividad reguladora de alguna de las enzimas involucradas en la vía biosintética.

Proteínas LEAs.

Durante el déficit hídrico hay un grupo de proteínas que se inducen como respuesta temprana a la deshidratación, este grupo de proteínas se denomina LEAs (por sus siglas: Late Embryogenesis Abundant proteins) y se describieron por primera vez como proteínas que se acumulaban abundantemente durante la embriogénesis tardía del algodón (Dure L 3rd, *et al.*, 1981; 1989; 1993). La mayor parte de las proteínas LEAs se pueden definir dentro de un grupo mayor de proteínas denominado **hidrofilinas** (Garay-Arroyo *et al.* 2001; Battaglia *et al.* 2008). Las hidrofilinas se caracterizan por ser proteínas hidrofílicas con un porcentaje mayor al 6% de glicinas en su estructura primaria. Son proteínas pequeñas, que no poseen o están sub-representados los aminoácidos triptófano y cisteína. Esta familia de proteínas se divide en 7 grupos (Battaglia *et al.* 2008) de acuerdo con la similitud de su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación permite distinguir motivos conservados en las distintas especies. Seis de estos 7 grupos son hidrofílicos (Grupo 1, 2, 3, 4, 6 y 7) y podrían ser considerados como de las LEAs típicas, mientras que uno de ellos es hidrofóbico y a estas proteínas se las considera atípicas (Grupo 5). El análisis *in silico* de la secuencia primaria en las LEAs da por resultado una estructura secundaria desplegada o con cierto grado de estructuración en ambientes específicos. Estudios realizados con dicroísmo circular en una LEA del grupo 1, han demostrado que pueden tener un porcentaje de α -hélices

(8% en 0.1% de SDS) y pueden adquirir una estructura de poli-L-prolina de tipo II al disminuir la temperatura en la que se realiza en experimento (14% a 20°C) (Soulages *et al.* 2002). Se propone que las proteínas no estructuradas podrían ser funcionalmente flexibles en condiciones de estrés celular. Además se ha observado, que muchas de ellas, adquieren estructura cuando encuentran y se unen a su blanco, como es el caso de la proteína de unión al factor transcripcional CREB (Dyson y Wright, 2005). Si bien se desconoce hasta el momento la(s) función(es) de las LEAs, todas ellas se inducen y se expresan en alguna condición de estrés hídrico, ya sea modulado por el ambiente o por una condición de deshidratación fisiológica programada, como en la semilla, en el polen o en los primordios foliares durante la endodormancia. También se ha detectado su expresión en los tejidos en activo crecimiento aún en condiciones de riego óptimo, por que estos tejidos tienen potenciales hídrico bajos más bajos que el resto de la planta (Colmenero *et al.* 1999).

Incluso debemos considerar que algunos grupos de proteínas LEAs se encuentran representados en organismos diferentes a las plantas pero se caracterizan por que están expuestos a una deshidratación extrema en algún momento de su vida, como los es el caso de los organismos anhidrobióticos. Estos organismos acumulan proteínas homólogas a las proteínas LEAs del grupo 3, además de acumular trealosa, como mecanismos de tolerancia a la deshidratación. Algunos ejemplos son: el crustáceo *Artemisia franciscana* (Hand *et al.* 2007), nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Aphelenchus avenae* (Browne *et al.* 2004), rotíferos (Tunnacliffe *et al.* 2005) y tardígrados (Hengherr *et al.* 2008).

Por estas razones y por las características hidrofílicas de estas proteínas, las cuales podrían considerarse como moléculas que “mimetizan” al agua, su función durante el déficit hídrico celular debería estar asociada con la protección a nivel celular, pero la forma o el blanco al que protegen podría ser muy diverso y esto podría deberse al amplio abanico que existe entre los grupos de las proteínas LEAs. Dentro de esta familia encontramos 7 grupos cuyos integrantes están altamente conservados en cada uno de los grupos. Esta conservación esta dada por motivos dentro la proteína que en algunos casos pueden repetirse a lo largo de la secuencia (secuencia de 20-meros en el grupo 1, motivo K en el grupo 2 y la secuencia de 11-meros en el grupo 3 (Battaglia *et al.* 2008).

Las funciones propuestas para estas proteínas son diversas:

- Algunas proteínas podrían formar estructuras secundarias de tipo α -hélice anfipática, como es el caso de la proteína LEA76 (Grupo 3) que recuerda a la estructura las α -sinucleínas. Estas proteínas tienen dominios de unión a lípidos de clase A2, por lo que se propone que algunas proteínas LEAs podrían interactuar con membranas (George, 2001). Con estos antecedentes, se observó la interacción de una dehidrina de maíz, DHN1 (LEA del grupo 2), con liposomas, aunque se debe hacer la salvedad que la composición de estos liposomas es muy diferente a la que se encuentra en plantas (Koag *et al.* 2003).
- Para las LEAs del grupo 2 también se propone una función antioxidante y estaría dada por la propiedad

de unir iones metálicos (Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} y no Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2}), debido al número de histidinas que poseen en sus secuencias. La sobre-expresión de la dehidrina, CuCOR19, de *Citrus unshiu* en tabaco evita el daño producido por tratamientos de frío. La expresión de las dehidrinas durante el déficit hídrico le posibilitaría a la célula contender con el aumento de iones que provoca la deshidratación celular, pudiendo reducir su toxicidad y disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (Hara *et al.* 2003; 2005).

- Otra función propuesta es la de evitar la desnaturalización de proteínas durante el déficit hídrico. Esta actividad de protección se ha ensayado *in vitro*, midiendo la actividad de una enzima sensible a la deshidratación (lactato (LDH) o malato deshidrogenasa (MDH)), luego de un ciclo de secado al vacío y posterior rehidratación (o con ciclos de congelado-descongelado), con el agregado o no, de distintas proteínas hidrofílicas. Estos ensayos demostraron que algunas proteínas LEAs agregadas en cantidades equimolares con la enzima, antes de la deshidratación, son capaces de mantener la actividad de LDH o MDH luego del tratamiento, a diferencia de otras proteínas (BSA) o de trealosa que deben agregarse en proporciones mas altas para prevenir la inactivación (Reyes *et al.* 2005).

- Dado el alto porcentaje de glicinas, las proteínas LEAs podrían interactuar con ácidos nucleicos. Estudios preliminares mostraron que la proteína PvLEA18 es capaz de interactuar con RNA, pero no ha sido demostrada su especificidad por algún tipo particular de ácido nucleico (datos no mostrados, Battaglia M).

- También es interesante remarcar que la función de las proteínas LEAs no solo sería importante durante el momento en que la célula está bajo estrés hídrico, sino que su papel puede ser igual de importante durante la rehidratación. En ese momento también es importante resguardar y mantener las estructuras de las moléculas y de las membranas para evitar la pérdida de función o el daño estructural.

- Además como antes mencionábamos organismos que toleran la desecación, como las briofitas o las plantas de resurrección (*Craterostigma* sp), acumulan proteínas LEAs previo a la desecación, junto con distintos azúcares (Oliver *et al.* 2000), como un mecanismo para tolerar la desecación.

II. La regulación post-transcripcional por la región 3' no traducida.

Breve reseña sobre la formación de las regiones no traducidas

El proceso de transcripción o síntesis de un mensajero es un proceso altamente regulado; una vez sintetizado existen múltiples eventos de regulación que llamamos post-transcripcionales y que pueden modular la localización, la estabilidad y la traducibilidad de un mensajero (Kuersten y Goodwin, 2003). Todos estos eventos sumados constituyen la expresión de un gen.

El núcleo es el lugar de síntesis y de maduración del mensajero. La RNA polimerasa II transcribe mucho más allá de lo que será el extremo 3' del mensajero. Durante la transcripción, el extremo 5' es procesado, adquiere la estructura del "cap" (m⁷G-cap), en el cual una G se adiciona pero en una dirección 5'→5' y es modificada enzimáticamente por 2 o 3 metilaciones sucesivas. El tipo y número de metilaciones caracteriza a los mensajeros. La mayor proporción de los mensajeros en plantas tienen la estructura del cap en su extremo 5' y adquieren un complejo proteico de unión nuclear (nCBPs), formado por las proteínas CBP20 y CBP80. Mutaciones en *Arabidopsis* de los genes *CBP20* (Papp *et al.* 2004) y *CBP80* (Hugouvieux *et al.* 2001) muestran un fenotipo hipersensible a ABA y aunque estos genes son de copia única, la falta de alguno de ellos no es esencial para la viabilidad de la planta. Este complejo CBPs es importante para el procesamiento de los mensajeros en el núcleo y para la biogénesis de microRNAs, en el primer caso el complejo CBP20-CBP80-mRNApoli(A)⁺ interactúa con el "spliceosoma", en el segundo caso, el pri-miRNA-CBP20-CBP80, lo hace con el complejo de procesamiento (DCL1-HYL-SE) (Laubinger *et al.* 2008).

También debe formarse el extremo 3' el cual es parte importante del mensajero maduro. La formación y el procesamiento de la región 3' son guiados por una serie de secuencias que se encuentran en la región terminadora no traducida y de enzimas y proteínas que actúan en *trans*, reconociendo estas secuencias y llevando a cabo el corte y la poliadenilación del mensajero. Una vez exportado hacia el citoplasma, la secuencia del poli(A)⁺ es un elemento importante del mRNA por que no sólo lo hace más estable sino que además permite el reclutamiento de los factores de inicio de la traducción y de las PABPs (PABPs: Poly(A) binding proteins) que son proteínas reclutadas sobre la secuencia del poli (A)⁺.

El procesamiento de la región 3' de un mensajero en el núcleo es guiado por secuencias, en mamíferos la señal AAUAAA marca el sitio de corte y esta localizada de 30 a 50 nucleótidos hacia arriba del sitio de corte para las endonucleasas. En mamíferos y levaduras la secuencia canónica AAUAAA está muy conservada; en tanto que en plantas esta secuencia puede estar pero no es esencial. Mediante el estudio *in silico* se han establecido las secuencias o las firmas importantes para el procesamiento en plantas. Sin embargo no se han encontrado secuencias canónicas, sino que se reconocen zonas ricas en un nucleótido en particular. Al tener mayor información sobre los genomas de plantas estos estudios informáticos se han hecho más robustos, dado que se pueden analizar un número mayor de mensajeros de distintas especies (Graber *et al.* 1999).

Las secuencias que se identificaron inicialmente a partir de los genes de plantas que se tenían hasta ese momento (1999), se denominaron FUE, NUE y CS. El motivo **FUE** (far upstream element) consiste en 50 o más nucleótidos del sitio de corte y es rico en U+G. El motivo **NUE** (near upstream element) consiste de 30-10 nt del sitio de corte, es una región rica en A, que puede contener a la secuencia AAUAAA. El motivo **CS** (cleavage site) es el sitio de corte y poliadenilación, rico en U (Li y Hunt, 1997; Graber *et al.* 1999). Un análisis informático posterior usando el genoma de *Arabidopsis*, considera al FUE, al NUE, al sitio de corte como rico en U, pero además propone que la estructura del RNA en el sitio de corte es importante para su localización (Loke *et al.* 2005).

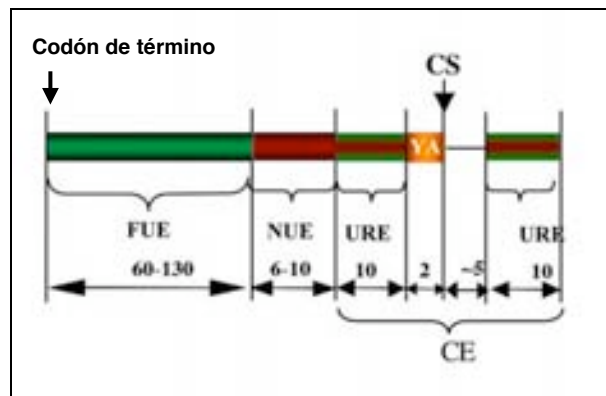


Figura 1: Esquema de la secuencias o zonas requeridas para el procesamiento de la región 3' no traducida de un mensajero en plantas (Loke *et al.* 2005). En la figura se muestran los elementos más alejados (**FUE**: far upstream element), y cercanos (**NUE**: near upstream element), al sitio de corte (**CS**: cleavage site) que esta rodeado de una zona rica en Uridina (**URE**: Uridine Rich element), que permite el procesamiento correcto del mensajero, **CE**: elementos de corte (cleavage elements).

El procesamiento del extremo 3' también requiere la adición del poli (A)⁺, catalizado por la enzima poli (A)⁺ polimerasa (PAP), la cual adiciona *n* residuos de adenina (A), al extremo 3'OH del mensajero. Sobre el poli (A)⁺ se asocian proteínas denominadas proteínas de unión al poli (A)⁺ (PABPs) (Un monómero de PABP de 70 kDa se une cada 10-20 bases de poli (A)⁺ (Lewin, 2004)). Finalmente se requiere remover los intrones; en este proceso interviene el complejo del “splicing”. Este procesamiento da lugar a un RNA maduro y las proteínas que lo acompañen marcarán su futuro en el citoplasma.

Las PABPs se necesitan para que el mensajero pueda ser exportado del núcleo, el complejo entre poli (A)⁺ y las PABPs es central en la estabilidad y el inicio de la traducción del mensajero, ya que interactúan con los factores de inicio de la traducción (Cheng y Gallie, 2006).

Además hay proteínas que se unen a secuencias específicas en el mensajero. Estas secuencias pueden modular la función o la estabilidad del mensajero en la célula. Muchas veces estas proteínas pueden funcionar como reguladores de la traducción, en particular, existen numerosos ejemplos durante la

embriogénesis de *Drosophila* y *C. elegans*, donde se ha demostrado la presencia de elementos reguladores en las regiones no traducidas y de proteínas de unión a estas regiones, que gobiernan la expresión temporal y espacial de mRNAs durante el desarrollo del embrión (Gebauer y Hentze, 2004).

Formas del mensajero en el citoplasma

Una vez que el mensajero es exportado al citoplasma, puede estar en tres estados funcionales: activo en traducción, no traducido y almacenado en complejos de ribonucleoproteínas y en proceso de degradación unido a ribonucleoproteínas. En condiciones normales, existe un equilibrio dinámico entre estos estados o formas en las cuales se acompleja, pero en condiciones de estrés, como ocurre en plantas durante el tratamiento por calor, este equilibrio se ve alterado y pueden observarse cuerpos o gránulos que sirven para la degradación o para mantener inhibida una población transcritos. Cada uno de estos complejos, cuerpos o gránulos se diferencian por las proteínas que llevan asociadas: en los cuerpos de procesamiento (PBs) hay mensajeros en proceso de degradación y se detectan proteínas involucradas con este proceso como XRN4 (exonucleasas de tipo 5'→3') y las proteínas de decapping (decapping proteins: DCP1/2). Los gránulos de estrés (SGs) funcionan como lugares de almacenamiento, reiniciación o sitios de exportación hacia los cuerpos de procesamiento, allí pueden detectarse elementos como: eIF4E, mRNAs poliadenilados, otros factores de inicio de la traducción, proteínas ribosomales, ciertas proteínas de unión a RNA como RBP47 y UBP1 y también proteínas HSPs (heat shock proteins). Estos gránulos desaparecen cuando se recuperan las condiciones óptimas para la traducción (Nover *et al.* 1989; Weber *et al.* 2008).

Ejemplos de regulación post transcripcional por la región 3' no traducida en plantas

Los ejemplos que se conocen muestran que las regiones no traducidas, en particular la región 3' no traducida, son importantes para regular la estabilidad de un mensajero en el citoplasma. Otros ejemplos, muestran que las regiones 5' no traducidas pueden tener un papel importante en la regulación a nivel traduccional, por su secuencia, por la estructura secundaria que pueden adquirir y por que ayudan a reclutar a los factores de iniciación (Ling *et al.* 2000; Huzink *et al.* 2002; Mardanova *et al.* 2007).

En los últimos años el concepto de la regulación del mRNA ha cambiado drásticamente, antes se pensaba que una vez sintetizado su expresión solo podía modularse mediante proteínas, sin embargo, hoy sabemos que el mRNA puede ser regulado y silenciado por otros RNAs, a través del silenciamiento mediado por RNAs pequeños. Entre éstos se encuentran los conocidos como microRNAs, los cuales derivan de RNAs codificados por un mensajero, que es procesado para generar las moléculas activas que son RNAs pequeños de (miRNAs) de 21-22 nucleótidos que aparean con su mensajero blanco.

De la interacción entre el blanco (el mensajero) y el miRNA junto con el complejo proteico de RISC (RNA Induced Silencing Complex) se induce la degradación del transcrito o la inhibición de su traducción (Brodersen y Voinnet, 2006; Filipowicz *et al.* 2008). Es interesante destacar que esta regulación (la de degradación) se da mayoritariamente por la interacción del miRNA con secuencias de la región 3' no traducida de los mensajeros y que no todos los mensajeros se regulan por la vía de los miRNAs (Arteaga-Vázquez *et al.* 2006).

Regulación de la vida media de un mensajero.

Hasta ahora todos los mecanismos relacionados con la regulación de la vida media del mRNA están asociados con la presencia de elementos en *cis* en las regiones 3' no traducida. Quizás el primer ejemplo descrito en plantas sobre la regulación por la región 3' no traducidas de un transcrito es el de genes involucrados en la respuesta a auxinas, como es el caso de los *SAURs* (*Small Auxin-Up RNAs*), con una tasa de recambio tan alta, que su vida media no sobrepasa los 10 minutos. Estos transcritos se caracterizan por tener secuencias particulares, de 40 bases aproximadamente, en sus regiones 3' no traducidas, ricas en AUs (Gil y Green, 1996). Estas secuencias se denominan DSTs (DownSTream elements), son activas en diferentes especies de plantas, o inclusive en células de mamíferos.

Estudios globales de microarreglos muestran que 1% de los genes analizados (arreglo de 11000 genes de *Arabidopsis*), tiene una vida media menor a 1 hora. Estos genes cumplen diferentes funciones celulares, en particular, el mayor grupo corresponde a mensajeros relacionados con el proceso de transcripción (factores transcripcionales). En cuanto a la expresión de estos mensajeros inestables, muchos de ellos se expresan durante el daño mecánico, un segundo grupo corresponde a genes controlados por ciclo circadiano (Gutiérrez *et al.* 2002). Esto también se observó en mutantes *dst*, (mutantes en las que los mensajeros con secuencias DSTs tienen una vida media mayor que la planta silvestre), donde un alto porcentaje de los mensajeros que se ven afectados son regulados por ciclo circadiano (Pérez-Amador *et al.* 2003). Estos genes poseen elementos DSTs en su 3' no traducido, en la planta silvestre el mensajero se acumula durante el día y disminuye drásticamente en la tarde, tal es el caso de *CCL* (*CCR-Like: Cold Circadian Rhythm and RNA-binding 2-Like Protein*) (At3g26740) y *SEN1* (*SENescence associated gene 1*) (At4g35770), la vida media en ambas condiciones se modifica en la mutante *dst1* y se reflejan en la expresión regulada por ciclo circadiano (Lidder *et al.* 2005).

Otro ejemplo en el que la región 3' no traducida esta involucrada en la modulación de la vida media de un mensajero es el caso del gen de la enzima α -amilasa 3 (α -*amy-3*) de arroz. Esta familia génica es regulada por la disponibilidad de carbono; de tal forma que cuando la planta no fotosintetiza o no tiene aporte de carbono (sacarosa, para el caso de los cultivos celulares de arroz), se requiere la actividad de la α -amilasa para degradar el almidón y aportar glucosa al metabolismo. Esta regulación esta mediada

post-transcripcionalmente por el cambio en la vida media de los mensajeros que codifican para estas enzimas. En particular, la vida media del mRNA de α -amy-3, el principal componente de la familia, disminuye en presencia de sacarosa. La región 3' no traducida del transcrito presenta dos dominios ricos en AUs, con una estructura secundaria particular, los cuales son los responsables de la degradación del mensajero mediada por carbono. Aunque hasta el momento no se conoce cual es el mecanismo se sugiere que puede ser por una desadenilación del mensajero (Sheu *et al.* 1996; Chan y Yu, 1998a; 1998b).

Otro ejemplo se describió en cultivos celulares de frijol que se trataron con un elicitor (fragmentos de paredes celulares de un patógeno de frijol). Se observó que la vida media del transcrito del gen *PvPRP1* que codifica para una proteína de pared celular, cambia de forma notable ante el estímulo. En condiciones normales, la vida media del transcrito *PvPRP1* es de 60 h, en tanto que con el elicitor su vida media se acorta a 18 h (Zhang *et al.* 1993). Se demostró que este cambio en el tiempo de vida media depende de la síntesis de proteínas *de novo* y se observó que una proteína de 50 kDa es capaz de unirse a una zona rica en Us en la región 3' no traducida del mensajero. Esta proteína se induce después del tratamiento y su acumulación se correlaciona con la desestabilización del mensajero de *PvPRP1* (Zhang y Mehdy, 1994).

III. Traducción: la síntesis de proteínas y su regulación.

Traducción: la síntesis de proteínas y su regulación.

La última etapa en la expresión genética es la síntesis de proteínas. La síntesis de proteínas consta de tres etapas: la iniciación, la elongación y la terminación. Cada una de estas etapas está modulada por distintos factores proteicos; aquellos que se reclutan con el mensajero conforman el complejo de iniciación. Este complejo es necesario para la unión de cada una de las subunidades que conforman el ribosoma, primero la subunidad pequeña 40S y luego del escaneo del mensajero hasta el codón de inicio se une la subunidad grande 60S para conformar el ribosoma completo y funcional. El apareamiento del primer aminoacil-tRNA (Met-tRNA) da inicio a la cadena polipeptídica. El movimiento del ribosoma al segundo codón, la entrada del segundo aminoacil-tRNA y la formación del enlace peptídico, da comienzo a la elongación que continúa hasta alcanzar el codón de terminación. Esa es la señal para la separación del ribosoma y la liberación del péptido naciente. La traducción puede ser regulada en sus diferentes etapas, aunque, en general el principal punto de regulación es la iniciación. También debemos considerar que el proceso de síntesis de proteínas tiene un alto costo energético para la célula y cualquier evento que provoque un estrés a nivel celular (ayuno, deshidratación, calor, oxidación, etc.) inhibirá la síntesis de proteínas constitutivas y solo se mantendrá la de aquellas que servirán para tolerar el estrés.

El inicio de la traducción es una etapa altamente regulada y limitante para la traducción de un mensajero (Figura 2). En procariotas, la traducción consume gran parte de la energía celular, el 50 % de la energía que produce la célula se requiere para la biogénesis de los ribosomas y llegan a alcanzar el 50% de la masa seca celular. En eucariotas, se reduce al 5 % aunque los mecanismos regulatorios para que un mensajero inicie el proceso de traducción son mayores (Figura 2 y 3) (Nierhaus, 2004). Esta diferencia también se refleja en el número de factores de inicio de la traducción (ver Figura 2), que son solo tres en procariotas (IF3, IF2 e IF1) y que ayudan al ensamblaje del ribosoma sobre el mensajero. El inicio es simple, solo se requiere del reconocimiento de la secuencia Shine-Dalgarno por la subunidad pequeña del ribosoma y del factor IF3. El factor IF2 (dependiente de GTP) es el que introduce al fMet-tRNA, y lo posiciona correctamente en el codón de inicio. Eso permite la asociación de la subunidad grande ribosomal 50S, la liberación de los factores IF3 e IF1 y luego, con la hidrólisis de GTP y la liberación del IF2, el ribosoma queda alineado para iniciar el proceso de elongación (Hinnebusch *et al.* 2004).

En eucariotas son múltiples los factores que están involucrados en el inicio de la traducción, al menos 11 participan en plantas; estos interactúan entre sí, con el mensajero y con las proteínas que están asociadas al mensajero (ver Figura 2 y 3) (Hinnebusch *et al.* 2004).

En todo el proceso traduccional hay numerosos participantes y cada uno de ellos aporta un punto de regulación al proceso general. Desde el núcleo la mayor parte de los mensajeros se exportan con el extremo 5' modificado como m⁷GpppN (m⁷G) (5' "cap") y el extremo 3' poliadenilado (poli(A)⁺), lo cual no sólo le da mayor estabilidad al mensajero, sino que posibilitan su traducción de forma mas eficiente.

Análisis de transfección en protoplastos de tabaco, células de mamíferos y levadura, demostraron que la traducción de un mensajero aumenta considerablemente cuando el mensajero lleva los extremos modificados con m⁷GpppN (m⁷G) 5' "cap" y 3' poli (A)⁺. Este efecto siempre es sinérgico cuando se lo compara con la traducción del mensajero que lleva solo uno de los extremos modificados en cualquiera de los sistemas estudiados (Gallie, 1991). Distintas observaciones han demostrado que los extremos del mensajero pueden interactuar: en micrografías electrónicas de retículo endoplasmático rugoso, lo mismo que en ensayos *in vitro*, se han observado las estructuras circulares que toman los polisomas (Christensen *et al.* 1987; Wells *et al.* 1998). Bioquímicamente se ha comprobado que esta interacción es mediada por proteínas; el "cap" sirve como reclutador de los factores de inicio de la traducción: eIF4E (subunidad pequeña del eIF4F) y eIF4G (subunidad grande del eIF4F) al que se unen otros factores, como eIF4A y eIF3. Finalmente es la interacción entre el factor eIF4G y las proteínas PABPs, la que estabiliza este complejo de iniciación. En plantas existen dos isoformas: el factor eIF4G y eIF(iso)4G (165 y 86 kDa, respectivamente), que están presentes en los complejos de los factores eIF4F e eIF(iso)4F, respectivamente, junto con las proteínas de unión a cap eIF4E y eIF(iso)4E. Las PABPs unidas al extremo 3' de los mRNAs también interactúan con el factor eIF4B. Se necesita la interacción de todos estos factores para el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, luego, con la actividad del factor eIF4A (helicasa de RNA dependiente de ATP) el ribosoma escanea la región 5' no traducida hasta encontrar el codón de inicio de la traducción (Cheng y Gallie, 2006). Este movimiento requiere la hidrólisis de ATP (el factor eIF4A es el que cumple esta función) para romper las posibles estructuras secundarias que pueda tener el mensajero en su extremo 5'. El factor eIF4B estimula esta actividad de hidrólisis de ATP cuando interactúa con eIF4A. Para el escaneo se requiere de los factores eIF1, eIF1A, eIF4G y eIF2. Una vez que el ribosoma llega al codón de inicio AUG, el Met-tRNA se alinea con el codón y se hidroliza GTP (del GTP-eIF2), estimulado por factor eIF5. El factor eIF5B promueve la unión de la subunidad grande del ribosoma (80S), posteriormente, inicia el proceso de elongación: cada aminoacyl-tRNA se incorporará al ribosoma dependiendo de la secuencia de codones de la región codificante del mensajero y el ribosoma es el único encargado de llevar a cabo el enlace peptídico entre los aminoácidos (Hinnebusch *et al.* 2004; Cheng y Gallie, 2007).

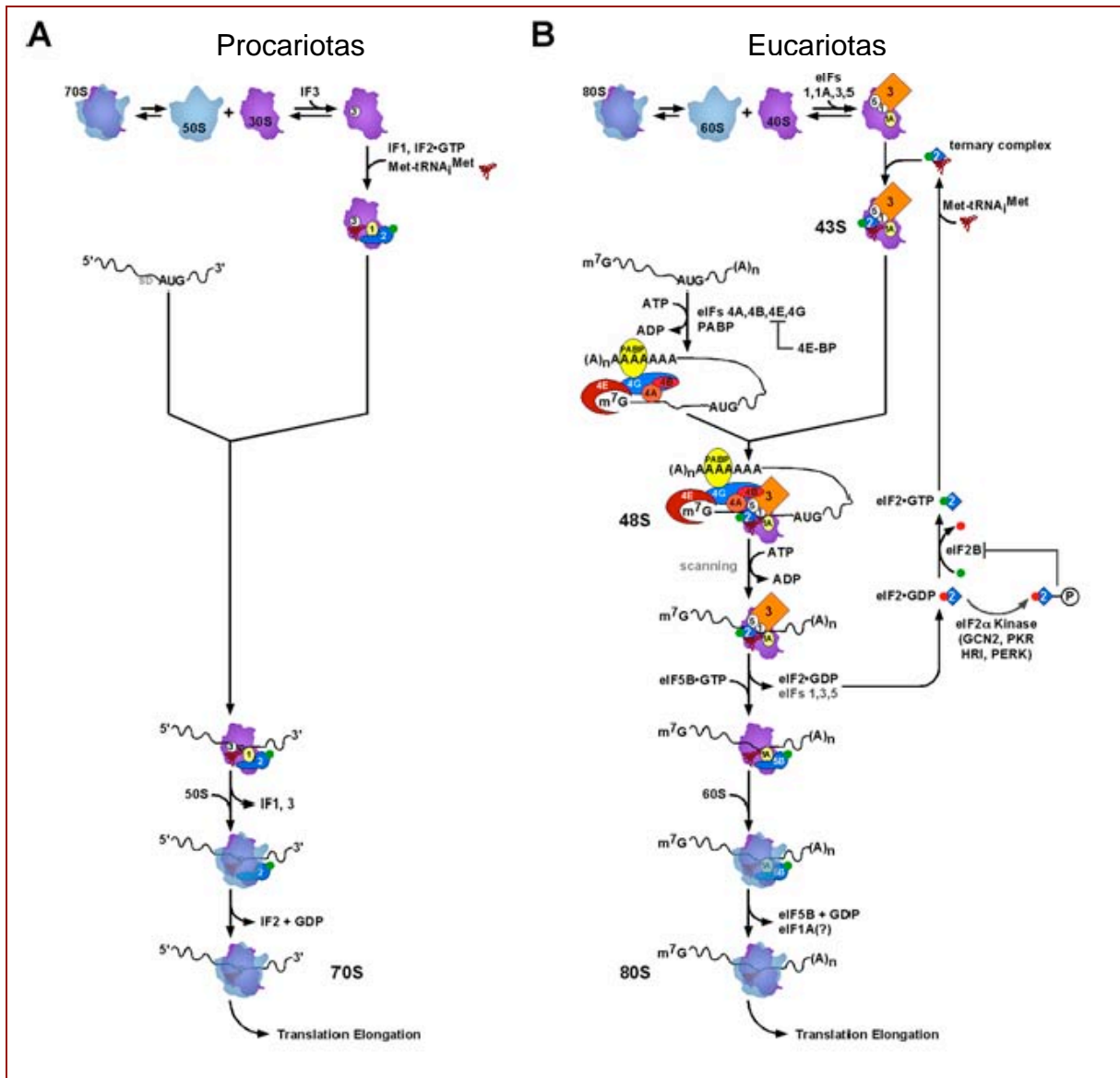


Figura 2: Vías de inicio de la traducción en procariotas y eucariotas. Las etapas individuales en procariotas (A) y eucariotas (B) se alinearon para reflejar la conservación de las reacciones y las funciones de los factores de inicio de traducción (tomado de Hinnebusch *et al.* 2004).

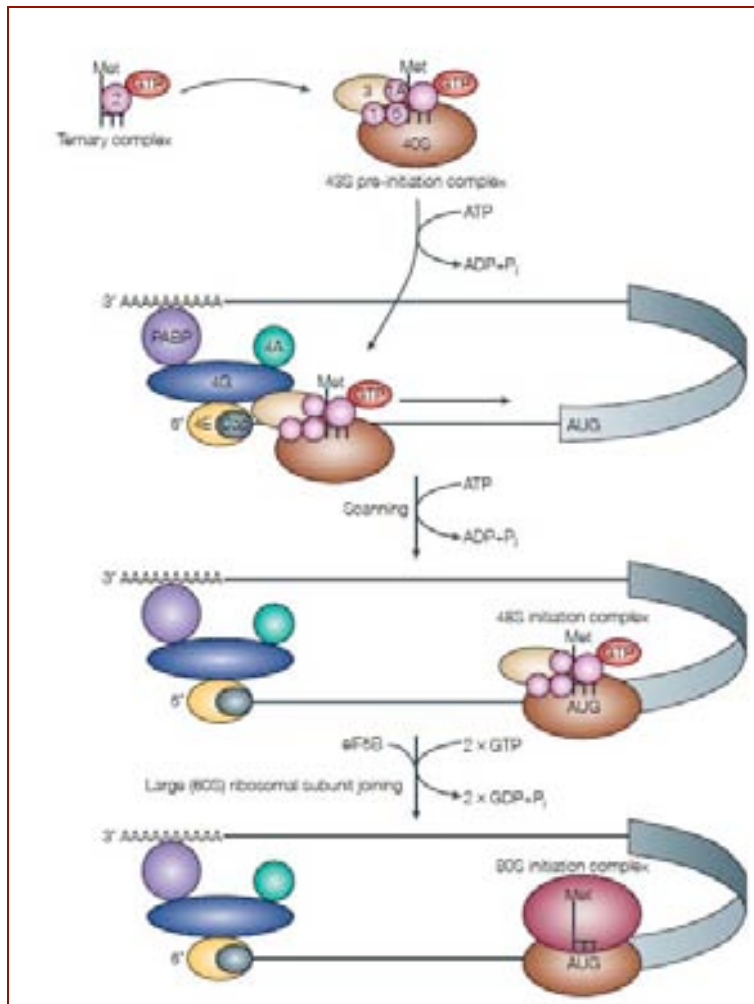


Figura 3: Detalle del inicio de la traducción general en eucariotas en un mecanismo dependiente del “cap”. Este esquema fue tomado de Gebauer y Hentze, 2004.

La traducción puede ser regulada de forma global y eso involucra la modificación en la expresión de muchos mensajeros en la célula. Para que esto ocurra se modifican post-traduccionalmente ciertos factores de inicio de la traducción.

En condiciones de estrés las células animales y vegetales responden de forma similar a través de la inhibición de la traducción, aunque en plantas el mecanismo no se conoce con detalle. Uno de los efectos que se observan en células de mamíferos sometidas a estrés es la acumulación de proteínas desplegadas en el retículo endoplasmático (RE), que se conoce como respuesta de proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés de Unfolded Protein Response), mecanismo que también se ha observado en plantas como respuesta al estrés (Cascardo *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2008). Recordemos que en este compartimiento celular ocurre la N-glicosilación de proteínas que son

secretadas de la célula (como las proteínas de pared celular) o que forman parte de la membrana plasmática. Como respuesta a la acumulación de proteínas desplegadas en el RE, se activan y se inducen chaperonas en el lumen del RE, conocidas como BiP. Se sugiere que estos dos eventos (la acumulación de las proteínas desplegadas y la activación de BiP) hacen que se activen cinasas localizadas en la membrana del RE, como PERK, que fosforilan en el citoplasma los factores de tipo eIF2 α , provocando la inhibición de la traducción.

En mamíferos y levaduras se demostró que la fosforilación del factor eIF2 α inhibe la síntesis de proteínas ya que previene la interacción de los factores eIF2-GDP y eIF2B. Este mecanismo se evidenció en levaduras crecidas en ayuno de aminoácidos o bajo estrés oxidativo generado con H₂O₂. Esta inhibición es parcialmente dependiente de la cinasa GCN2, ya que la mutante *gcn2*, en condiciones de estrés, disminuye la incorporación de aminoácidos a la síntesis de proteínas aunque menos que en la silvestre (Shenton *et al.* 2006). En plantas, sin embargo, aún se desconocen los factores y los mecanismos involucrados en este proceso regulatorio.

Otra forma de regulación de la traducción es a través del secuestro de los factores de inicio de la traducción, tal es el caso de las proteínas de unión al factor eIF4E (las 4E-BP1, 4E-BP2 y 4E-BP3), estas proteínas cuando están desfosforiladas incrementan su afinidad por eIF4E. En células de mamíferos se observó que la fosforilación depende de la cinasa mTOR que cuando se activa, libera a estas proteínas del factor eIF4E. Sin embargo, muchos genes han evitado estos mecanismos de regulación adquiriendo otros que les permite superar la regulación y que implican la síntesis de proteínas por una vía independiente de cap. En este mecanismo no se requiere del reclutamiento del factor eIF4E al cap y los ribosomas se unen directamente a un sitio de entrada ribosomal interno (IRES: Internal Ribosomes Entry Site), que se localiza en la región 5' no traducida del gen (Komenis y Wouters, 2006). Este tipo de traducción se observa en virus (picornavirus, algunos retrovirus) y también en mensajeros de mamíferos que codifican para proteínas que cumplen un rol clave en el crecimiento celular, proliferación y diferenciación (factores de crecimiento, factores de apoptosis) en condiciones de estrés celular, en las cuales la traducción dependiente de "cap" se inhibe, por ejemplo durante la apoptosis, la hipoxia, el estrés por ayuno de suero y las radiaciones (Hinnebusch *et al.* 2004). En plantas, la traducción por medio de un sitio interno se ha observado en el mensajero de la chaperona *Hsp101*, la cual se traduce a partir de un inicio de traducción independiente del "cap" en condiciones de estrés por calor. (Dinkova *et al.* 2005).

Otro tipo de regulación traduccional es la que ocurre de forma específica para uno o un grupo de mensajeros, en estos casos la traducción se regula de forma particular sin afectar la síntesis general de proteínas o el estado traduccional de la célula. En este tipo de regulación participan secuencias o elementos en *cis* en las regiones 5' o 3' no traducidas de los mensajeros blancos a los cuales se unen proteínas o microRNAs. Este tipo de regulación involucra en la mayoría de los casos mecanismos en las

que ciertas proteínas se unen al RNA y reprimen la síntesis proteica (Gebauer y Hentze, 2004; Abaza y Gebauer, 2008).

Expresión específica en órganos o durante el desarrollo modulada por la región 3' no traducida.

Ejemplos que sugieren la regulación traduccional en plantas por la región 3' no traducida.

Para el estudio de la regulación a través de la región 3' no traducida se utilizan fusiones transcripcionales en las cuales el promotor del gen se fusiona a un gen reportero con la región 3' del gen y como control, alternativamente con la región 3' no traducida del gen *nopalina sintasa (NOS)* de *Agrobacterium tumefaciens*. Los ejemplos son pocos y son los siguientes:

- La expresión genética en la semilla esta altamente regulada a nivel transcripcional, sin embargo un estudio de la expresión del gen de la enzima α amilasa de cebada utilizando protoplastos de aleurona y endospermo transformados con las regiones 5' y 3' no traducidas del gen fusionados a un gen reportero, mostraron que ambas regiones son capaces de dirigir la expresión del gen de forma tejida específica en particular en la aleurona (7 veces) con respecto al endospermo (3 veces) y no se detecta cuando se utilizan cultivos celulares de otras especies (Gallie y Young, 1994).

- el gen *AX92* en *Brassica napus* se expresa durante la diferenciación del córtex en plántula y durante la embriogénesis y post-embriogénesis. El estudio mediante fusiones del promotor del gen con el reportero *GUS* y con región 3' no traducida del gen o el 3'*NOS*, demostró que este gen es regulado por su región promotora a nivel transcripcional. Sin embargo, la región 3' no traducida del gen *AX92* afecta cuantitativa y cualitativamente su expresión: cuando tiene esta región se expresa solo en el eje embrionario y no en el cotiledón, así como en la raíz y en el córtex después de la germinación; sin embargo, su expresión en el hipocótilo es independiente de su región 3' no traducida (Dietrich *et al.* 1992).

- un caso similar es la regulación del gen *SrEnod2*, una proteína de pared celular rica en hidroxiprolina, que se induce durante la formación del nódulo en leguminosas. El estudio de la expresión del gen en *Lotus* utilizando el promotor *SrEnod2* fusionado a *GUS*, llevando la región 3'*NOS* o la región 3'*SrEnod2*, demostró que la región 3' no traducida del gen es necesaria para su expresión en nódulo. Incluso al fusionar otros promotores (*CaMV35S* mínimo, *NOS* o *leghemoglobina*), la actividad de *GUS* se detecta en nódulo y raíz específicamente cuando la región 3' no traducida corresponde al gen *SrEnod2*. Al parecer la regulación se da a nivel post-transcripcional ya que si se coloca la región en otra dirección o localización en la construcción química no se detecta el efecto (Chen *et al.* 1998).

- en las plantas *C4*, como *Flaveria bidentis* y amaranto se ha observado que el gen *RbcS* que codifica para la subunidad pequeña de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxidasa (nuclear) (*RbcS1*), tiene un patrón de expresión particular que concuerda con su metabolismo *C4*. Este gen se expresa abundantemente en las células de la banda que rodean a los haces vasculares (bundle sheath) y decrece

su expresión en las células del mesófilo. Plantas de *Flaveria* que expresan el gen *GFP* fusionado al promotor 35S y con las regiones 5' y 3' no traducidas del gen *RbcS1*, muestran una expresión tejida específica que no está dirigida por la región promotora sino por las regiones no traducidas del gen, sugiriendo que la regulación está dada post-transcripcionalmente. El mensajero se detecta principalmente en las células que rodean a los haces vasculares (bundle sheath), mientras que ni el mensajero (ni la proteína) se detectan en las células del mesófilo. El control de este experimento fueron plantas transformadas con el promotor 35S fusionado al reportero GFP pero sin las regiones no traducidas del gen *RbcS1*. En estas plantas se observó el mRNA y proteína en toda la hoja, por lo tanto las regiones no traducidas del gen estarían modulando la estabilidad del mensajero en tejidos específicos de la planta. Si ahora se utilizan estas construcciones para transformar plantas de amaranto (otra planta con metabolismo C4) se observa el mismo efecto en la hoja: la estabilidad mensajero varía en los distintos tejidos de la hoja y depende de la presencia de las regiones 5' y 3' no traducidas, pero además aumenta la eficiencia traduccional, tanto en la actividad del reportero *in vivo* (en este caso GUS) como en ensayos de traducción *in vitro*. (Patel *et al.* 2004; 2006).

- otro ejemplo lo constituye la enzima glutamina sintetasa (GS1). Esta enzima es necesaria para la asimilación de nitrógeno en plantas y su expresión está altamente regulada. Se ha demostrado que la región 3' no traducida del transcrito es responsable de la regulación a nivel post-transcripcional. En este caso, el recambio del transcrito es modulado por la relación carbono/nitrógeno, al mismo tiempo que se inhibe la traducción de proteína por nitrógeno (Ortega *et al.* 2001; 2006).

Traducción selectiva en condiciones particulares: stress y desarrollo

La traducción es un proceso altamente regulado en la célula por múltiples factores, razón por la cual, la cantidad de proteína que se sintetiza no solo depende de la cantidad de mensajero presente en la célula, sino también de los procesos post-traduccionales que regulan el estado del mensajero en el citoplasma. Estos mecanismos de regulación determinan si el mensajero se traduce, se degrada o se mantiene inactivo hasta encontrar el momento óptimo para su traducción. Para que un mensajero pueda ser traducido requiere estar asociado a factores proteicos que de forma ordenada, interactúan con el mensajero para formar el complejo de iniciación, que se requiere para la asociación de las subunidades ribosomales y la posterior síntesis de la proteína.

Esta regulación es particularmente sensible a las condiciones metabólicas y fisiológicas de la célula; la inhibición del proceso global de la traducción es una respuesta común en todos los organismos cuando se someten a diferentes condiciones de estrés. En estas condiciones la célula necesita adaptarse a la nueva situación y se puede observar más claramente el proceso de traducción selectiva, que implica la reducción en la síntesis proteica global y la traducción específica de aquellas proteínas involucradas con la respuesta de tolerancia al estrés (Bailey-Serres, 1999).

La traducción selectiva en plantas ha sido caracterizada particularmente en plantas sometidas a condiciones de **déficit hídrico** (Hsiao, 1970; Dhindsa y Cleland, 1975; Rhodes y Matsuda, 1976; Mason, 1988, Kawaguchi *et al.* 2004). En estas condiciones la síntesis de proteínas disminuye con respecto a condiciones de riego óptimo (Dhindsa y Cleland, 1975; Rhodes y Matsuda, 1976), lo cual resulta evidente por la reducción de la fracción polisomal y el incremento de las fracciones monosomales debido a la desagregación de los polisomas. En coleóptilos de maíz sujetos a déficit hídrico, esta inhibición puede ser detectada 30 minutos después de iniciado el estrés y solo se requiere de una hora de rehidratación para recuperar los complejos polisomales (Hsiao, 1970). También se ha observado, en plántulas de soya, que las zonas que son más activas traduccionalmente en condiciones óptimas de riego, son las zonas de crecimiento comparadas a las zonas ya diferenciadas o maduras. Cuando las plántulas se someten a estrés, son las zonas de crecimiento las que reducen mayormente su contenido polisomal. Esta disminución en la tasa traduccional es uno de los factores que afecta la tasa de crecimiento de la plantas durante el estrés (Mason, 1988).

El tratamiento con la hormona **ABA** de plántulas de soya provoca un efecto similar al producido durante el estrés hídrico sobre la población polisomal (Bensen *et al.* 1988).

Otros estreses tienen la misma consecuencia en la población polisomal: la **hipoxia** o estrés anaeróbico, tiene este efecto en raíces de maíz a la hora de iniciado el estrés (Bailey-Serres y Freeling, 1990). El efecto que se observa es la disminución en el contenido polisomal, al mismo tiempo que los mensajeros de los genes que inducen su expresión durante el estrés se detectan en la fracción polisomal, como lo describiremos para *Arabidopsis*. En experimentos realizados en protoplastos de maíz cultivados en condiciones de anoxia, utilizando distintos fragmentos de la región 5' no traducida con y sin la región 3' del gen *Adh1* (*alcohol deshidrogenasa1*) fusionados a un gen reportero, mostraron que la región 5' no traducida (146 bases) junto con un fragmento del inicio de la zona codificante son importantes para la expresión del gen reportero en condiciones de anoxia. El efecto que se observa en la expresión debido a las regiones no traducidas del gen no dependen de la vida media del mensajero, se requieren para mantener y aumentar la traducción en condiciones de anoxia (Bailey-Serres y Dawe, 1996). En plantas de *Arabidopsis* se ha detectado una disminución del 36% en la fracción polisomal y un aumento del 33% en la fracción monosomal 12 h después de iniciado el estrés (Branco-Price *et al.* 2005). A pesar del efecto negativo sobre la traducción global es posible detectar la traducción de algunos transcritos que son necesarios para tolerar el estado de hipoxia; tal es el caso del mensajero *Adh1*, el cual además de acumularse por efecto transcripcional se mantiene cargado en polisomas, lo cual permite su traducción de forma eficiente (Fennoy y Bayley-Serres, 1995; Fennoy *et al.* 1998).

El estrés **oxidativo también** provoca una inhibición de la traducción. El análisis de este proceso en levaduras tratadas con H₂O₂ mostró que esta inhibición se da por dos vías: una independiente y otra

dependiente de la cinasa, GCN2, la cual es capaz de fosforilar al factor de inicio de la traducción, eIF2 α . Si bien a concentraciones bajas de H₂O₂ (0.2mM) se observa la traducción de ciertos mensajero, a concentraciones mas altas el efecto es diferente, no se incrementa la síntesis de proteína sino que los mensajeros quedan asociados a los polisomas, sugiriendo que esta asociación estaría protegiendo la integridad de los mensajeros para permitir su síntesis cuando acaba el estrés (Inhibición en la elongación) (Shenton *et al.* 2006).

En el caso del estrés por **frío** los efectos que se han reportado sobre la traducción son variables. Como en todos los estudios sobre condiciones de estrés es muy importante definir las condiciones experimentales. Cuando se trabaja con estreses por temperatura, una variación por debajo o por encima de las condiciones de crecimiento normal provocan un estrés, sin tener que llegar a temperaturas demasiado extremas. Así, un tratamiento de 15 °C a una planta que normalmente crece a 30 °C, como puede ser arroz, ya se considera un estrés por frío. Bajo estas condiciones se ha observado que si las plantas se someten a bajas temperaturas, se promueve una disminución de la síntesis de novo de proteínas, detectada a través de la incorporación de metionina marcada en proteínas totales en comparación con plantas control que fueron crecidas en condiciones óptimas. Sin embargo, como en el caso anterior, también se detectan nuevas proteínas que son las que se traducen de forma específica en respuesta al estrés por frío (Hahn y Walbot, 1989). Otros experimentos sugieren que un periodo de aclimatación anterior al estrés evitan la disminución en la población polisomal (Laroche y Hopkins, 1987).

En el caso del estrés por **calor** se detecta el mismo efecto inhibitorio sobre la traducción, fenómeno que ha sido ampliamente estudiado en diferentes organismos. El mecanismo por el cual se da la traducción selectiva de las proteínas de respuesta a calor o HSPs en condiciones de estrés por altas temperaturas ha sido caracterizado y presenta características particulares asociadas a la región 5' no traducida a sus transcritos, que involucran un inicio de traducción alternativo. En este sentido se ha demostrado que la traducción de la proteína Hsp101 se produce a través de un mecanismo alternativo que es independiente del cap, que implica el inicio de la traducción por un sitio interno de entrada de los ribosomas (IRES), el cual es independiente del factor eIF4E, requerido para una traducción dependiente de "cap". Esto hace que estas proteínas que son tan importantes para la tolerancia al estrés puedan ser traducidas aún en condiciones que son desnaturalizantes para la toda célula y en las cuales la traducción mediada por "cap" se ve disminuida (Joshi y Nguyen, 1995; Dinkova *et al.* 2005).

Hasta el momento nos hemos referido a condiciones ambientes desfavorables y cómo éstas influyen en la traducción, inhibiendo el proceso general y seleccionando aquellos mensajeros que son inducidos y cuyas proteínas se han seleccionado evolutivamente para tolerar el estrés. Si bien los elementos en la secuencia o en la estructura, así como las proteínas implicadas en la selección no se conocen del todo, existen otros procesos metabólicos o de desarrollo que ocurren en la planta y que modulan la regulación

de la traducción. Uno de ellos ocurre diariamente y es el ciclo diario de luz. El ciclo circadiano regula a nivel post-transcripcional y post-traduccionales numerosos genes nucleares y de cloroplasto implicados con el proceso de la fotosíntesis y la fijación de carbono en la planta.

Algunos de ellos claramente son regulados a nivel transcripcional por sacarosa o por **luz**, pero también se ha observado que existen mecanismos post-transcripcionales implicados en su regulación. En particular se sabe que el estado redox de la célula participa en esta regulación y experimentalmente se estudian estos cambios mediante el uso de inhibidores de los fotosistemas. Así se ha demostrado que la región 5' no traducida del transcrito *Fed-1* (*ferredoxina-1*) participa en la estabilización del mensajero y favorece su asociación a los polisomas en presencia de luz, mientras que durante la oscuridad o por tratamientos con DCMU, este efecto ya no sucede y cambia la carga del mensajero desde la zona de polisomas (luz) a monosomas (en oscuridad), lo cual tiene como consecuencia una disminución en su traducción (Petracek *et al.* 1997). Este comportamiento se ha observado en otros genes, como *pSKa10* (enzima de la síntesis de tiazol), *Cab10*, *Cab4*, *Cab16*, *LHC-1* (componentes del complejo cosechador de luz en cloroplasto), *OEC33kDa* (forma parte del complejo formador de O₂) y *anexina* (Tang *et al.* 2003).

El **ayuno** de carbohidratos también afecta no solo transcripcionalmente a la célula, sino a nivel traduccionales. Un estudio llevado a cabo utilizando cultivos celulares, los cuales fueron crecidos sin sacarosa y comparados con cultivos crecidos en oscuridad, demuestra que se modifica la carga en polisomas de 183 mensajeros algunos de ellos asociados con la síntesis de proteínas, o con la progresión del ciclo celular, la biogénesis del ribosoma y la modificación de histonas (Nicolai *et al.* 2006).

Otro ejemplo se produce en el grano maduro de **polen**, aquí describió la regulación del gen *Lat52*, que codifica para una proteína similar al inhibidor de tripsina (kunitz). La expresión transitoria o estable del promotor del gen fusionado a un reportero mostró una inducción traduccionales cuando lleva la región 5' no traducida del gen. Esta inducción es específica del grano de polen maduro, ya que cuando se normaliza por la cantidad de mensajero, la actividad muestra una inducción de 13 veces comparada con la misma construcción sin la región 5' no traducida (Bate *et al.* 1996). Es interesante remarcar que el desarrollo del polen culmina con una desecación programada, donde se alcanza la maduración del grano de polen. En este periodo hay una acumulación muy importante de RNAs (mensajeros, ribosomales y de transferencia) que se requieren en el momento de la germinación del polen, donde la rehidratación promueve la reiniciación de la traducción a partir de estos mensajeros almacenados, de manera similar a lo que ocurre en las etapas de imbibición de la semilla (Hulzink *et al.* 2002; Nakabayashi *et al.* 2005).

En los granos de polen se han encontrado varios ejemplos de genes que se regulan a nivel traduccionales; tal es el caso del gen *Ntp303*. Este mensajero se acumula en el polen maduro, pero solo se expresa en el momento de la germinación. Para evaluar la participación de las regiones no traducidas en la traducción, se realizaron construcciones que llevan la región 5' no traducida del gen fusionadas a un reportero y se

utilizaron para transformar de forma transitoria (por bombardeo) el polen en desarrollo o maduro. Claramente se pudo observar que solo en el polen en germinación hay una inducción en la actividad del reportero y que solo depende de la región 5' no traducida del gen (Hulzink, 2002)

Una de las sustancias involucradas en la respuesta al ataque de patógenos es el **metil-jasmonato** (MeJa). Esta sustancia se considera como una hormona vegetal y provoca la inducción sistémica de una serie de proteínas involucradas en la respuesta ante la infección. El tratamiento de hojas de cebada con MeJa, demostró la regulación post-traduccional de un grupo de proteínas. De manera muy interesante, pudieron detectar la síntesis selectiva de proteínas inducidas por MeJa y la represión de las proteínas constitutivas. Esta represión no se da a nivel transcripcional, sino a nivel traduccional, pero en este caso la regulación se da a través de mantener a los mensajeros asociados a los polisomas y de esta manera se evita que sean traducidos, sugiriendo que existe una inhibición en la elongación de la síntesis de proteínas. Los mensajeros son secuestrados como partículas de mensajeros-ribonucleoproteínas, como sucede durante el estrés por calor con los gránulos de estrés (Reinbothe *et al.* 1993).

Regulación por la región 3' no traducida en traducción: algunos modelos que no se han encontrado en plantas: Variación en el largo del poli (A)⁺.

Esta regulación se ha descrito en oocitos de *Xenopus*, en donde se encontró que muchos de los mRNAs maternos que tienen regiones cortas de poli (A)⁺ se mantienen inactivos (no se traducen) en el citoplasma. Estos transcritos se activan en las últimas etapas de la meiosis o después de la fertilización y para que se activen se requiere que se alargue el poli (A)⁺. Esta es una reacción citoplasmática y altamente regulada (de Moor *et al.* 2005).

Esta regulación se da a través de la región 3' no traducida, la cual, además de la secuencia canónica AAUAAA, contiene una secuencia que se denominan CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element). A esta secuencia se une un complejo conformado por la proteína CPEB y otras cuatro proteínas, las cuales se ensamblan en el citoplasma. La regulación de este complejo requiere de la fosforilación de la proteína CPEB, lo que tiene como consecuencia desensamblar del complejo la proteína PARN y activar a una poli (A) polimerasa (GL2) (que también forma parte del complejo) y que ahora puede alargar al poli (A)⁺. Se propone que esta poliadenilación induciría la traducción (Richter, 2007).

En otros organismos como *Xenopus* y *Drosophila* se ha demostrado que proteínas tipo CPEB también ejercen una regulación traduccional a través de la interacción con factores de inicio de la traducción. En plantas no se han descrito proteínas similares.

Proteínas de unión a RNA. Algunos ejemplos en plantas asociados con el estrés.

La regulación post-transcripcional puede estar modulada directa o indirectamente por proteínas que se unen al RNA. Muchas de las proteínas se caracterizan por tener una estructura modular, con múltiples

repeticiones de dominios básicos. Cada uno de los módulos tiene una unión débil a su blanco, pero la suma de las repeticiones de los dominios permite una unión de alta afinidad y especificidad para un blanco particular. Algunos de estos dominios son: RRM, KH, dsRBD, PAZ, PIWI, TRAP, Pumilio, etc. Estos dominios intervienen en procesos post-transcripcionales sumamente importantes para el procesamiento del RNA y para la regulación de la expresión génica (Lunde *et al.* 2007).

Uno de estos dominios o módulos está ampliamente distribuido en *Arabidopsis* es el de las proteínas de tipo RRM (RNA-Recognition Motif), de las cuales se han encontrado 196 proteínas. Entre las RRM están las proteínas de unión al poli (A)⁺ (PABPs), proteínas que intervienen en el “splicing” (SR y proteínas asociadas); muchas de ellas son proteínas ricas en glicina (GRPs) o arginina (Lorkovic y Barta, 2002). Si bien existen otros tipos de proteínas de unión a RNA, el grupo de las GRPs, en particular, tiene integrantes que al parecer están asociados con la respuesta al estrés abiótico en plantas (deshidratación, frío, daño, ABA, virus, UV y metales) y cuya ausencia muestra un fenotipo de sensibilidad a estrés.

Las GRPs que se unen a RNA son diferentes a las LEAs, si bien ambas tienen un alto número de glicinas en su composición, las GRPs tienen segmentos completos de glicinas mientras que en las proteínas LEAs se encuentran distribuidas a lo largo de su secuencia. Todas las GRPs tienen un dominio de tipo RRM, las GRPs de pared no poseen este dominio. En este grupo se suele incluir a las pequeñas RRM, por su tamaño pequeño más que por su similitud. El grupo comprende a 27 proteínas de las cuales ocho son las típicas GRPs (Lorkovic y Barta, 2002). Estas proteínas se caracterizan por tener hacia el N-terminal el dominio RRM altamente estructurado, (Cléry *et al.* 2008). El extremo C-terminal puede ser variable pero con repeticiones ricas en glicina. Su actividad se ha reportado en respuestas al ambiente, al procesamiento de rRNA y en algunos casos están reguladas por el ciclo circadiano.

En el caso de las Ath-GRPs se ha demostrado que los ocho genes de la familia se inducen por frío entre 5-7 veces (Kwak *et al.* 2005). Todas ellas se unen inespecíficamente a DNA (de simple y doble hebra) y a homopolímeros de RNA (A,U,C,G). La caracterización funcional de AtGRP2 (At4g13850) mostró que su sobre-expresión promueve la germinación en respuesta a tratamientos con sal y por frío (11°C), cuando se compara con plantas silvestres o con plantas silenciadas. También muestran tolerancia al congelamiento (-5°C) así como un incremento pequeño pero significativo de la actividad de enzimas que contrarrestan la concentración de ROS (Kim *et al.* 2007). AtGRP4 (At3g23830) se expresa en flores, primordios florales, pedicelos, y en silicuas. La sobre-expresión de esta proteína no confiere fenotipo visible cuando las plantas se someten a alguna condición de estrés (Kwak *et al.* 2005). Otra GRP, denominada en este trabajo como AtGRP2, (At4g38680) se expresa en respuesta a frío, durante la floración, en meristemos y durante la fecundación y embriogénesis. Su ausencia provoca alteraciones en el tiempo floral: se generan estambres aberrantes y da lugar a una alta proporción de semillas abortadas. Se ha postulado que esta proteína pudiera actuar a nivel post-transcripcional afectando el procesamiento,

la estabilidad o la exportación desde el núcleo de los mensajeros o como chaperona a nivel traduccional (Flores-Fusaro *et al.* 2007).

Durante el estrés por frío las bacterias y levaduras también acumulan proteínas de unión a nucleicos, como las CSPs (cold shock proteins). Estas proteínas se han reportado en bacterias, archea y eucariotas, inclusive en las plantas. En las bacterias son proteínas pequeñas, de 7-10 kDa, contienen el dominio de unión a nucleicos y funcionan como chaperonas de RNA que puede desplegar una doble hebra de RNA a simple hebra. Se propone que las CSPs actúan junto con las DEAD box-helicases recuperando la estructura de los RNAs desplegados y promoviendo la iniciación de la traducción en condiciones de estrés. La sobre-expresión de CspA y CspB en plantas confiere tolerancia al frío y al calor. Cuando se sobre-expresa en arroz da lugar a un incremento en el rendimiento vegetativo. En maíz su sobre-expresión promueve un aumento en el rendimiento de la producción, aún cuando las plantas se sometan a un período de sequía en campo (Castiglioni *et al.* 2008).

IV. *Phaseolus vulgaris*: un modelo sustentable.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) constituye el principal alimento en la dieta de más de 300 millones de personas, siendo la leguminosa de mayor consumo a nivel mundial (CIAT en Focus). El frijol es la mayor fuente de incorporación de proteínas, hierro, zinc, azufre y de ciertas vitaminas, en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, África y Asia. Las estadísticas de la FAO (Food and Agriculture Organization) muestran que la producción mundial de frijol (2006) alcanzó los 19.5 millones de toneladas, con un área de cultivo mundial de 26.0 millones de ha. en 113 países. El 90% de la producción mundial corresponde a países en vías de desarrollo (Figura 4), de las cuales 31,5% se produce en Latinoamérica y el Caribe (Figura 5).



Figura 4. Principales productores mundiales de frijol. Se indica el porcentaje de producción de cada país en función de la producción mundial (datos obtenidos a partir de los datos estadísticos del año 2006 en FAOSTAT).

Sin embargo, el principal problema del cultivo es su sensibilidad al déficit hídrico. Así se puede observar en la diferencia de la producción (Kg/ha) entre aquellos países donde el cultivo crece con riego artificial (1,500-1,000 Kg/ha) y aquellos en los que el cultivo crece solo con el aporte de lluvias estacionales (900-600 Kg/ha) (Figura 6). En Latinoamérica, el 73% del área cultivada es semiárida (Rodríguez-Uribe y O'Connell, 2006), lo cual genera pérdidas en su producción del frijol.

El frijol es un cultivo nativo de origen americano. Se han identificado dos grupos genéticos de frijol nativo. Uno se encuentra en Mesoamérica y se extiende desde México, por América Central hasta Venezuela y Colombia. El otro grupo genético es Andino y se extiende desde el sur de Perú hasta el norte de Argentina. Desde estos centros de origen surgen los centros de domesticación, uno de estos centros es mesoamericano y el otro andino. Esta diversificación se observa en el alto polimorfismo que presenta el frijol cuando se lo compara con la soya. México tiene una ventaja sobre otros países de ser un centro de diversificación, lo cual le permite poseer un germoplasma diverso como para encontrar variedades que difieran no solo morfológicamente, sino también por su capacidad de tolerancia a distintas condiciones de estrés (biótico y abióticos). Esta diversidad, especialmente en aquellas variedades menos domesticadas, es sumamente importante para incorporar características de interés agronómico a las variedades comerciales por medio de la genética tradicional.



Figura 5: Producción de frijol en Latinoamérica. Se muestra el porcentaje en función del total en Latinoamérica (100%) (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>).

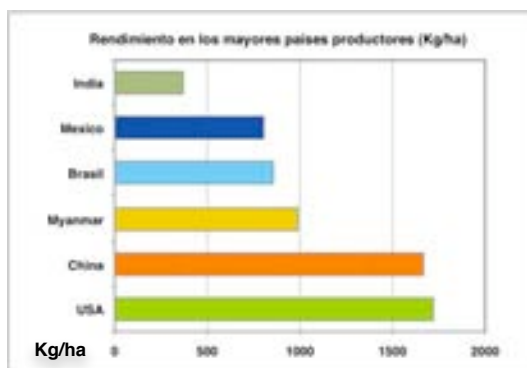


Figura 6: Rendimiento en Kg./ha en los principales países productores (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>).

El uso del frijol como un modelo de estudio, es necesario e imprescindible desde el punto de vista agrícola y social. Por un lado, para incrementar el rendimiento del cultivo en condiciones sustentables y desde el punto de vista social, por que es una fuente de nutrientes proteicos y de hierro, para la población de menores recursos económicos en un momento en el cual la producción de alimentos a nivel mundial se encarece en detrimento de la población pobre del mundo, favoreciendo la producción de soya por su alto precio a nivel mundial y de granos (maíz) u otro cultivos para la producción de biocombustibles.

El frijol como modelo fisiológico y molecular resulta de particular interés para el estudio de la tolerancia a estrés. Este interés esta basado en la sensibilidad del cultivo a condiciones de déficit hídrico, aún en aquellas variedades más tolerantes de frijol. El estudio de los mecanismos de tolerancia en una especie tan sensible, nos permitiría, en teoría, encontrar aquellos mecanismos sutiles de regulación que en una planta muy tolerante quedarían enmascarados. Además, la gran gama de genotipos que existen en México, permitiría el seguimiento de las características resistentes en nuevas variedades mediante el uso de marcadores moleculares, lo cual permitiría la selección de variedades resistentes mas rápidamente que por la genética tradicional.



ANTECEDENTES.

PvLEA-18: Caracterización y expresión.

En nuestro laboratorio fue aislada una clona de cDNA, de una biblioteca sustraída de tejido de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico con plántulas crecidas en riego óptimo, que fue denominada *rsp18* (Colmenero *et al.* 1997). Si bien en aquel momento, el análisis de su secuencia no mostraba homología con ninguna otra proteína conocida, sus características fisicoquímicas y su patrón de expresión, hicieron considerarla como una proteína LEA típica, constituyendo la primer proteína de un nuevo grupo, el grupo 6 (LEA6, PFAM 10714). A la proteína codificada en este gen se la llamó PvLEA18.

La hidrofiliidad es la propiedad fisicoquímica que de manera general caracteriza a las proteínas LEA típicas y permite clasificarlas como parte de un grupo más amplio de proteínas, las hidrofílinas. Las hidrofílinas se caracterizan por ser proteínas altamente hidrofílicas, con un contenido de glicinas mayor al 6% y un alto porcentaje de aa cargados, sin contar con cisteínas o triptófanos en su secuencia (Garay-Arroyo *et al.* 2000). Por su estructura primaria se predice que la estructura secundaria de las proteínas LEAs, es flexible debido a que no presentan una estructura secundaria estable en solución acuosa, aunque en algunos casos contienen un pequeño porcentaje de α hélice en su estructura. Sin embargo, como ocurre con las proteínas intrínsecamente desordenadas, se propone que ante un cambio en las condiciones hídricas de la célula y/o al interactuar con su blanco, estas proteínas pudieran adquirir o cambiar su estructura (Dyson y Wright, 2005). El grupo 6 de las proteínas LEAs, caracterizado por la proteína PvLEA18 de frijol, cumple con esta definición por la composición de aa (Tabla 1a, 1b y 1c) y por la predicción de su estructura, además de ser una proteína pequeña (9 kDa para frijol y 12 kDa para trigo). Estas características fisicoquímicas, generales para las hidrofílinas, tienen como consecuencia que estas proteínas no precipitan por ebullición y que muestran un desplazamiento anormal en una electroforesis desnaturante en gel de SDS-PAGE, que no corresponde con su peso molecular.

El estudio de su expresión mostró que el mensajero y la proteína PvLEA18 se inducen en la etapa tardía de la embriogénesis de frijol, acumulándose en el embrión seco. Luego de la germinación, se detecta la presencia de ambos (mRNA y proteína) hasta 5 días después de la imbibición dependiendo la región de la plántula. Una minuciosa caracterización de la expresión en plántulas de frijol en sus distintas regiones, permitió detectar la proteína aún en condiciones de riego óptimo en aquellas zonas donde el potencial hídrico (Ψ_w) es particularmente bajo, como es la zona de crecimiento de la plántula: el gancho plumular. También se detectó en las zonas meristemáticas. Si estas plántulas de frijol se someten a condiciones de déficit hídrico o se tratan con ABA, la expresión se extiende a toda la plántula y sólo disminuye cuando se restablecen las condiciones óptimas de riego. Por inmuno-histoquímica se detectó a la proteína PvLEA18, en el núcleo de células del mesófilo de plántulas estresadas (Colmenero *et al.* 1997; 1999).

Esta caracterización de la expresión en frijol pudo complementarse con el estudio de la regulación transcripcional del gen *PvLEA18* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Moreno-Fonseca y

Covarrubias, 2001). En este estudio se transformaron plantas de *Arabidopsis* con construcciones que llevan al promotor del gen *PvLEA18* (2057 pb de la región 5' hacia arriba del marco de lectura del gen) fusionado al gen reportero *GUS* y con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o con la región 3' no traducida del gen *NOS* (Figura 9). En este sistema heterólogo se corroboró el patrón de expresión observado en frijol y se detectó histoquímicamente la expresión del reportero con un mayor detalle en los diferentes estadios de desarrollo de la planta, durante el desarrollo de la semilla y luego durante la germinación. También se pudo conocer el cambio en la expresión del gen durante el desarrollo de la hoja, siendo constitutiva la presencia de la proteína en las hojas jóvenes y asociada a los haces vasculares y los hidátodos en hojas maduras. Durante el desarrollo de la flor se pudo observar su expresión en los sépalos, las anteras y en los granos de polen. En cuanto a la raíz, se pudo observar que su expresión es dependiente de luz, y en condiciones normales de crecimiento (oscuridad) se restringe al meristemo radicular. Particularmente interesante resultó su expresión durante el desarrollo de las raíces laterales, asociada nuevamente a los tejidos meristemáticos que dan lugar a la raíz lateral y al resto de la misma una vez formada. También se pudo corroborar la misma respuesta a los tratamientos de déficit hídrico y con la hormona ABA. La búsqueda de los elementos en *cis* en la región promotora del gen de frijol permitieron detectar cajas putativas para la expresión en semilla y raíz (Figura 8) (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). La expresión en raíz es dirigida por el elemento en *cis* de tipo *as-1*, descrito en tabaco. En *Arabidopsis* a este motivo se asocian factores transcripcionales del tipo TGA. Esta es una familia génica de 6 miembros, el estudio de expresión de uno de sus miembros, TGA 6, utilizando el reportero *GUS*, muestra que este gen se expresa en raíz, en hojas cotiledonales y luego se diferencia la expresión hacia los haces vasculares y los hidátodos en hojas maduras (Xiang, *et al.*1997), lo cual es consistente con el patrón de expresión en tejido vegetativo que mostró el gen *GUS* bajo control del promotor del gen *PvLEA18* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. También se encuentran elementos en *cis* relacionados con la vía de inducción por ABA y asociados con la respuesta al déficit hídrico, como son las cajas de tipo G, los potenciales elementos para la unión de factores de tipo ABI y las cajas de unión a factores de tipo MYC y MYB (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). La presencia de una caja TATA cercana al sitio de inicio de la transcripción sugiere que es un promotor TATA-dependiente para su transcripción. En la figura 8 se comparan las regiones promotoras del gen *PvLEA18* de frijol y de los genes homólogos al gen *PvLEA18* en *Arabidopsis* (At2g23110, At2g23120, At2g33690). En esta comparación solo se consideraron aquellos elementos en *cis* asociados con la respuesta a déficit hídrico, por la vía dependiente e independiente de ABA. De este análisis, se pudo observar que los promotores muestran putativos elementos en *cis* que se asocian a la respuesta por la vía de ABA (cajas G, ABRE, putativos sitios para ABI5), así como de la vía independiente de ABA (como el elemento DRE solo en el promotor del gen At2g23120). Todos los promotores son ricos en secuencias que pudieran asociar a

factores transcripcionales de tipo MYC y MYB asociados a la respuesta a estrés (Umezawa *et al.* 2006). También se vieron (pero no se muestran) elementos asociados a los factores transcripcionales que pueden dirigir la expresión a la raíz y al grano de polen. La presencia de estos elementos en el promotor coincide con la expresión de los genes homólogos al gen *PvLEA18* en *Arabidopsis* reportada en análisis de microarreglos.

Si bien la proteína ha sido caracterizada solo en frijol, se han encontrado secuencias de proteínas homólogas (*nr_s*: non redundant sequences) y ESTs (Expressed Sequence Tags) en las bases de datos públicas (NCBI; TIGR; etc). Para los ESTs hay coincidencias en el patrón de expresión ya que provienen de bibliotecas de cDNAs de semillas, de embriones, o de plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico. Hasta el momento todas las secuencias homólogas están altamente conservadas en plantas superiores: gimnospermas y angiospermas (dicotiledóneas y monocotiledóneas). El análisis de las secuencias de las diferentes proteínas con homología a la *PvLEA18* permitió distinguir algunos motivos conservados (Tabla 2 y Figura 7). Sin embargo, si bien los dominios 1, 2 y 3 están altamente conservados, existen algunos pequeños dominios que definen algunos sub-grupos en particular; por ejemplo, los motivos propios de gramíneas (trigo y cebada) (dominio 7) o los propios de las Brassicaceae (dominio 8) (Tabla 2 y Figura 7). A la fecha la distribución de las secuencias similares reportadas no permite un análisis filogenético robusto para esta familia de proteínas.

(a)

<i>Especie</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Oryza</i>
Número de aa	82	92	121	112
Peso molecular (Da)	8776.5	9712.5	12871.1	11910
pl teórico	6.09	4.59	5.26	5.41
Hidrofilicidad	-1.267	-1.059	-1.063	-0.888

(b)

<i>Especie</i>	<i>Phaseolus</i>		<i>Arabidopsis</i>		<i>Triticum</i>		<i>Oryza</i>	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
Ala (A)	8	9.8	6	6.5	13	10.7	14	12.5
Arg (R)	1	1.2	2	2.2	8	6.6	7	6.2
Asn (N)	2	2.4	3	3.3	2	1.7	1	0.9
Asp (D)	3	3.7	9	9.8	10	8.3	11	9.8
Cys (C)	0	0	0	0	0	0	1	0.9
Gln (Q)	6	7.3	5	5.4	9	7.4	11	9.8
Glu (E)	9	11	7	7.6	9	7.4	4	3.6
Gly (G)	10	12.2	14	15.2	16	13.2	12	10.7
His (H)	2	2.4	1	1.1	5	4.1	4	3.6
Ile (I)	0	0	2	2.2	2	1.7	2	1.8
Leu (L)	4	4.9	6	6.5	6	5	4	3.6
Lys (K)	10	12.2	8	8.7	5	4.1	4	3.6
Met (M)	1	1.2	3	3.3	2	1.7	2	1.8
Phe (F)	1	1.2	0	0	0	0	0	0
Pro (P)	4	4.9	7	7.6	9	7.4	9	8
Ser (S)	6	7.3	5	5.4	5	4.1	2	1.8
Thr (T)	9	11	7	7.6	9	7.4	12	10.7
Trp (W)	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr (Y)	4	4.9	4	4.3	4	3.3	4	3.6
Val (V)	2	2.4	3	3.3	6	5	8	7.1
Pyl (O)	0	0	0	0	0	0	0	0

(c)

<i>Especie</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Oryza</i>
<i>Residuos cargados positivamente (Asp+Glu)</i>	12	16	19	15
<i>Residuos cargados negativamente (Arg+Lys)</i>	11	10	13	11

Tabla 1: Características químicas teóricas (a), composición de los aminoácidos (b), porcentaje de aminoácidos cargados (c) de la proteína PvLEA-18 en frijol y en proteínas homólogas. En (b) se destaca en negritas el contenido de glicinas (%). El análisis se realizó con programa ProtParam (EXPASY).

	SECUENCIAS	MOTIVO
1	Todas	<pre> YIVQTKDLEDYKMQGTYGTEGHQEYKGRG TK RKA AQ LQV R </pre>
2	Todas	<pre> GATDAITLSCAAVSSAAXXAA SGK G F E S </pre>
3	Todas	<pre> GRLEGLTETS TV D </pre>
4	Casi todas las secuencias	<pre> DAINRQGV TV </pre>
5	Casi todas las secuencias	<pre> MEKQKERREKK AK Q KQQ </pre>
Dom		
6	<i>Pinus, Picea</i>	<pre> MAESKSKYQYSTRITAEGADSK </pre>
7	<i>Triticum, Hordeum</i>	<pre> QRGAQGGGAGVRRITDDDEAAT G QQYQR A G </pre>
8 (en lugar del 3)	<i>Brassica, Thellungiella, At2g23120</i>	<pre> ITTEKKYEQEVKND A I VAD K </pre>
9	<i>Pinus, Picea</i>	<pre> ELGRPI </pre>
10	<i>Populus</i>	<pre> EQQMEKRRYESS K </pre>

Tabla 2: Dominios conservados entre las proteínas del grupo 6 (PFAM:10714). El dominio 1, 2 y 3 se encuentra en todas las secuencias analizadas (100% n=55), mientras que los dominios 4 y 5 en algunas de ellas (62%; 34 secuencias). Los dominios 6 (n=6), 7 (n=5), 8 (n=3), 9 (n=3) y 10 (n=4) se encuentran en ciertos grupos de secuencias. Los dominios se definieron utilizando el algoritmo MEME-MAST, a partir de secuencias que provienen de un análisis de BLAST (NCBI, TIGR, etc.) realizado a partir de las bases de datos de proteínas no redundantes (nr) y de secuencias de tipo ESTs (Bailey *et al.* 2006).

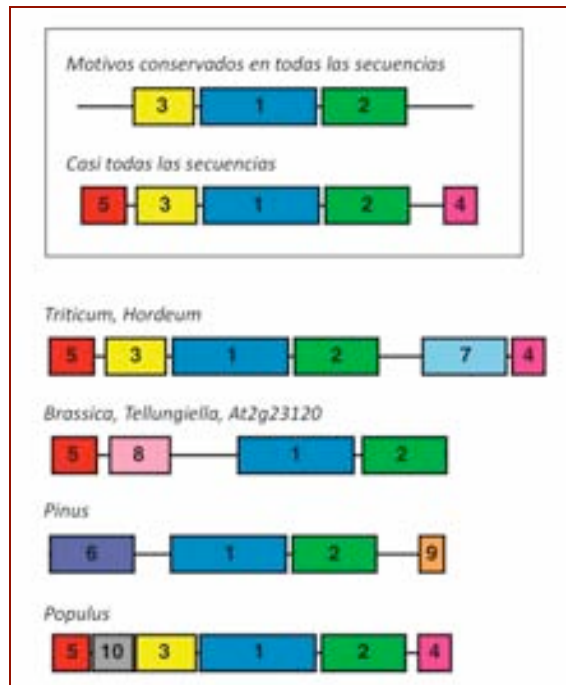


Figura 7: Diagrama en el que se muestra como se distribuyen los dominios que definen al grupo 6 de las proteínas LEA (ver tabla anterior). Los dominios se definieron utilizando el algoritmo MEME-MAST

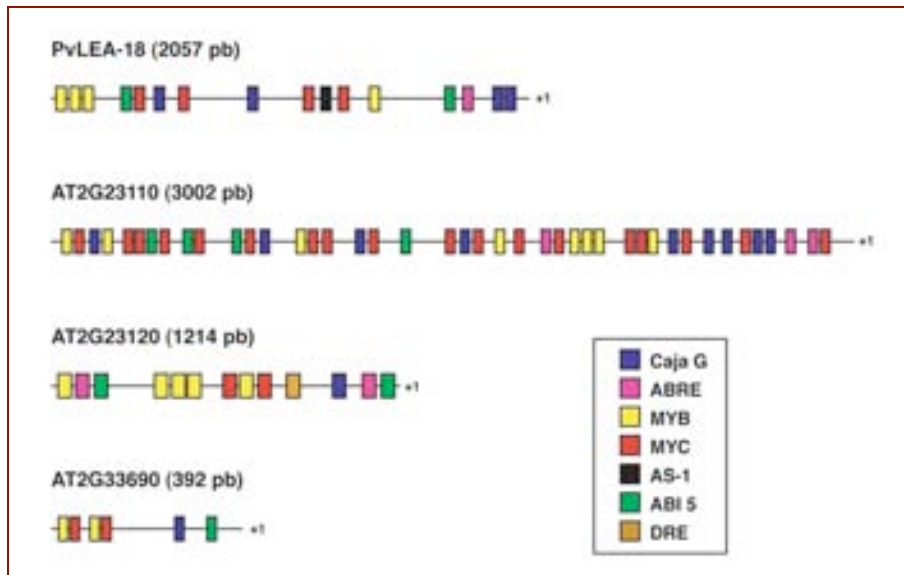


Figura 8: Comparación de los elementos potenciales en *cis* que se encuentran en los promotores del gen de *PvLEA18* de frijol y de los genes homólogos en *Arabidopsis*. El análisis se realizó utilizando el algoritmo PLACE (Plant *cis*-acting Regulatory DNA Elements). En el esquema solo se graficaron los elementos en *cis* que intervienen en la vía dependiente ABA (cajas de tipo G; ABRE (ABA binding recognition element); ABI 5) e independiente de ABA (DRE) y aquellos que pudieran estar asociados con la respuesta a estrés por déficit hídrico (MYC, MYB). Para el promotor de frijol se graficó el elemento AS-1, asociado a desarrollo. +1 corresponde al sitio de inicio de la traducción.

Regulación de la expresión por la región 3' no traducida del gen.

El estudio de la regulación transcripcional del gen *PvLEA18* de frijol en plantas transgénicas de *Arabidopsis* permitió conocer un elemento importante en la regulación del gen (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2000). Para este estudio se transformaron plantas de *Arabidopsis* con la región promotora del gen *PvLEA-18* de frijol fusionada al gen reportero *GUS* y la región 3' no traducida del gen *NOS*. Alternativamente, se consideró comparar esta construcción con una igual pero llevando la región 3' no traducida del gen *PvLEA-18* (Figura 9).

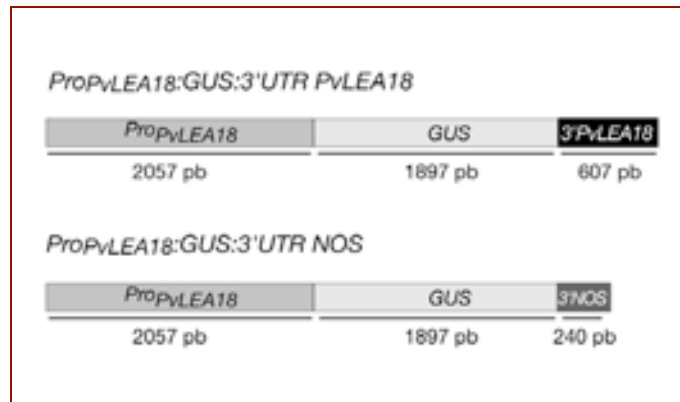


Figura 9: Esquema que representa las construcciones utilizadas para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Ambas construcciones llevan el promotor del gen *PvLEA18* de frijol (*Phaseolus vulgaris*) fusionado al gen reportero *GUS* y 607 pb de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* de frijol o la región 3' no traducida del gen *NOS* (*nopalina sintasa*). Estas construcciones se clonaron en el vector binario para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia).

Las líneas de *Arabidopsis* que se obtuvieron al transformar con ambas construcciones mostraron una expresión de *GUS* similar a la observada en frijol en condiciones de desarrollo y en los tratamientos de estrés. Sin embargo, al comparar las líneas por su región 3' no traducida se observó que todas las líneas que llevaban la región del gen *PvLEA18* mostraban una mayor actividad de *GUS* que las que tenían el terminador del gen *NOS*. Este incremento en la actividad (dependiente de la región 3') se observó, en particular, en condiciones de déficit hídrico o en una condición de deshidratación fisiológica programada, como ocurre en la semilla. En déficit hídrico la actividad se incrementó de 2 a 6 veces dependiendo de la línea (Figura 10). Esta observación resultó sumamente interesante, por que hasta el momento no se había reportado ningún otro gen en plantas cuya expresión se incrementara por la presencia de la región 3' no traducida en condiciones de déficit hídrico. Dada la poca información que existe al respecto, nos pareció importante establecer los mecanismos moleculares por los cuales la región 3' no traducida del gen estaba modulando su expresión.

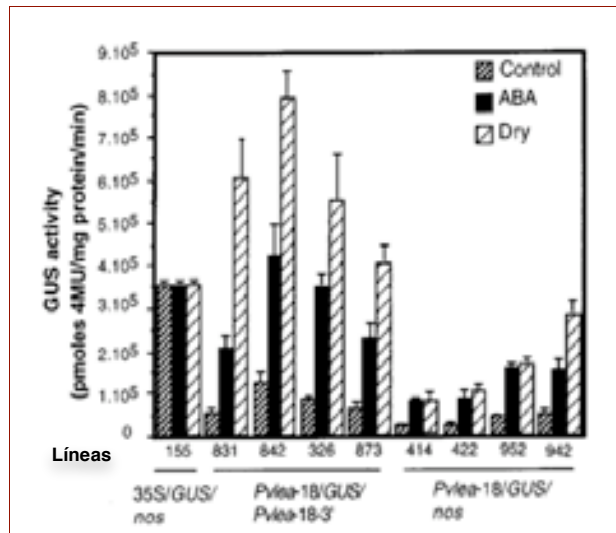


Figura 10: Actividad específica de GUS en las distintas líneas de las plantas transgénicas que llevan las construcciones ProPvLEA18/GUS/PvLEA18 3' y ProPvLEA18/GUS/NOS 3'. Plantas de 3 semanas se colocaron en cámara húmeda hasta perder el 30% de su peso fresco inicial (Dry). Los controles se mantuvieron bajo riego óptimo durante el tratamiento. El tratamiento con ABA se realizó colocando en el medio sólido una solución de ABA 100 μ M durante 24 h. Como control se utilizó la expresión constitutiva en la línea transgénica que lleva la construcción 35S/GUS/NOS 3'. Posterior al tratamiento se colectaron los tejidos y se hicieron los extractos de proteínas totales que se utilizaron para medir la actividad de GUS (ver materiales y métodos). Los números en el eje horizontal corresponden a líneas independientes (eventos de transformación independientes). Figura tomada del trabajo de Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001.

Las bases moleculares de la respuesta de las plantas a los cambios ambientales se han tratado de explicar a través de los mecanismos de regulación transcripcional. El cambio en la expresión genética se propone como responsable del mecanismo de tolerancia que se induce en la planta para adaptarse a las condiciones adversas del ambiente (Ingram y Bartels, 1996; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Sin embargo, al mismo tiempo que ocurre la inducción transcripcional existe una regulación post-transcripcional que es igual de importante ya que puede modular por distintas vías la estabilidad, la cantidad del mensajero, la disponibilidad de los mensajeros para ser traducidos y la eficiencia de la traducción de esos mensajeros en condiciones de estrés (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002). Dados estos antecedentes hemos propuesto la siguiente hipótesis y los objetivos a desarrollar son los siguientes:

HIPÓTESIS.

La región 3' no traducida del gen *PvLEA-18* participa en la regulación de su expresión en respuesta a déficit hídrico a nivel post-transcripcional.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer el mecanismo por el cual la región 3' no traducida del gen *PvLEA-18* modula su expresión en respuesta a déficit hídrico.

OBJETIVOS PARTICULARES

Definir con mayor precisión la región del extremo 3' que participa en la regulación de la acumulación de su proteína.

Establecer si la región 3' no traducida del mensajero se asocia a proteínas.



RESULTADOS.

I. Regulación transcripcional

Para determinar si la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* ejerce su regulación a través de un mecanismo de “*estimulador*” (enhancer) transcripcional, medimos y comparamos la tasa de transcripción en condiciones de estrés hídrico o de riego óptimo dependiente de la presencia del 3'*PvLEA18* o 3'*NOS*.

Para realizar este experimento utilizamos plantas transgénicas de *Arabidopsis* las cuales se transformaron con el promotor inducible por estrés del gen *PvLEA18* fusionado al gen reportero *GUS* con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o con la región 3' no traducida del gen *NOS* (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001) (Figura 9, en la sección de antecedentes). El experimento se realizó seleccionando una línea representativa de cada construcción (línea 842 para analizar la región 3'*PvLEA18* y línea 952 para analizar el efecto de 3'*NOS*, ver Figura 10) de acuerdo con los datos publicados por Moreno-Fonseca y Covarrubias (2001).

Para medir la tasa transcripcional se utilizaron hojas de la roseta de plantas de 21 días que se sometieron a déficit hídrico o se mantuvieron en condiciones óptimas de riego. A partir de este tejido se aislaron los núcleos y posteriormente se incubaron en un medio en el cual continúa la transcripción de los mensajeros en presencia de un nucleótido marcado radioactivamente, [α -³²P UTP]. Luego de la incubación se extrajo el RNA total y se utilizó como sonda para hibridar con el DNA de los genes de interés. En nuestro caso los genes de interés fueron el reportero *GUS*, que se expresa a partir de las construcciones antes mencionadas; así mismo algunos genes de proteínas LEAs que se inducen por déficit hídrico como son: *D113* (At5g06760) (Hoth *et al.* 2002), *ERD10* (At1g20450) (Kiyosue *et al.* 1994), *LTI28* (At5g52310) (Nordin *et al.* 1993), que se utilizaron como controles positivos del tratamiento. En tanto que los genes *eIF4A1* (At3g13920) y *RCE1* (At4g36800) que no se inducen por condiciones de estrés, se utilizaron como referencia de genes constitutivos (Seki *et al.* 2002) y el gen ribosomal *28S* se usó para normalizar de acuerdo a la carga. Cabe recordar que para comparar las líneas se utilizaron iguales cantidades de núcleos en las reacciones de síntesis de RNA marcado y una vez extraído el RNA total se utilizó la misma cantidad de marca radioactiva (en cpm) para hibridar en cada una de las membranas.

El resultado del experimento se muestra en la Figura 11. Si comparamos la condición de riego óptimo con la de déficit hídrico, vemos que el tratamiento induce al mensajero de *GUS*, así como a los genes de las proteínas LEAs: *D113*, *ERD10* y *LTI28*; mientras que los controles constitutivos muestran la misma tasa transcripcional. Si analizamos la diferencia que existe al comparar la tasa transcripcional dependiente de su región 3' no traducida, observamos que las diferencias que existen entre las líneas no es significativa, lo que indica que la regulación por la por la región 3' no traducida no se da a nivel transcripcional.

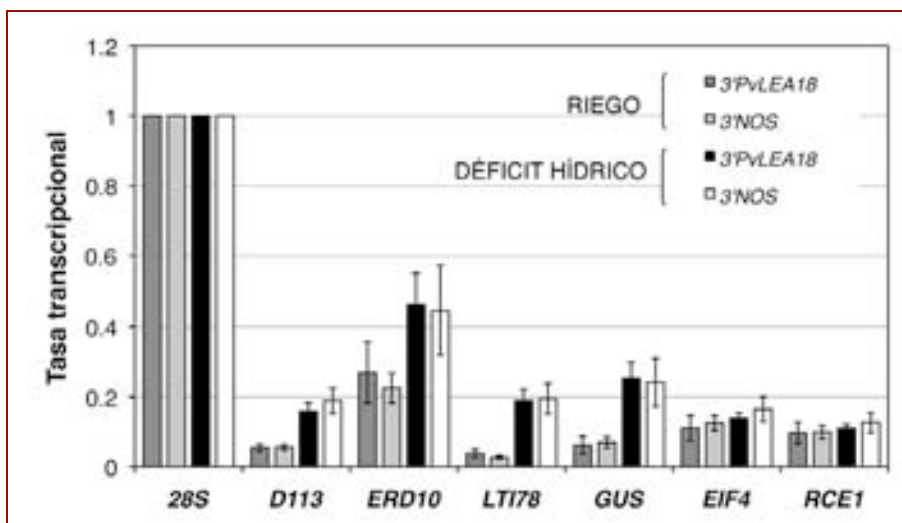


Figura 11: Análisis de la tasa transcripcional de diferentes genes en las líneas homocigas de *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* o *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* bajo condiciones óptimas de riego y en déficit hídrico. Se utilizaron en este experimento las rosetas de plantas de 15 días de *Arabidopsis*, que se cortaron y se colocaron en una cámara húmeda hasta que las plantas perdieran el 30% del peso fresco. Los controles se mantuvieron en riego óptimo durante todo el experimento. Posteriormente ese tejido se utilizó para la extracción de núcleos. Los núcleos se utilizaron para la transcripción de los RNAs como se describe en materiales y métodos. Iguales cantidades de los mRNAs sintetizados se usaron para hibridar contra el gen reportero *GUS* y los genes que se inducen por déficit hídrico: *D113* (At5g06760), *ERD10* (At1g20450), *LTI28* (At5g52310) o contra los genes constitutivos: *eIF4A1* (At3g13920) y *RCE1* (At4g36800) y *28S*. Las señales obtenidas se cuantificaron utilizando el programa NIHImage 1.63. La tasa transcripcional se expresa como la relación entre el valor de la señal de cada gen y la señal del gen *28S*. El resultado es la media de un experimento con tres replicas y se grafican las barras de error.

II. Regulación post-transcripcional.

2. Estabilidad del RNA mensajero.

La expresión de un gen puede estar finamente regulada por las condiciones celulares, por el medio ambiente (Gutiérrez *et al.* 2002; Lidder, 2005) o por una reacción de retroalimentación metabólica (Sheu *et al.* 1994; 1996; Chan y Yu, 1998b). Un mecanismo de regulación fina que le permite a la célula responder eficientemente ante situaciones inesperadas es la modulación de la estabilidad de los RNA mensajeros. Este cambio tiene como consecuencia una mayor o menor cantidad de transcrito para un gen determinado, dependiendo de la cantidad de la proteína correspondiente que se requiera ante una situación dada. La vida media de un mensajero depende, en gran parte, de la región 3' no traducida, dado que es el extremo por el cual se degrada el mensajero, ya sea por desadenilación (pérdida del poli(A)⁺), por la actividad de las endoribonucleasas o por la actividad de microRNAs específicos. Uno de los puntos a explorar fue establecer si la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* modulaba la vida media del mensajero, dando una mayor estabilidad y de esta forma aumentando la cantidad de proteína. Para medir

la estabilidad del mensajero en condiciones déficit hídrico, establecimos un sistema en medio líquido en el cual se pudiera inducir al gen y luego aplicar un inhibidor transcripcional manteniendo las condiciones de estrés (Figura 12). Para este experimento utilizamos las mismas líneas de *Arabidopsis* que en el experimento anterior (Figura 9, en antecedentes), el promotor *PvLEA18*, que es inducido por déficit hídrico, fusionado al gen reportero *GUS* y con las dos variantes de la región 3' no traducida: 3'*PvLEA18* y 3'*NOS*.

Para generar el déficit hídrico utilizamos una solución de 25% PEG-8000 (polietilenglicol, peso molecular 8000). Los polímeros de PEG ≥ 6000 no penetran los poros de la pared celular, por lo tanto el agua es removida desde fuera de la pared celular, provocando un estrés de deshidratación semejante al que provoca la sequía, a diferencia de las soluciones con solutos de bajo peso molecular (Carpita *et al.* 1979). Se probaron diferentes concentraciones, pero se eligió la concentración de 25% por que provoca un aumento rápido y sostenido de la expresión de *GUS*. Esta concentración de PEG genera un potencial hídrico (Ψ_w) de -30 bares = -3 MPa, que es similar a una concentración de 0.6 M NaCl (1.014 Osmol/Kg). Observamos que a las 16-18 h de tratamiento osmótico se obtuvo el mayor incremento en la actividad (Figura 12b) y en la cantidad de mensajero de *GUS* (no mostrado) y se consideró la óptima para el tratamiento.

Para encontrar la concentración óptima del inhibidor transcripcional, las plantas se sometieron a estrés osmótico en presencia de diferentes concentraciones de Actinomicina D, después de lo cual se detectó el mRNA a diferentes tiempos de iniciado el tratamiento (Figuras 12d y 12e). Si se compara con el control bajo estrés osmótico (Sin actinomicina (0), Figuras 12d y 12e), observamos que la concentración mas alta (200 μ g/ml) reduce la expresión de *GUS* en casi 80% (Figura 12e) (Newman, *et al.* 1993). Si bien esta concentración es alta hay que considerar que las condiciones osmóticas en las que se realiza el experimento provocan una disminución en la absorción de solutos por la raíz, afectando la entrada del inhibidor. Una vez elegidos el tiempo de inducción del gen en estrés osmótico (16 h) y la concentración del inhibidor (200 μ g/ml) se determinó la vida media del transcrito del reportero *GUS*.

El experimento consiste en someter a las plantas a tratamientos con 25% PEG durante 16 h y en ese momento agregar la actinomicina D. Los controles se mantienen en estrés osmótico pero sin la adición de actinomicina. Una vez agregado el inhibidor, se toman las muestras en función del tiempo, se extrae el RNA y se analiza por ensayos de tipo Northern. La señal se cuantifica (Figura 13a) y se grafica la desaparición del mensajero en función del tiempo normalizando los valores con la señal de hibridación del RNA *28S* ribosomal. Los resultados se muestran en la Figura 13b. Al comparar la cinética de degradación del mRNA del gen reportero conteniendo la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* con la correspondiente al transcrito con la región 3' no traducida del gen *NOS* no se detectaron diferencias

significativas, como lo muestran los valores de las pendientes de las rectas resultantes de graficar la cantidad de transcrito contra el tiempo.

La vida media de un mensajero se define como el tiempo en el cual la cantidad de mensajero disminuye su nivel hasta un 50%, tomando el tiempo inicial como el momento en que se agrega el inhibidor transcripcional. Si calculamos y comparamos la vida media del mRNA de *GUS*, vemos que es la misma para ambas construcciones: en el caso de llevar el 3'*PvLEA18* es de $2.6 \text{ h} \pm 0.21$ y para el 3'*NOS* es de $2.6 \text{ h} \pm 0.42$. Este resultado demuestra que la diferencia observada en la actividad del gen reportero en condiciones de déficit hídrico no es debido a una mayor estabilidad de su transcrito conferida por su región 3' no traducida.

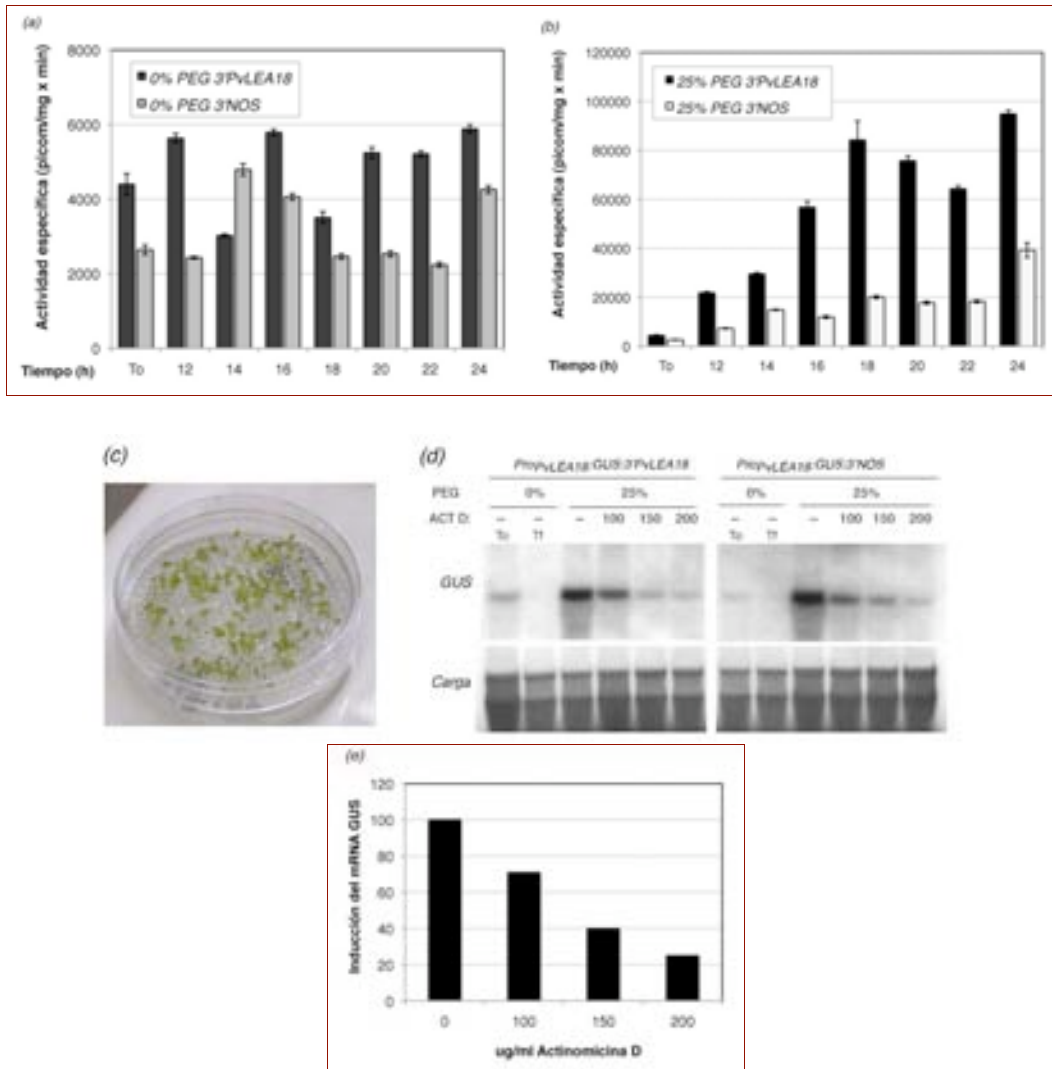


Figura 12: Optimización de las condiciones para la medida de la vida media en condiciones de déficit hídrico. (a) Detección de la actividad de GUS en condiciones de riego óptimo (medio MS, 0% PEG) o en déficit hídrico (b) generado por una solución de PEG al 25%, utilizando plantas de *Arabidopsis* de 15 días transformadas con las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* (3'PvLEA18) y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* (3'NOS). (c) Cámara en la que se realiza el experimento. Plantas de 15 días se colocan sobre una malla plástica, la cual esta flotando sobre la solución que se quiere ensayar. En condiciones de riego óptimo la solución es el medio MS, para el tratamiento osmótico la solución es 25% PEG. La solución se mantiene con agitación para evitar la anoxia. (d) La concentración de actinomicina D se ensayó mediante un experimento de inducción del gen *GUS*, utilizando las líneas transgénicas que se expresan bajo el promotor inducible de *PvLEA18*, en condiciones de estrés osmótico generado por una solución al 25% PEG. Las plantas se colocaron en una solución al 25% PEG con 0, 100, 150 y 200 µg/ml de actinomicina D. Los controles fueron, plantas en medio MS (0%PEG) al inicio (To) y al final del experimento (Tt) y plantas al 25% PEG sin Actinomicina D. Las plantas se mantuvieron 10 h en esta solución y al cabo del experimento el tejido se cosechó para detectar la inducción del mRNA de *GUS* en un ensayo de Northern Blot. (e) Cuantificación del experimento (d).

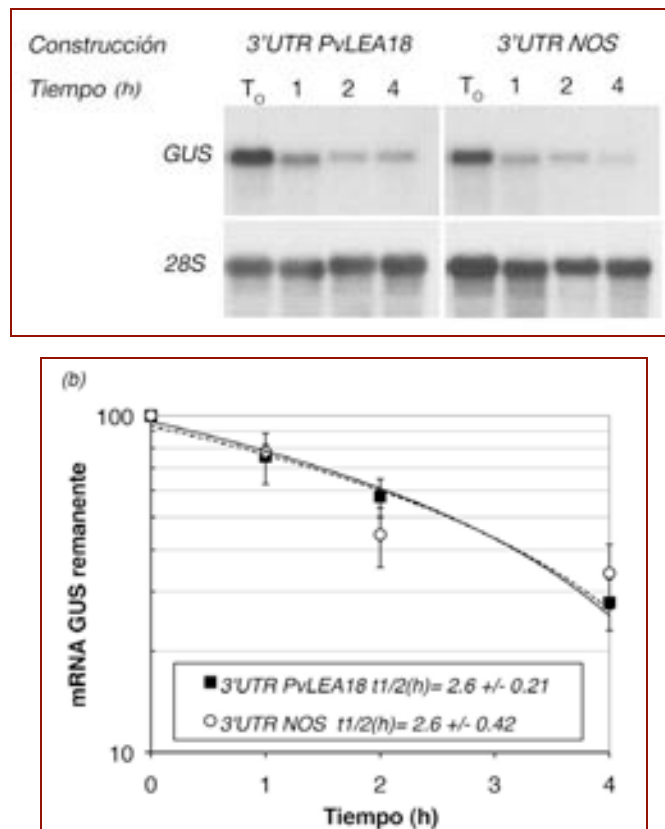


Figura 13: Efecto de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* sobre la vida media del gen reportero *GUS* en condiciones de déficit hídrico inducido por tratamiento con PEG. Plantas homocigas de 15 días transformadas con las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* (3'UTR *PvLEA18*) o *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* (3'UTR *NOS*) se trataron con una solución de 25% PEG, durante 16 h. En ese momento (T_0) se agregó el inhibidor transcripcional actinomicina D. A partir de ese tiempo se tomaron muestras de plantas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 4 h). Posteriormente se extrajo RNA y se analizó por Northern blot (a), utilizando las sondas para detectar *GUS* y *28S*. Los resultados se normalizaron con el gen ribosomal *28S* y con los valores del tratamiento en condiciones control. (b) Los resultados se graficaron como el RNA remanente en función del tiempo. Los valores graficados corresponden a la media de tres experimentos. El análisis de regresión no lineal se utilizó para graficar la línea de tendencia y la vida media se calculó a partir de la pendiente de la recta. La vida media para las dos construcciones se detallan en la figura.

2. Asociación del RNA mensajero a polisomas

Dada la mayor actividad del gen reportero y puesto que los resultados descritos arriba descartan tanto una regulación por síntesis (transcripcional) o por degradación de mensajero (post-transcripcional) otra de las posibilidades que resultaba obligatorio explorar era que la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* favoreciera la traducción del gen en condiciones de déficit hídrico.

Una forma de analizar este punto es midiendo la eficiencia con la que ese transcrito se traduce, la cual se refleja en la proporción de mensajero que se asocia con los polisomas. Dicho de otro modo, la cantidad de proteínas que se sintetice dependerá de cuantos ribosomas se asocien al RNA mensajero; a mayor número de ribosomas, mayor será el número de moléculas de proteínas sintetizadas por transcrito. Para ello se analizó cómo se distribuye el RNA mensajero de *GUS* en la población monosomal-polisomal, cuando contiene la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* y se comparó con la distribución obtenida para este transcrito conteniendo la región 3' no traducida del gen *NOS*.

Para este análisis se utilizaron las mismas líneas que en los experimentos anteriores (ver Figura 9). Plantas de 21 días se sometieron a déficit hídrico o se mantuvieron en condiciones de riego óptimo. A partir de ese tejido se extrajeron los complejos polisomales y se separaron por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. El gradiente se colecta y de cada fracción se extrae el RNA para ser analizado por ensayos de tipo Northern. En estos experimentos se detectaron en las diferentes fracciones obtenidas del gradiente, los transcritos de *GUS*, el de un gen constitutivo como el *eIF4A1* y el de un gen inducido por déficit hídrico como lo es el de la dehidrina *ERD10*. Puesto que los niveles del transcrito de *GUS* provenientes del promotor del gen *PvLEA18* no son detectables en estos ensayos cuando el RNA se obtiene de plantas crecidas bajo condiciones de irrigación óptima, estos experimentos sólo se realizaron a partir de plantas sometidas a déficit hídrico. (Figura 14). Los resultados de la Figura 14a muestran que la carga del mensajero de *eIF4A1* (gen constitutivo) se distribuye a lo largo del gradiente, en la región monosomal y polisomal; en cambio, el gen inducible, *ERD10*, se detecta una mayor proporción hacia la zona polisomal para ambas líneas como sería de esperarse de un gen de respuesta a estrés (Figura 14b). Cuando analizamos el mensajero del reportero *GUS* observamos que su distribución depende de la región 3' no traducida (Figura 14c). La línea que lleva la región 3'*NOS* muestra una distribución muy similar a la observada para el gen constitutivo, *eIF4A1*, es decir que éste se distribuye a lo largo del gradiente, se asocia indistintamente a monosomas y polisomas. Cuando el reportero *GUS* esta fusionado a la región 3'*PvLEA18*, su RNA mensajero se encuentra mayoritariamente asociado a la zona polisomal, lo cual nos indica que la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* favorece que este transcrito se asocie preferentemente a polisomas aún en condiciones de limitación de agua promoviendo así su traducción bajo esta situación ambiental adversa. Si tomamos la media de tres experimentos, los resultados muestran que si el mensajero de *GUS* tiene la región 3'*NOS* se encuentra 34.4 % \pm 6.9 en polisomas y 57.4 % \pm 8.1 en monosomas, mientras que si lleva la región 3' UTR *PvLEA18*, la carga es de 52.8 % \pm 12.2 en polisomas y 35.9 % \pm 5.7 en monosomas (Figura 15).

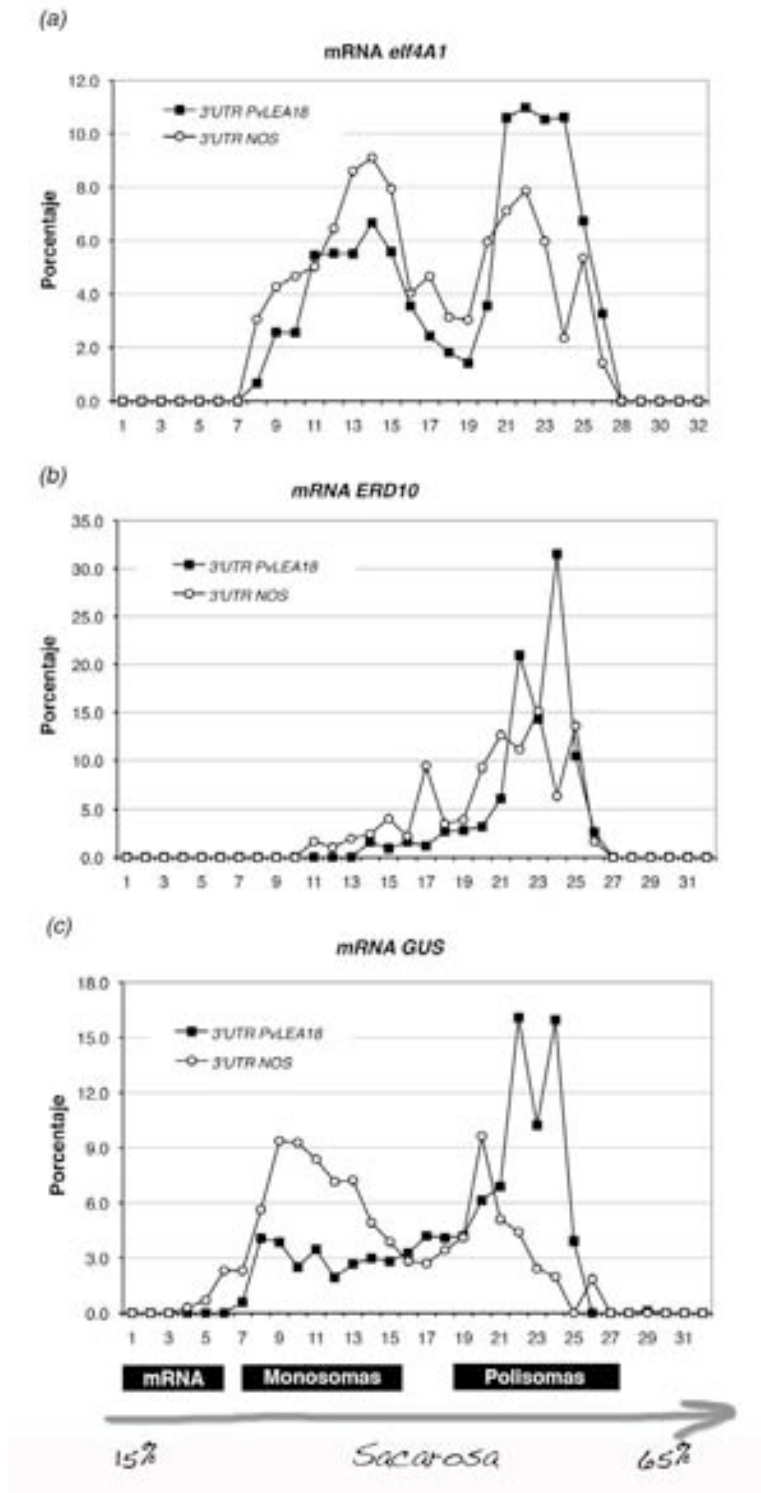


Figura 14: Análisis del perfil de sedimentación de diferentes mRNAs obtenidos de plantas transgénicas sometidas a déficit hídrico.

Plantas de 15 días de *Arabidopsis* transformadas con *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* o *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* se crecieron en Turface y luego se sometieron a tratamientos de déficit hídrico en cámara húmeda hasta perder el 30%

del peso seco. Posteriormente se purificaron los complejos polisomales y se separaron por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa (15 al 60% de sacarosa), el cual se fraccionó. De cada fracción se extrajo el RNA y se analizó por ensayos de Northern Blot, utilizando las sondas para detectar los mensajeros de los genes *eIF4A1*, *ERD10* y *GUS*. Luego de la hibridación la señal se cuantificó utilizando el programa NIHImage J 1.34. La distribución de los mRNAs se expresa como el porcentaje de señal en cada fracción siendo el total la suma de todas las fracciones.

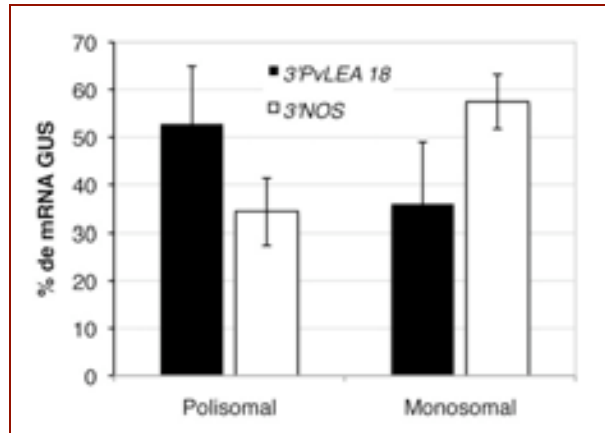


Figura 15: Cuantificación del porcentaje del mensajero de *GUS* en la fracción monosomal y polisomal cuantificado a partir de las fracciones obtenidas de la separación en un gradiente de sacarosa de los complejos monosomales-polisomales de plantas de *Arabidopsis* transformadas con *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* o *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* y sometidas a un tratamiento de déficit hídrico. En este gráfico se representan las barras de error (n=3).

3. Delimitación de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*

Las líneas utilizadas en estos experimentos contienen un fragmento de 607 pb a partir del último codón de la región codificante del gen *PvLEA18*. Estas transgénicas se diseñaron tomando 607 pb por que no se conocía con precisión el tamaño de la región 3' no traducida y teniendo en cuenta que el tamaño promedio de las regiones no traducidas en plantas es aproximadamente de 250 pb, se consideró que era un tamaño apropiado para contener al terminador completo. Si bien este gen fue aislado de una biblioteca diferencial de expresión de frijol en déficit hídrico, no fue posible obtener una clona con un poli(A)⁺ completo.

Para definir el tamaño de la región 3' no traducida se realizaron dos experimentos: se determinó su tamaño a partir del mensajero completo y se llevó a cabo un experimento de tipo 3'RACE (RACE: random amplification cDNA ends). Para el primer experimento el mensajero de *PvLEA18* fue detectado en un experimento de tipo Northern. Considerando la migración del RNA, calculamos su peso molecular tomando como referencia una curva estándar obtenida a partir de marcadores de RNA de cadena simple. El tamaño del transcrito así determinado fue de 550 bases \pm 50 bases, con lo cual define una región 3' no traducida para el transcrito del gen *PvLEA18* de 280 \pm 20 bases, considerando que la región 5' no traducida es de 22 bases y la región codificante es de 248 bases.

El experimento de 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA 3' Ends) permitió definir un tamaño aproximado para esta región de 300 bases. Este consistió de una reacción de transcriptasa reversa (RT) utilizando un oligo dT seguida de dos reacciones de PCR anidadas. Puesto que la tinción con bromuro de etidio detectó varios productos de amplificación, el producto correspondiente a la región de interés se detectó a través de una hibridación utilizando como sonda la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* (Figura 16).

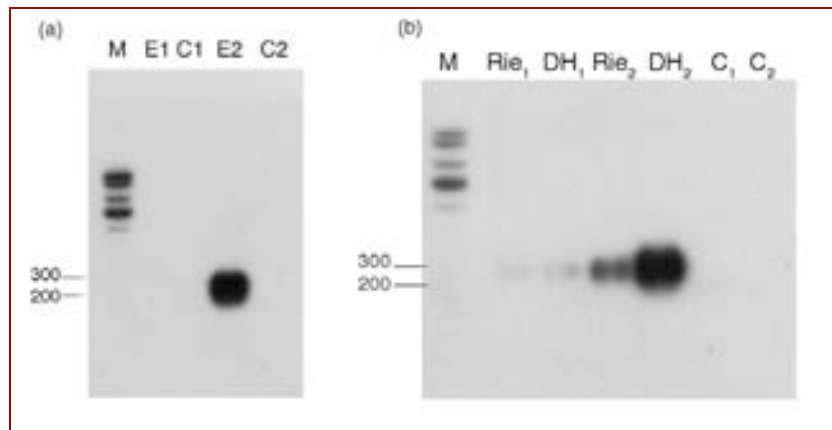


Figura 16: Resultado del experimento de amplificación específica de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* a partir de una población de cDNA de embrión seco (a) y de plántulas en condiciones óptimas de riego y en déficit hídrico de frijol (b). Se extrajo RNA total de cada condición, cada RNA se utilizó para una reacción de transcriptasa reversa, utilizando oligo dT. Luego se hicieron dos reacciones de PCR anidadas, ambas utilizando un oligo dT y el otro oligo específico (para la primer reacción el oligo fue de la región codificante, para la segunda el oligo correspondió al inicio de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*). Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.2 % en TBE 1X, Luego se transfirieron a membrana Hybond N⁺, se fijaron en medio alcalino y se hibridaron utilizando una sonda de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*. En el experimento se observa el resultado de la hibridación en el experimento de (a) embrión seco y (b) plántulas de frijol en condiciones de riego óptimo y déficit hídrico. Las letras significan: M, marcador de DNA; E1, resultado del PCR1 anidado en embrión, C1, es el control sin cDNA; E2 resultado del PCR2 en embrión; C2, es el control sin cDNA. En (b), Rie 1 y 2, muestran el resultado del PCR2 anidado a partir de dos cantidades de PCR1 anidado a partir de RNA en condiciones de riego; DH 1 y 2, igual al anterior pero con RNA de plántulas bajo déficit hídrico. C1 y C2 son los controles del PCR2 sin DNA de la reacción de DH. Se muestra la posición de la banda del marcador de 200 pb y 300 pb.

Al comparar las secuencias de las regiones 3' no traducidas del gen *PvLEA18* de frijol con su homólogo en soya, el gen *PM35*, encontramos que ambas regiones coinciden en tamaño (300 bases aproximadamente para frijol, 309 bases para soya) y además contienen dos secuencias o cajas (que las llamamos 1 y 2) que son similares en las regiones no traducidas de ambos genes y además son similares entre sí (la caja 1 con la caja 2). En la Figura 17, esta representado un diagrama del mensajero de *PvLEA18* en frijol, en el cual hemos destacado las cajas en la región 3' no traducida además de una comparación entre las secuencias de las cajas 1 y 2 entre frijol con sus homólogos en otras leguminosas: soya y *Medicago truncatula* (Figura 17).

Haciendo una análisis de tipo BLAST utilizando únicamente la secuencia de las cajas, contra las bases de datos para regiones no traducidas de transcritos (Pesole G, 1999), encontramos otros genes de plantas que poseen una o ambas cajas (Figuras 18 y 22). De igual manera se realizó utilizando las bases de datos de *Arabidopsis thaliana* (<http://datf.cbi.pku.edu.cn/blast/blast.php>). Las secuencias completas de los 3' no traducidos de estos genes se analizaron utilizando los programas MEME, cuyo algoritmo permite encontrar motivos a partir de secuencias de DNA o proteína y MAST para encontrar una secuencia consenso (Figura 21). Cabe destacar que algunas de las regiones 3' no traducidas pertenecen a proteínas de tipo LEA, como lo muestra la figura 22. Al revisar la expresión de los genes de *Arabidopsis* que poseen estas cajas en las bases de datos de microarreglos (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>), observamos que algunos de estos genes se inducen en condiciones de déficit hídrico o en situaciones de desarrollo que tienen una deshidratación de tipo fisiológico o programada, tal como sucede durante la maduración de la semilla o del polen (Figuras 20 y 21).

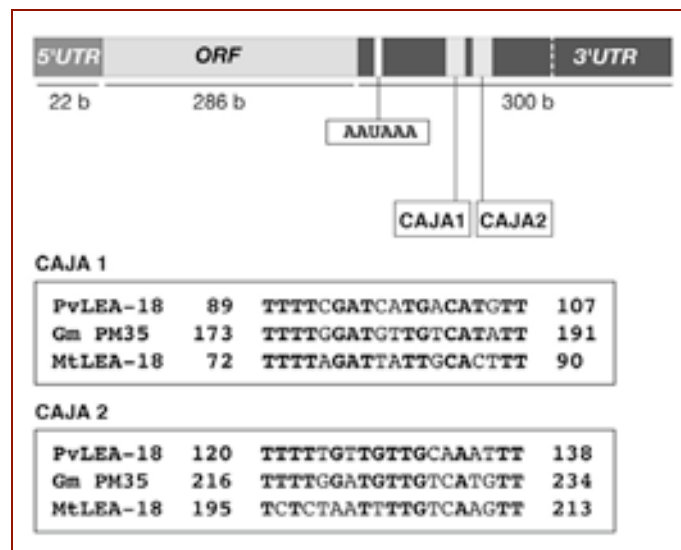


Figura 17: Diagrama que representa el transcrito del gen *PvLEA18*. En el se muestra la región codificante con las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3' UTR). El tamaño del 3'no traducido es de aproximadamente 300 bases, en esta región encontramos dos cajas (Caja1 y Caja2) las cuales se encuentran en el fragmento de 170 bases (delimitado por la línea punteada). También se observa la secuencia de ambas cajas en *PvLEA18* de frijol y de los genes homólogos a *PvLEA18* en *Glycine max* (soya) (*Gm PM35*) y en *Medicago truncatula* (*MtLEA18*). En cada secuencia los números representan la posición de la caja a partir del codón de término del gen.

GENE	START	P-VALUE	SITES
1	164	8.60e-08	GTTGCTTTTT TTTTGTGTTTCA TGATTTGGAT
2	49	8.60e-08	AAGGTGTTTC TTTTGTGTTTCA CATATCTATA
3	50	8.60e-08	CCATACCATC TTTTGTGTTTCA AATCAATGAG
4	120	8.60e-08	CTAAATCCTT TTTTGTGTTTCA AATTTAGATA
5	44	2.03e-07	TGGTTTTTTT GTTTGTGTTTCA GCCGTTTGT
6	69	2.03e-07	CAATTGCTT GTTTGTGTTTCA ATGTGCATTG
7	151	2.03e-07	TTATAATTA GTTTGTGTTTCA AATACATTTG
8	42	5.72e-07	TTTTTCATGC TTTTGGATGTTTC ACATGCCPTG
9	216	5.72e-07	ATACAACACG TTTTGGATGTTTC ATGTTTTGGT
10	173	5.72e-07	ATACAACACG TTTTGGATGTTTC ATATTGTACT
11	118	9.12e-07	AAAATCAATA TTTTGTGTTTCT CGGATGGCTT
12	58	9.12e-07	GTTCTGTTCC TTTTGTGTTTCT AATTTACTCG
13	218	1.17e-06	ATTTGCCCTC ATTTGTGTTTCA GTTATTTAAG
14	6	2.44e-06	ATAAA TTTTGGATGTTT AGGRACTTCG
15	156	2.85e-06	CAGGCCTTGT GCTGTGTTTCA AATGGCATT
16	198	3.56e-06	GAAAACGAAG TTGTTGTTTCA AAGCTCCAAC
17	95	4.12e-06	TGATGTATGT TTTTGGATGTTTC TCGTTTTCGC
18	95	4.12e-06	TGATGTATGT TTTTGGATGTTTC TCGTTTTCGC
19	1011	5.39e-06	AGTTTTAACC TTTTGTGTTTGA AATCTATAGA
20	82	5.39e-06	CAGTGTATAT CTTTGGATGTTTC TTTGTTGTT
21	71	5.39e-06	ACATCAAGAT TCTTTGTTTGT GTTATTGTTG
22	65	6.08e-06	TGGAAGTTGT TTTTGGATGTTTC GATCTTATGT
23	81	8.43e-06	ATCATCCTTT TTTGTTTTTCA AATTTTATTT
24	10	8.43e-06	TGGTTAAAT TTTGTTTTTCA AATTTAATTT
25	390	9.01e-06	CATGTTTTGG GTTGGGATGTTT TTTCTTTTGA
26	256	1.25e-05	GCAGCTTAAA GTTTGGTTCTTA GTTTGCCATG
27	176	1.49e-05	CAGAGTCAGG TCCGATGTTTC AAGTTTGT
28	411	1.57e-05	TTGTGCATAC ACTTTCCTTCA CCATTCTGGT
29	113	1.88e-05	CCATAGTGCA GTTGGTTTGTTC TGCCACAGGG
30	35	2.00e-05	TCTGAATTTG ATTCGATGTTTC ATAACCTGTG

Figura 18: Alineamiento obtenido por el programa MEME en el cual se obtiene como motivo la caja 2 a partir de las secuencias encontradas en una búsqueda de tipo BLAST entre secuencias de regiones 3' no traducidas de genes de plantas. Este análisis se realizó usando el algoritmo de BLAST en la página web <http://www2.ba.itb.cnr.it/UTRSite/> (Pesole, 1999). Posteriormente estas secuencias se analizaron con el algoritmo de MEME (Bailey and Elkan, 1994) para localizar dominios conservados entre ellas. Los números corresponden a los siguientes a las secuencias encontradas en las regiones 3' no traducidas del mRNA que codifica para:

1. sacarosa sintasa (SS) de *Glycine max*.
2. proteína de la familia de repetidos WD-40 de *Arabidopsis thaliana* (At5g67320).
3. homólogo de la proteína p24 de papa y muestra un putativo dominio de unión conservado a DNA de tipo KGKAAL (At2g02740) en *Arabidopsis thaliana*
4. proteína PvLEA-18 de *Phaseolus vulgaris*.
5. putativa metionina aminopeptidasa de *Arabidopsis thaliana*.
6. putativa beta caroteno cetolasa/oxigenasa (bkt/crto) en '*Chlorella' zofingiensis*.
7. proteína desconocida en *Arabidopsis thaliana*.
8. fosfoenolpiruvato carboxilasa en *F.australasica*.
9. proteína de maduración de la semilla, PM35 en *Glycine max* (homóloga a PvLEA18).
10. proteína de maduración de la semilla, PM35 en *Glycine max* (homóloga a PvLEA18).
11. proteína de función desconocida en *Arabidopsis thaliana* (cromosoma 2).
12. proteína de función desconocida (At2g30505) en *Arabidopsis thaliana*
13. putativa MAP cinasa en *Arabidopsis thaliana*.
14. proteína de función desconocida de *Arachis hypogaea*.
15. proteína de tipo TIR1 con un dominio de tipo F en *Populus tremula x Populus tremuloides*.
16. putativa serin/treonin cinasa (At4g23270) en *Arabidopsis thaliana*.
17. la subunidad beta de un putativo canal de K⁺ en *Arabidopsis thaliana* (At1g04690).
18. la subunidad beta de un putativo canal de K⁺ en *Arabidopsis thaliana*.
19. proteína de función desconocida en *Arabidopsis thaliana* (At1g67060).
20. proteína de unión a DNA (At2g25650) en *Arabidopsis*.
21. proteína de tipo nodulina MtN3 en *Arabidopsis thaliana* (AT3g14770).
22. proteína de tipo poliubiquitina (UBQ6) en *Arabidopsis thaliana* (At2g47110).
23. factor de transcripción con cajas de tipo MADS (mads4) en *Daucus carota sub. sativus*.
24. para glutamato-1-semialdehído-aminotransferasa de soja.
25. quitinasa de tipo III (OsChib3H-b), de *Oryza sativa*.
26. canal de K⁺ en *Arabidopsis thaliana*.
27. proteína de tipo LEA que se induce por frío (WCOR410) en *Triticum aestivum*.
28. histona H2B en *Arabidopsis thaliana*.

NAME	START	P-VALUE	SITES
AT4G39870_1	41	1.63e-08	CTGAGATTTCC TC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGTT
AT3G09550_1	43	1.63e-08	TTGTTTTCTT TC TTTTTT TT TTTT TT TCTTGTCTA
AT1G69610_1	69	1.63e-08	CAGGAAGATG TC TTTTTT TT TTTT TT TCAATCTTC
AT4G01480_1	154	4.33e-08	TTGACGCTTT CC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGTT
AT3G19980_1	288	4.33e-08	CTGTTTCCTC TC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGAAG
AT3G07960_1	172	4.33e-08	ATACTCTGCA CC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGTT
AT2G02610_1	90	4.33e-08	ATGTTGTTGT TC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTATAT
AT1G72630_1	66	4.33e-08	AGGTGTGTCA TC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGAA
AT4G17600_1	21	8.42e-08	TCTTGCCTTC TTTTTTTT TTTT TT TGTAAATTAGG
AT3G61110_1	45	8.42e-08	CTTTTTCTTT TTTTTTTT TTTT TT TGGCTATGAT
AT3G11600_1	24	8.42e-08	CCAAACCCGT TTTTTTTT TTTT TT ATGTAAATCGA
AT2G46780_1	276	8.42e-08	ATTCTTCTT TTTTTTTT TTTT TT TCAAAATTC
AT2G34250_1	119	8.42e-08	TTAGACTACT TTTTTTTT TTTT TT TGAACGAAA
AT2G33720_1	84	8.42e-08	GTTGTTCTG TTTTTTTT TTTT TT CTCGGTOTT
AT5G67320_1	47	9.89e-08	CCAAGGTGTT TC TTTTTT TT TTTT TT ACATACTAT
AT1G71530_1	683	9.89e-08	AACTCAATAA CC TTTTTT TT TTTT TT GCTCTGTCG
AT5G46690_1	8	1.15e-07	GAAATCT TTTTTTTT TTTT TT TATTCCTCT
AT1G72100_1	53	1.15e-07	CCTAACTTAG TTTTTTTT TTTT TT TCTTGTGTT
UTR	121	1.42e-07	GGCTAAATCC TTTTTTTT TTTT TT AAATTTAGAT
AT2G44310_1	39	1.67e-07	GAAACTGTTT TC TTTTTT TT TTTT TT TCACTGTTTC
AT3G52360_1	161	2.00e-07	CTTGAGGGTT TA TTTTTT TT TTTT TT GACCTGTAAA
AT5G52810_1	88	2.24e-07	TATGGACCTA TC TTTTTT TT TTTT TT AAAAAAAAAA
AT5G32440_1	94	2.74e-07	CAAAACGTGT TC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTGTGTT
AT3G24020_1	66	2.74e-07	TCTGTGAATG TC TTTTTT TT TTTT TT ATGTAACAGT
AT5G62710_1	47	3.03e-07	TAGCCTGCGA CC TTTTTT TT TTTT TT TGTCTGCTCC
AT1G04130_1	47	3.03e-07	TTTTGCAGCT TC TTTTTT TT TTTT TT TTGTCGTAA
AT2G03480_1	116	3.31e-07	ATAAAATCAA TA TTTTTT TT TTTT TT TCGGATGGCT
AT5G27770_1	115	3.64e-07	TAAACTCTT TC TTTTTT TT TTTT TT GTACTTGAGA
AT5G11090_1	187	4.33e-07	CCTATCATAA TTTTTTTT TTTT TT GTGAAAGAAG
AT4G36540_1	35	4.33e-07	AAAAATCGCG TTTTTTTT TTTT TT CTTATCCATT
AT1G29340_1	36	4.71e-07	AAAAGTGGTA TTTTTTTT TTTT TT TGGTGTGTT
AT1G74380_1	138	4.95e-07	TTCTCTTTT TTTTTTTT TTTT TT TGAAGAATA
AT1G72100_1	68	5.19e-07	TTTGTGTTT TC TTTTTT TT TTTT TT TTAGTGACTT
AT5G16010_1	3	6.22e-07	AG TTTTTTTT TTTT TT TCAAGTGT
AT2G02560_1	157	6.22e-07	TGGACCTTTG TTTTTTTT TTTT TT CGTCTGCTG
AT5G35320_1	112	6.94e-07	AGATATGGCA TA TTTTTT TT TTTT TT ATGTTTACCA
AT3G13750_1	356	6.94e-07	TTGCTTTGAA CC TTTTTT TT TTTT TT TGTGTTGTA
AT5G05440_1	40	8.05e-07	TGTATCTAAT TTTTTTTT TTTT TT ATTTCTTTTA
AT4G16850_1	15	8.05e-07	AGTTCGAACA TTTTTTTT TTTT TT TAATCTCTT
AT3G01150_1	301	8.05e-07	ATTGTTCTTT TTTTTTTT TTTT TT CATAATTTAA
AT3G07430_1	134	8.39e-07	TGAGCTTTAT CC TTTTTT TT TTTT TT CTTTTTGACT
AT4G33140_1	149	9.45e-07	TTTTATAATT TA TTTTTT TT TTTT TT AAATACATT
AT2G30440_1	349	9.45e-07	TGTAAAACCT CC TTTTTT TT TTTT TT ATGTAAATTC
AT2G24765_1	144	9.45e-07	CTTAATATTC TC TTTTTT TT TTTT TT GTTTCATTCT
AT2G02470_1	204	9.45e-07	TCTTTTTTTG GA TTTTTT TT TTTT TT TAATGTTAAT
AT2G01640_1	28	1.14e-06	ACTTATGTTT TC TTTTTT TT TTTT TT GTTATAGTAA
AT2G43790_1	216	1.47e-06	TAAFTTGCCC TC AAAA TT TTTT TT AGTTATTTAA
AT2G37650_1	157	1.54e-06	TTTCTAGCTG TC TTTTTT TT TTTT TT TCAAGTAGAT
AT1G49450_1	198	1.54e-06	GTGTGAAAAA TC TTTTTT TT TTTT TT GTTAGATCTT
AT1G09960_1	291	2.33e-06	GGATCTTCTC TC TTTTTTTT TT TTTT TT TTGTAATTTA

Figura 19: Alineamiento de las secuencias de las regiones 3' no traducidas de genes de Arabidopsis, los cuales se identificaron por un análisis de tipo BLAST (<http://datf.cbi.pku.edu.cn/blast/blast.php>) a partir de los datos obtenidos en bases de datos de regiones no traducidas de *Arabidopsis*. Posteriormente estas secuencias se analizaron con el algoritmo de MEME (Bailey and Elkan, 1994) para localizar dominios conservados entre ellas. Aquí se muestra el resultado de MEME, al localizar la caja 2.

Gene number	Seed	Silique	Pollen	Drought	ABA	Cold	Description
AT1G01560							Putative Mitogen activating protein kinase (AIMPK11)
AT1G03180							Hypothetical protein
AT1G04130							Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
AT1G09270							Putative importin alpha 1 subunit
AT1G09960							Sucrose transporter / sucrose proton symporter (SUT4)
AT1G10840							Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3 gamma)
AT1G18660							Zinc finger family protein (C3HC4-type RING finger)
AT1G22180							SEC14 cytosolic factor family protein
AT1G22440							Putative similar to alcohol dehydrogenase (ADH)
AT1G24620							Putative calcium-binding pollen allergen
AT1G25510							Aspartyl protease family protein
AT1G29340							Armadillo/beta-catenin repeat family protein
AT1G29960							Expressed protein
AT1G32210							Identical to Defender against cell death 1 (DAD1)
AT1G33090							Similar to MATE efflux family protein
AT1G35580							Putative beta fructofuranosidase, invertase
AT1G49450							Transducin family protein
AT1G59650							Expressed protein
AT1G65190							Protein kinase family protein
AT1G68460							Identical to Adenylate isopentenyltransferase 1
AT1G69610							Expressed protein
AT1G70000							DNA-binding family protein
AT1G71530							Protein kinase family protein
AT1G72100							Late embryogenesis abundant protein (LEA)
AT1G72430							Similar to auxin responsive protein related
AT1G72630							Expressed protein
AT1G74380							Galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein
AT1G79250							Similar to protein kinase
AT1G80550							Pentatricopeptide (PPR) repeat containing protein
AT2G01540							C2 domain containing protein similar to zinc finger
AT2G02470							PHD finger family protein
AT2G02610							DC1 domain containing protein
AT2G20190							CLIP-associating protein (CLASP) related
AT2G23980							Cyclic nucleotide regulated ion channel
AT2G33720							Expressed protein
AT2G34250							Putative similar to protein transport protein sec61
AT2G39480							ABC transporter family protein related
AT2G43100							Aconitase C-terminal domain-containing protein
AT2G44110							Seven transmembrane MLO family protein
AT2G44370							Highly similar to DC1 domain containing protein
AT2G46780							RNA recognition motif (RRM)-containing protein
AT3G01150							polypyrimidine tract-binding protein putative
AT3G11600							Expressed protein
AT3G21280							Putative ubiquitin specific protease (UBP7)
AT3G22530							Expressed protein
AT3G24515							Putative Ubiquitin conjugating enzyme
AT3G45930							Identical to histone H4
AT3G49390							Putative RNA binding protein
AT3G52360							Expressed protein

Continua en la siguiente pagina..

Gene number	Seed	Silique	Pollen	Drought	ABA	Cold	Description
AT2G02740	Blue	Purple				Light Blue	Similar to transcription factor
AT2G03480						Light Blue	Dehydration/responsive protein
AT2G32160					Yellow		Expressed protein
AT2G43790		Purple	Green				Putative MAPK (AtMAPK5)
AT3G04580							ethylene receptor, putative (EIN4) similar to ethylene receptor
AT3G07930		Purple					HhH-GPD base excision DNA repair family protein
AT3G07960		Purple	Green				Similar to Phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase family protein
AT3G09550		Purple	Green				Contains ankyrin repeat family protein
AT3G19980						Light Blue	Identical to serine/threonine protein phosphatase (STPP)
AT3G27020	Blue	Purple	Green		Yellow		Putative OPT family protein
AT3G43700		Purple	Green				Speckle-type POZ protein related
AT3G47400							Putative similar SMC2-like condensin (TITAN3)
AT3G48450		Purple	Green	Red	Yellow		Putative Nitrate responsive NOI protein
AT3G81110		Purple				Light Blue	Identical to 40S ribosomal protein S27 (ARS27A)
AT4G01480							Putative soluble inorganic pyrophosphatase
AT4G17600		Purple					Encodes LI3.1 (light-harvesting-like) protein
AT4G28040					Yellow		Similar to nodulin MN21 family protein
AT4G28050							Putative similar to senescence associated protein
AT4G31360						Light Blue	Expressed protein
AT4G32460							Unknown protein
AT4G33140		Purple	Green			Light Blue	Expressed protein
AT4G33200							Myosin like protein
AT4G34710		Purple	Green	Red	Yellow	Light Blue	Identical to arginine decarboxylase 2 (SPE2)
AT4G35830		Purple		Red			Aconitase (ACO)
AT4G35950			Green				Rac like GTP-binding protein (ARAC6)
AT4G36020						Light Blue	Cold-shock DNA-binding protein, COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 1
AT4G36540							BEE2 (BR ENHANCED EXPRESSION 2); DNA binding-transcription factor;
AT4G36700	Blue	Purple			Yellow		Putative cupin family protein
AT4G36870		Purple	Green				Expressed protein
AT5G01020							Protein kinase family protein
AT5G01270					Yellow		Double-stranded RNA-binding domain (DsRBD)containing protein
AT5G03850						Light Blue	40S ribosomal protein S28 (RPS28B)
AT5G06280					Yellow		Unknown protein
AT5G06760	Blue	Purple		Red	Yellow	Light Blue	Late embryogenesis abundant protein (LEA) Group 1
AT5G10940				Red			Transducin family protein/WD-40 repeat family protein
AT5G11090		Purple			Yellow	Light Blue	Putative serine-rich protein-related proteins
AT5G13090							Expressed protein
AT5G15640			Green				Putative mitochondrial substrate carrier family protein
AT5G17300					Yellow	Light Blue	myb family transcription factor similar to CCA1
AT5G27770						Light Blue	60S ribosomal protein L22 (RPL22C)
AT5G35680			Green			Light Blue	Putative eukaryotic initiation translation factor 1A
AT5G42980		Purple					Thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3)
AT5G46690		Purple					Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein (BETA HLH PROTEIN 71)
AT5G51080			Green				RNase H domain-containing protein.
AT5G62130					Yellow	Light Blue	Perf-1 like protein
AT5G62390							Calmodulin-binding family protein contains IQ calmodulin binding motif
AT5G63860	Blue	Purple					Identical to UVB-resistance protein (UVR8)
AT5G67320	Blue		Green				WD-40 repeat family protein strong similarity to unknown protein

Figura 20: Tabla que representa los datos obtenidos a partir de las bases de datos de microarreglos, en las cuales podemos comparar la inducción de los mensajeros en distintas condiciones de estrés abiótico o desarrollo, todas ellas asociadas a proceso de deshidratación. Los bloques en blanco representan que no hay inducción del mensajero en esa condición. La lista de genes corresponde al análisis previo por BLAST el cual se muestra en la figura anterior y todas las secuencias presentan la caja 2 en la región 3' no traducida. Los colores solo son representativos de la inducción en esa condición con respecto al control.

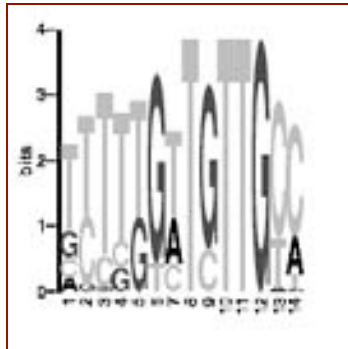


Figura 21: Motivo consenso de la caja 2 obtenido a partir de las secuencias que se analizaron en la figura anterior utilizando el algoritmo BLOCKs (n=30) (Henikoff *et al.* 1995).

NAME	START	P-VALUE	SITES
PM27	116	1.32e-06	TCAGGGTTCT TCTGGTTGTTG AATGTAATAT
At2g47110	66	5.40e-06	GGAGTTGTTT TTTGGATGTTG TGGATCTTAT
PM35	217	5.40e-06	TACAACACGT TTTGGATGTTG TCATGTTTTG
PM35	174	5.40e-06	TACAACACGT TTTGGATGTTG TCATATTGTA
PM27	68	8.46e-06	TTGTTGTTGT TCTTGTGTTG TTGTTTACTG
At2g02470	207	1.79e-05	TTTTTTGGAT TTTTGTTGTTG TTAATGTTAA
putative	102	1.79e-05	CCATATTATT TTTTGTTGTTG TCATTAAAAA
PM27	56	1.79e-05	AACTTAGCTT TTTTGTTGTTG TTCTTGTTGT
D113	146	1.79e-05	TCATCTAGGT TTTTGTTGTTG GATGATAGTC
PvLEA-18	124	1.79e-05	TAAATCCTTT TTTTGTTGTTG CAAATTTAGA
WCOR410	177	1.83e-05	AGAGTCAGGT CCTGGATGTTG TCAAGTTTGT
At2g47110	53	2.87e-05	TTTTTTGGAA TTTGGAAATGTTG TTTTTGGATG
LEA1	108	5.10e-05	TATTATAGCT TCTGGTTGGGG GAGAAATTGA

NAME	START	P-VALUE	SITES
PM27	114	2.24e-07	TATCAGGGTT CTTCTGGTTGTTG AATGTAATAT
PM27	69	4.19e-07	TGTTGTTGTT CTTGTGTTGTTGTTG TTTACTGACT
LEA1	27	1.42e-06	AAATGTTAAA CTTGTGTTGTTGTTG TCTGTTTATC
LEA1	106	4.84e-06	GGTATTATAG CTTCTGGTTGGGG GAGAAATTGA
D113	144	5.37e-06	TCTCATCTAG CTTTTGTGTTGTTG GATGATAGTC
PM27	54	6.83e-06	CTAAGTTAGC TTTTTTGTTGTTGTTG TTCTTGTGTT
PvLEA-18	122	6.83e-06	GCTAAATCCT TTTTTTGTTGTTGTTG CAAATTTAGA

NAME	START	P-VALUE	SITES
PM35	208	5.13e-14	CTTTTTCTAT ACAACACGTTTTGGATGTTTCATC TTTTGGTAAG
PM35	165	4.19e-13	TAATTTCTAT ACAACACGTTTTGGATGTTTCATA TTGTACTACT
WCOR410	168	1.54e-12	GTTTGGTTCA AACTCAAGTCCCTGGATGTTTCAA TTTGTTACT
WCOR410	63	2.52e-11	TGTTGTTGTT CTTTACCTCAAATTTGTTTCAA GTGGGAGGG

Figura 22: Esquema del alineamiento dado como resultado del análisis de MEME en el cual podemos observar que algunos 3' no traducidos de genes que codifican para proteínas LEAs (PM35, PM27, WCOR410, LEA1) presentan un doble repetido de cajas en algunas de las secuencias analizadas, como el que se encuentra entre los genes *PvLEA18* y sus homólogos.

4. 170 bases en la región 3' no traducida de *PvLEA18* son importantes para la regulación traduccional.

Para delimitar las secuencias en la región 3' no traducida importantes para el efecto sobre la traducción del gen *PvLEA18*, decidimos utilizar la región delimitada experimentalmente (300 bases) para analizar su efecto en condiciones de déficit hídrico. Para ello se hicieron construcciones utilizando el promotor del gen *PvLEA18* fusionado al reportero *GUS* y la región de 300 b, a partir del último codón. Por otro lado decidimos evaluar cual era el efecto de estas cajas (Figura 23) sobre la regulación, para lo cual se obtuvo la región del 3'*PvLEA18* de 170 bases a partir del codón de término del gen *PvLEA18*, que contiene a ambas cajas. Para asegurar que estas secuencias estuvieran en el contexto de un terminador funcional capaz de procesarse *in vivo*, este fragmento se fusionó a la región 3'*NOS*. Con estas construcciones se obtuvieron líneas transgénicas en *Arabidopsis*, las cuales se compararon con otras líneas transgénicas conteniendo la región 3' no traducida de 300 bases fusionada igualmente al terminador 3'*NOS* (Figura 23a).

Luego de obtener las plantas homocigas con una inserción del transgen, se analizaron diferentes líneas y se compararon con las actividades específicas del reportero en las plantas transgénicas conteniendo 607, 300 y 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* con la línea que lleva la región 3' no traducida del gen *NOS*. Todas se analizaron en condiciones de riego óptimo y de déficit hídrico; los resultados se muestran en la Figura 20b. En condiciones de déficit hídrico, se pudo observar que las líneas que llevan las construcciones con los fragmentos de 607, 300 ó 170 bases del gen *PvLEA18* siempre muestran una actividad de *GUS* mayor a las líneas que llevan el terminador 3'*NOS* (Figura 23b) sugiriendo que el fragmento de 170 bases contiene los elementos mínimos necesarios para que la región 3' no traducida del gen favorezca la traducción del transcrito bajo condiciones de déficit hídrico. Como se puede apreciar en la Figura 23c, en condiciones de riego óptimo todas las líneas mostraron valores muy bajos de actividad de *GUS* estos valores fueron similares para todas las líneas, inclusive para la línea analizada que lleva el terminador 3'*NOS*.

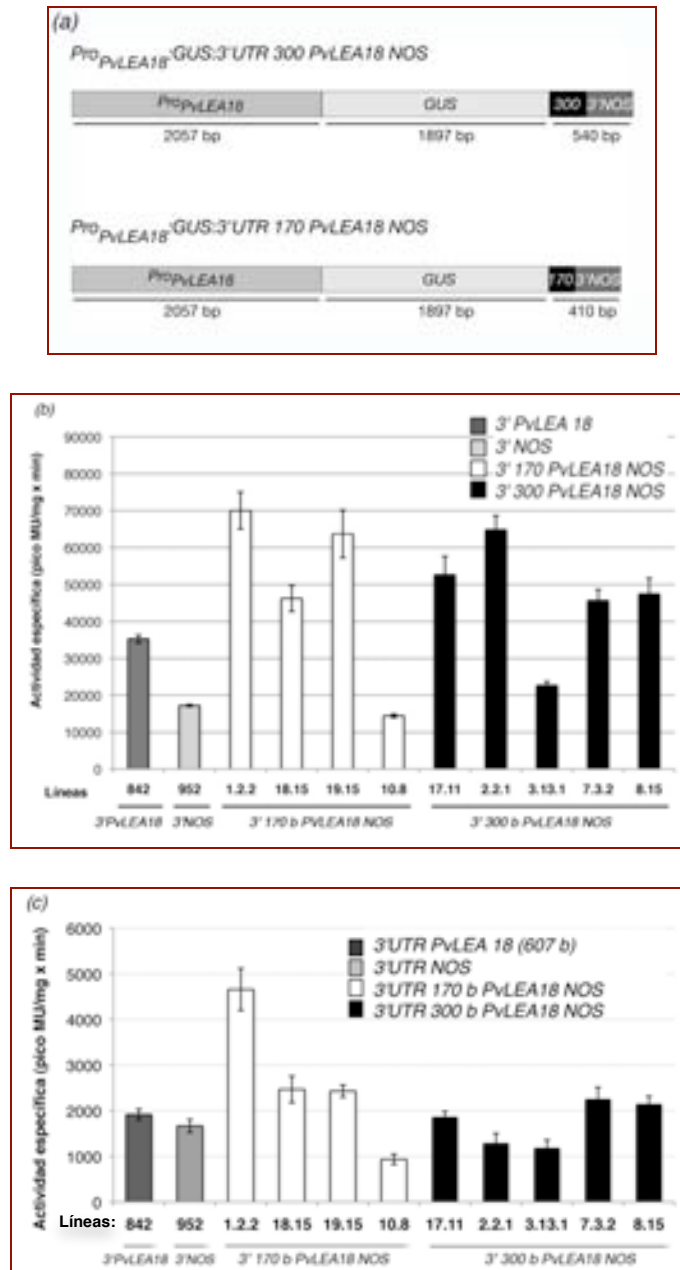


Figura 23: Análisis *in vivo* de la regulación de distintos fragmentos de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* en plantas de *Arabidopsis* bajo tratamiento de déficit hídrico. (a) Diagrama de las construcciones que se utilizaron para transformar las plantas de *Arabidopsis*. El promotor de *PvLEA18* se fusionó al reportero y la región 3' no traducida corresponde a 300 o 170 bases fusionadas a la región 3' no traducida NOS. La construcción que lleva 607 bases de la región 3' *PvLEA18* esta graficada en la Figura 1, al igual que la que lleva la región 3' NOS. La actividad específica de GUS se midió en extractos proteicos de plantas de 15 días de *Arabidopsis*, las cuales se deshidrataron en cámara húmeda hasta perder el 30% del peso fresco, los controles se mantuvieron en condiciones de riego óptimo. Luego del tratamiento se midió la actividad de GUS. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes. Se muestra las barras de error (n=12). (b) Actividad de GUS en condiciones de déficit hídrico. (c) Actividad de GUS en condiciones de riego.

5. La sobre-expresión del gen reportero no permite analizar la regulación que ejerce la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*.

Con la finalidad de determinar si el efecto traduccional conferido por la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* es o no dependiente de la condición de estrés por déficit hídrico se generaron construcciones en las que el gen reportero con o sin la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* se fusionó a un promotor independiente de la condición de estrés que permite la sobre-expresión del gen en toda la planta en condiciones normales de crecimiento, en este caso, el promotor del virus del mosaico del coliflor (*CaMV35S*) (Benfey *et al.* 1989). Las líneas transgénicas homocigas con una inserción se analizaron en condiciones de riego óptimo y de déficit hídrico y se compararon con las líneas transgénicas con las construcciones en las que el gen reportero se encuentra bajo control del promotor del gen *PvLEA18*.

En la semilla seca se observa que la expresión es similar en todas las líneas y no es posible detectar el efecto de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* (Figura 24a). En plantas de 21 días, se detecta la expresión constitutiva del gen reportero (Figura 24b), esta expresión es muy superior a la del promotor de *PvLEA18* en condiciones de déficit hídrico a diferencia de lo observado en la semilla. En estas condiciones no fue posible detectar el efecto sinérgico que tiene la región 3' no traducida de *PvLEA18* bajo condiciones de estrés, lo cual sugiere que el efecto inductor de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* fue ocultado por los altos niveles de expresión del gen reportero cuando provienen del promotor 35S que ciertamente contrastan con los niveles de expresión que proviene del promotor del gen *PvLEA18*. Alternativamente es posible que los factores celulares necesarios para el efecto traduccional de la región 3' no traducida no sean suficientes para los altos niveles de transcrito.

6. Proteínas de unión a la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*

La modulación de la traducción del transcrito del gen *PvLEA18* que se da a través de su región 3' no traducida podría estar mediada por proteínas de unión a RNA las cuales podrían reconocer las secuencias conservadas en las cajas 1 y 2. Ejemplos de estos mecanismos de regulación se han estudiado en otros modelos, como *Drosophila*, en donde existen mecanismos de regulación traduccional mediados por proteínas de unión a RNA que interactúan con los factores de inicio de la traducción.

La presencia de secuencias conservadas en la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* sugería modelos similares de modulación traduccional; es decir, la participación de proteínas capaces de reconocer tales secuencias en los mRNAs que pudieran interactuar con otros factores implicados normalmente en el proceso de traducción.

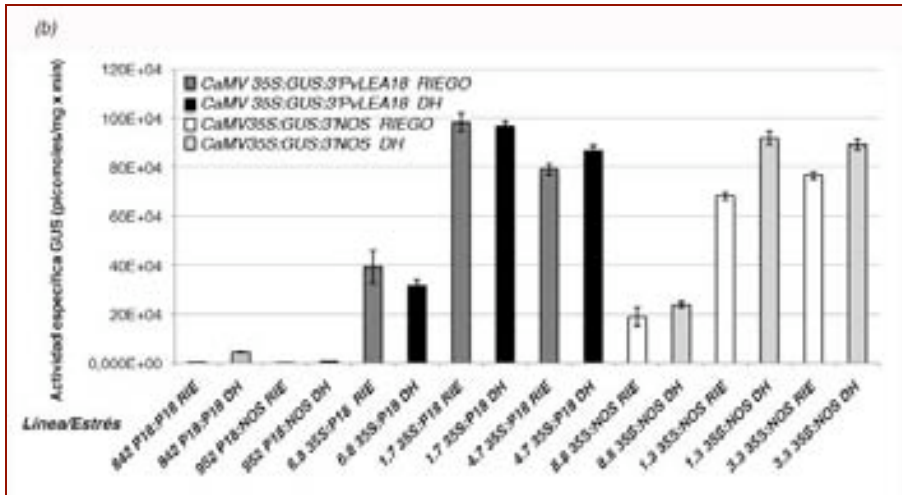
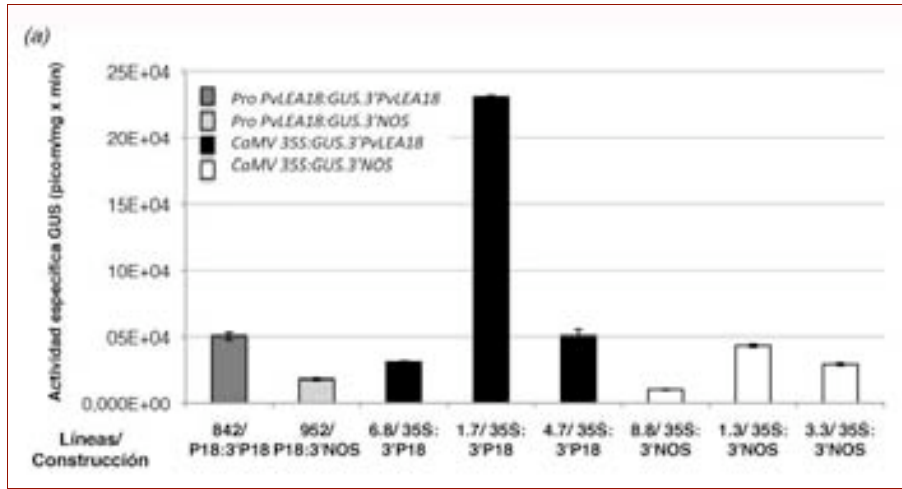


Figura 24: Expresión constitutiva del reportero *GUS*, utilizando el promotor *CaMV35S*, con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o del gen *3'NOS*. Comparación con la expresión del reportero bajo el promotor del gen *PvLEA18* con ambas regiones no traducidas. (a) expresión en semilla seca. Se muestra el número de línea y su construcción abreviada P18: 3'P18, corresponde a la construcción *ProP18:GUS:3'P18*, P18:3'NOS corresponde a *ProP18:GUS:3'NOS*, 35S:3'P18, corresponde a *ProCaMV35S:GUS:3'P18* y 35S:3'NOS, corresponde a *ProCaMV35S:GUS:3'NOS*. (b) Expresión de *GUS* en plantas de 15 días crecidas en condiciones de riego óptimo o en condiciones de déficit hídrico. En el eje horizontal se describe el número de línea, la construcción y el tratamiento RIE (riego) o DH (deshidratación por déficit hídrico)

6. Proteínas de unión a la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*

La modulación de la traducción del transcrito del gen *PvLEA18* que se da a través de su región 3' no traducida podría estar mediada por proteínas de unión a RNA las cuales podrían reconocer las secuencias conservadas en las cajas 1 y 2. Ejemplos de estos mecanismos de regulación se han estudiado en otros modelos, como *Drosophila*, en donde existen mecanismos de regulación traduccional mediados por proteínas de unión a RNA que interactúan con los factores de inicio de la traducción.

La presencia de secuencias conservadas en la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* sugería modelos similares de modulación traduccional; es decir, la participación de proteínas capaces de reconocer tales secuencias en los mRNAs que pudieran interactuar con otros factores implicados normalmente en el proceso de traducción.

Con el objeto de tratar de identificar si alguna proteína era capaz de interactuar con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* se efectuaron ensayos para detectar la interacción. Para ello se obtuvieron extractos totales de proteínas de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico, los cuales fueron fraccionados con sulfato de amonio con la finalidad de enriquecer la(s) posible(s) proteína(s) de interés. Las fracciones así obtenidas (total, 20%, 40%, 60%, 80% y el sobrenadante de 80%) se dializaron para ser utilizadas en los ensayos de interacción con RNA. Por otro lado, el RNA utilizado como sustrato para tal interacción, correspondiente a la región 3' no traducida *PvLEA18* se sintetizó *in vitro*, utilizando el sistema con RNA-polimerasa de T7 y un nucleótido radiactivo, [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP. Para estos ensayos se utilizó el fragmento de 300 bases con la región 3' no traducida *PvLEA18* y como control, se utilizó la región 3' no traducida del gen *NOS*, para determinar las proteínas que fuesen diferentes a las proteínas implicadas en el procesamiento normal del RNA mensajero. El RNA marcado sintetizado *in vitro* se purificó para utilizarse en los ensayos de interacción. Después de la incubación entre el RNA y la proteína, se generó el entrecruzamiento entre las moléculas que interaccionan a través de irradiación con luz UV, para posteriormente tratarse con RNAsa-A; la cual degrada al RNA, que no haya sido protegido por las posibles proteínas interactuantes y entrecruzadas de tal forma que la proteína se podrá detectar con la marca radioactiva del RNA al que se haya asociado después de separarlas en geles de SDS-poliacrilamida.

La figura 25 muestra el resultado de la interacción con las fracciones de proteína enriquecidas con el sulfato de amonio. De estos resultados se puede apreciar que cuando se utilizan ambas regiones no traducidas, hay varias proteínas que se comparten, pero en la fracción soluble de la fracción precipitada con sulfato de amonio 80% se detecta una proteína de aproximadamente 20 kDa que no se detecta en la interacción con el RNA de la región 3' no traducida del gen *NOS*, lo que sugiere fuertemente que esta interacción solo ocurre con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*.

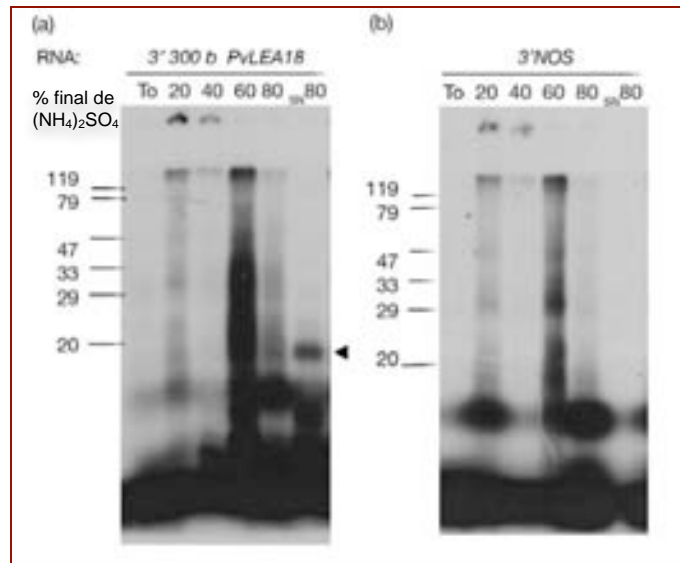


Figura 25: Interacción RNA-Proteína en un ensayo de entrecruzamiento de UV utilizando extractos de *Arabidopsis* bajo tratamiento de déficit hídrico. Se utilizó [α^{32} P]-RNA marcado por transcripción *in vitro*, de las construcciones 3'*PvLEA18* (a) y 3'*NOS* (b). Se utilizó un extracto proteico total de plántulas de frijol bajo déficit hídrico (To), este extracto se enriqueció utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ en distintas concentraciones (%): 20, 40, 60, 80 y el sobrenadante de 80%. Luego de la interacción RNA-proteína, la incubación se irradió con UV y luego del tratamiento con RNAsaA se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15%, el gel se secó y luego se expuso por autorradiografía. La flecha muestra una banda en la fracción soluble de 80% de sulfato de amonio que se detecta en la interacción con el RNA de la construcción de 3'*PvLEA18* y no en la interacción con 3'*NOS*.

Dado que el embrión en la semilla madura se encuentra en condiciones de desecación programada por el desarrollo y además es una de las condiciones en las que se expresa la proteína *PvLEA18*, investigamos la posibilidad que existieran proteínas que interactuaran con la región 3' no traducida del transcrito de *PvLEA18*, similares a las detectadas en condiciones de déficit hídrico. Para ello se obtuvo la fracción soluble de la precipitación con 80% de sulfato de amonio a partir extractos proteicos de embriones secos de frijol. Con esta fracción se llevaron a cabo los ensayos de interacción utilizando el fragmento de RNA que corresponde a las 170 o a las 300 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* antes descritos. El resultado obtenido se muestra en la Figura 26, en donde se detecta una proteína con un peso molecular similar al de la proteína detectada en los extractos proteicos de plántulas sometidas a déficit hídrico. Adicionalmente se detectan otras proteínas que pudieran ser específicas del embrión y sugiere que las interacciones entre proteínas y RNA pudieran variar de acuerdo con el estado de desarrollo y las condiciones de deshidratación, que en el caso del embrión en la semilla madura son muy extremas.

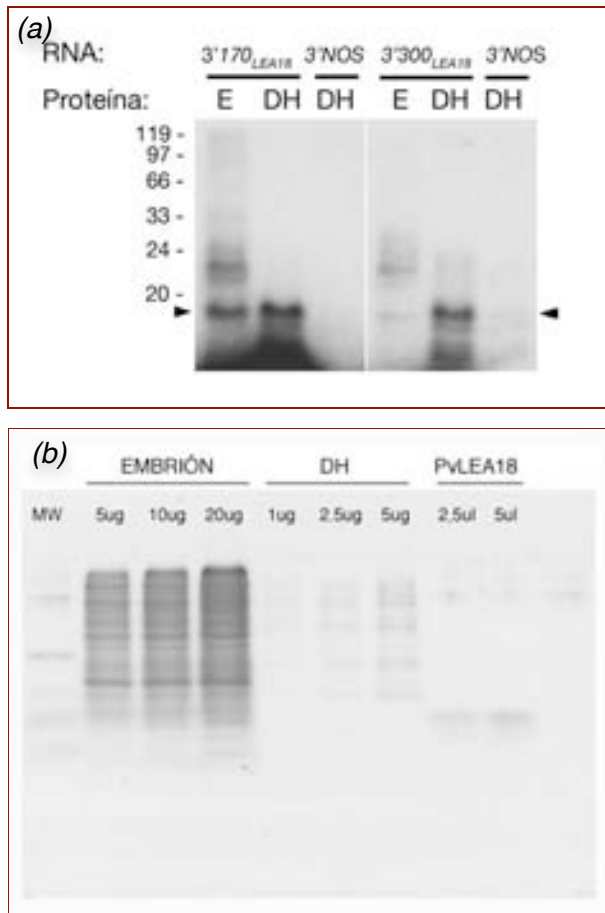


Figura 26: Detección de proteínas que interactúan con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* (170b y 300b). (a) Análisis de interacción por entrecruzamiento con UV utilizando extractos de frijol de embriones secos o plántulas sometidas a tratamientos de déficit hídrico. Las flechas indican las proteínas que interactúan con la región no traducida de forma específica (a) 170 bases y (b) 300 bases de la región 3' no traducida. E: extracto de embrión maduro; DH: Tejido de plántulas de frijol de 6 días sometidas a 2 días en condiciones de déficit hídrico (ver materiales y métodos). (b) Análisis del perfil proteico por cromatografía de SDS-PAGE al 15%. Tinción por Coomassie.

Dado que el efecto por la región 3' no traducida sobre la traducción del gen *PvLEA18* se detectó en un sistema heterólogo, se analizó la interacción entre el RNA de la región 3' no traducida de *PvLEA18* con proteínas de plantas de *Arabidopsis* sometidas a déficit hídrico.

En un experimento similar al que se muestra en la figura 26 pero utilizando extractos de *Arabidopsis*, detectamos una proteína de aproximadamente 20 kDa que se enriquece en la misma fracción de sulfato de amonio (fracción soluble del precipitado de 80%) en la que se detectó utilizando los extractos de frijol. Como se observa en la figura 24, al no detectarse esta proteína en su interacción con la región 3' no traducida de *NOS*, sugiere que al igual que en frijol se une específicamente a la región 3' no traducida *PvLEA18*.

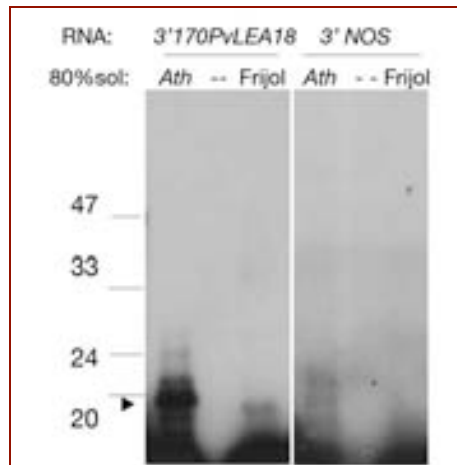


Figura 27: Ensayo de interacción entre RNA y proteína, utilizando la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* (a) y *NOS* (b) marcados radiactivamente. Plántulas de *Arabidopsis* se sometieron a un tratamiento de déficit hídrico (ver materiales y métodos), este tejido se utilizó para hacer un extracto total (To) el cual se enriqueció con sulfato de amonio en las fracciones 20%, 40%, 60%, 80% y sobrenadante de 80%. Todas las fracciones se dializaron antes de utilizarlas para la interacción. Luego del tratamiento con RNasaA se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15%. Se observa el resultado de la exposición. La flecha indica la banda de proteína en la fracción soluble de 80% específica de la región *PvLEA18*. Como control se utilizó el extracto proteína en la fracción soluble de 80% de plántulas de frijol sometidas a condiciones de déficit hídrico.

Con la finalidad de corroborar tales interacciones, también llevó a cabo un análisis utilizando el sistema de retardo de la migración de RNA en geles nativos.

En este caso la reacción de interacción RNA-proteína se separa en un gel nativo de poliacrilamida, para después de revelar la película correspondiente analizar cambios de movilidad o el retardo de alguna banda cuando se compara con una muestra en la que no se adiciona proteína. Aquella banda que muestre un retraso en su migración corresponde a una molécula de RNA que ha formado un complejo con alguna(s) proteína(s) (REMSA).

De la misma forma que en el experimento anterior, la interacción se realiza utilizando RNA marcado radioactivamente. En la figura 25 se muestra que la interacción entre el RNA correspondiente a la región de 170 bases de la región 3' no traducida del *PvLEA18*; presenta una banda cuya migración se retrasa al agregarse la proteína (sobrenadante de 80% de extractos de frijol en déficit hídrico), sugiriendo la formación de un complejo (comparar el carril 1 con el resto) y el retardo se ve diferente al que se obtiene cuando se agrega el RNA marcado de la región 3'*NOS* (comparar con el carril 7). Al pasar esta proteína por una columna de intercambio iónico (MonoQ) y utilizar esa fracción enriquecida vemos la formación de un complejo de retardo al utilizar ambos RNAs (comparar carril 3,4 y 8). En este caso el carril 3 y 4

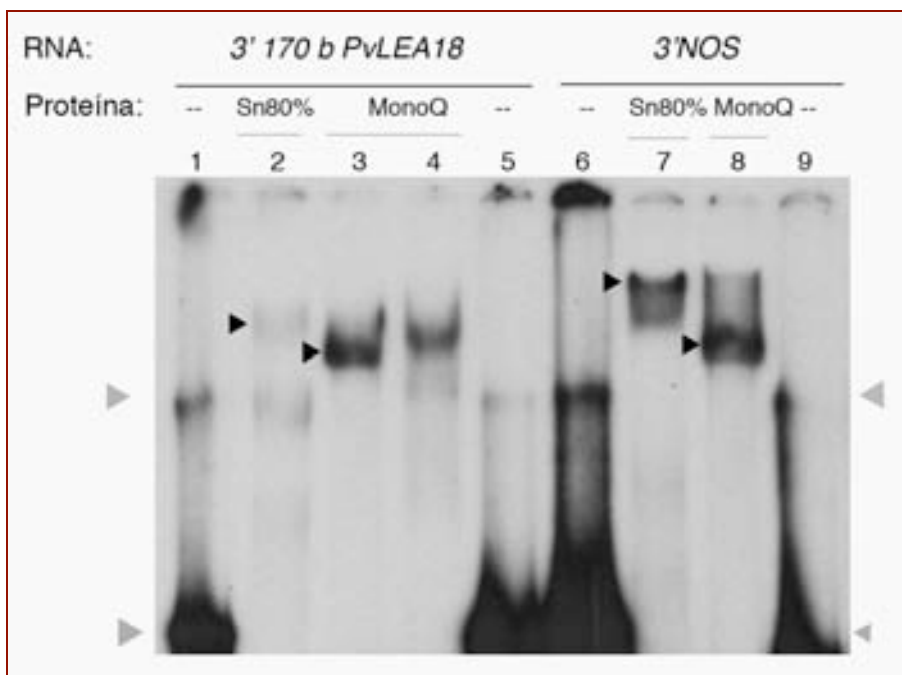


Figura 28: Ensayo de retardo de RNA- Proteína, utilizando 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o la región 3'NOS.

Desde el carril 1 al 5 se utilizó el RNA marcado que corresponde a la región 3'170b *PvLEA18*, del carril 6 al 9 corresponde al RNA marcado con la construcción 3'NOS. En el carril 1 se corre el RNA sin el agregado de proteína, en flechas grises se marcan los sitios en los que se detectan distintas formas del RNA. El carril 2 es la interacción con la fracción soluble del 80% de sulfato de amonio. En el carril 3 y 4 se muestran extractos enriquecidos que provienen de pasar el extracto soluble del 80% por un columna de intercambio iónico. Los carriles 5 y 6 corresponden al RNA sin el agregado de proteína. El carril 7 es la interacción con la fracción soluble del 80% de sulfato de amonio. En el carril 8 se muestra la interacción utilizando el extracto enriquecido que proviene de pasar el extracto soluble del 80% por un columna de intercambio iónico.

corresponde a la misma proteína agregada en distintas cantidades (20 y 40 μg) y el 8 corresponde a 40 μg de proteína eluída de la cromatografía por columna de MonoQ (este paso de purificación se explica al final de los resultados ,como figura complementaria). En este caso el retardo se ve ligeramente diferente al que se observa con el sobrenadante de 80%, en este caso se observa la misma movilidad para ambos RNAs, lo cual puede ser coincidencia en la movilidad y estar formado por proteínas diferentes o puede ocurrir que el paso de purificación produzca un cambio en las proteínas que forman el complejo (por ejemplo que no co-purifiquen factores que el sobrenadante pudieran ser requeridos en alguna de las dos interacciones (con 3'*PvLEA18* o 3'NOS).

7. Participación de las cajas encontradas en la región de 170 bases en la formación del complejo RNA-proteína con la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*.

Con la finalidad de establecer la participación de las secuencias conservadas presentes en la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*, representadas por las cajas 1 y 2 en la interacción con proteínas, se llevó a

cabo un ensayo de retardo en la migración del RNA, similar al descrito en la sección anterior. En este experimento se consideró el utilizar RNAs en los que cada una de las cajas fueron modificadas introduciendo *in vitro* mutaciones aleatorias. La migración de los complejos de RNA-proteína se comparó con la obtenida utilizando el fragmento de RNA en su forma silvestre. El resultado del experimento se muestra en la Figura 26, en la cual se compara la formación del complejo de proteína-RNA utilizando el RNA silvestre o el fragmento de RNA conteniendo ya sea, la caja 1 (C1m) o la caja 2 (C2m) mutadas. Resulta evidente que cuando se utiliza la caja 1 mutada la cantidad de complejo proteína-RNA disminuye, en tanto que la disminución es aún mayor al grado de que casi no se detecta cuando la caja 2 es la que está alterada. Por tanto, estos datos indican que la caja 2 en la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* es la que tiene una mayor participación en la interacción con la(s) proteína(s) y que la secuencia en la caja 1 parece jugar un papel menos relevante en este reconocimiento. Cabe hacer notar que los carriles en los extremos del gel corresponden a muestras de RNA marcado al cual no se le adicionó proteína, con el objetivo de diferenciar aquellas bandas de RNA de alto peso molecular que se pudieran generar por formación de estructuras secundarias que dieran lugar a cambios en su migración; como se puede apreciar en esos carriles, en efecto se llegan a detectar algunas bandas de diferente peso molecular que corresponden a RNA con distintas conformaciones estructurales, dando lugar a bandas con distinta movilidad (señaladas con flechas grises), pero que presentan una migración diferente a la de las bandas correspondientes a los complejos proteína-RNA detectados cuando la proteína se le adiciona al RNA.

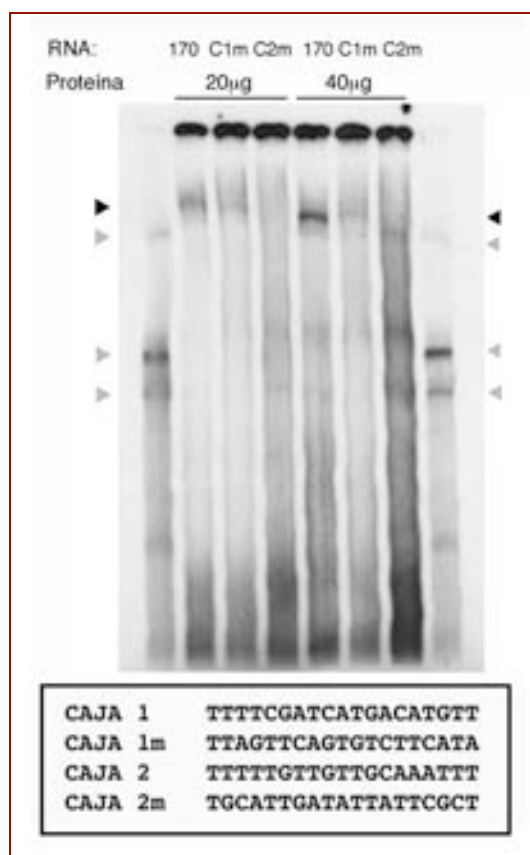


Figura 29: Efecto de la mutación de la caja 1 o la caja 2 en el fragmento de 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* sobre la formación del complejo RNA-proteína. La fracción soluble del 80% de sulfato de amonio proveniente de un extracto de plántulas de frijol sometidas a déficit hídrico se utilizó para ver la interacción con RNA. El fragmento de 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* se utilizó para sintetizar el RNA marcado (170), C1m corresponde al fragmento de 170 bases que contiene la caja 1 mutada y C2m corresponde al fragmento de 170 bases con la caja 2 mutada. El recuadro en la parte inferior de la figura muestra la secuencia de las cajas normales y mutadas. Las muestras son réplicas con 20 y 40 µg de proteína. A ambos extremos del gel se corrieron muestras de RNA de 170 bases sin el agregado de proteína y las bandas correspondientes a diferentes estructuras se muestran en flechas de color gris. La banda que corresponde al complejo RNA-proteína se muestra con una flecha de color negro.

8. Efecto de la mutación en la caja 2 en traducción *in vitro*.

Con el fin de establecer si existe una conexión entre la presencia de las cajas y la regulación de la traducción se realizó un experimento de traducción *in vitro*, utilizando una construcción en la cual fusionamos el promotor T7 al gen reportero *GUS* y el fragmento de 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* (170) con la caja 1 o la caja 2; ya sea en su forma silvestre o en su forma mutada (C1m o C2 m, respectivamente). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27 en la cual podemos

observar que la traducción disminuye significativamente cuando ésta se realiza a partir del RNA proveniente de la construcción que contienen la caja 2 mutada, consistente con el efecto que se detecta en la disminución de la formación del complejo RNA-proteína.

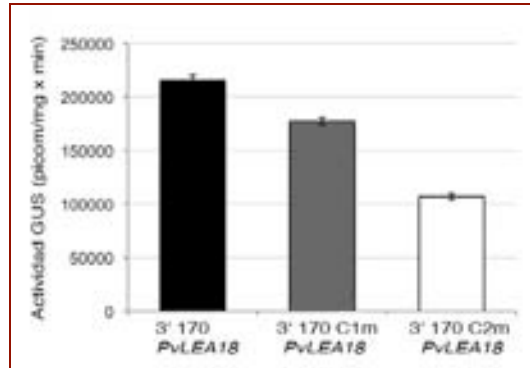


Figura 30: Actividad de GUS medida luego de la traducción *in vitro* utilizando construcciones del reportero GUS fusionadas con 170 bases de la región 3' del gen *PvLEA18*, en su secuencia silvestre o con la caja 1 (C1m) o la caja 2 mutadas (C2m). El experimento se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos.

Para este experimento se utilizó DNA plasmídico comparando las construcciones: pKS⁺ *ProT7:GUS:3'170 PvLEA18*, pKS⁺ *ProT7:GUS:3'170 (C1m) PvLEA18*, pKS⁺ *ProT7:GUS:3'170 (C2m) PvLEA18*. El plásmido se linearizó utilizando la enzima XhoI. Posteriormente se extrajo con fenol:cloroformo, se precipitó y se resuspendió en agua. Cantidades iguales (1 µg) de plásmido linearizado se utilizaron para la reacción de transcripción-traducción, siguiendo las especificaciones del kit. Luego de la reacción de traducción se midió la actividad del reportero GUS, que se graficó en este experimento. El resultado es la media de tres experimentos.

9. Enriquecimiento de la proteína de unión a RNA.

La fracción soluble de 80% de sulfato de amonio se precipitó para concentrar y luego se pasó por una columna de intercambio iónico (MonoQ). Se eligió este paso de purificación por que permite concentrar la proteína, a diferencia de una columna de filtración en gel. La corrida cromatográfica se realizó a pH básico, eluyendo con un gradiente de sal (ver Materiales y Métodos). En la figura 28a se muestra el perfil de la corrida cromatográfica y como se agruparon las fracciones eluidas. Estas fracciones se ensayaron en experimentos de retardo, utilizando RNA marcado (REMSA) de la región 170-3'*PvLEA18* o 3'*NOS*. Se puede observar que hay dos fracciones que muestran retardo utilizando ambos RNA (Fracciones 2 y 3).

En estos complejos no se observa la misma diferencia de retardo que se ve al utilizar el sobrenadante de 80% (ver figura 25) esto puede significar que durante la purificación se modifica o se pierde alguno de los componentes del complejo. Por esta razón, cuando ensayamos el retardo utilizando las versiones mutadas del 3'*PvLEA18*, lo hicimos con la fracción soluble del 80% y no con el extracto pasado por MonoQ.

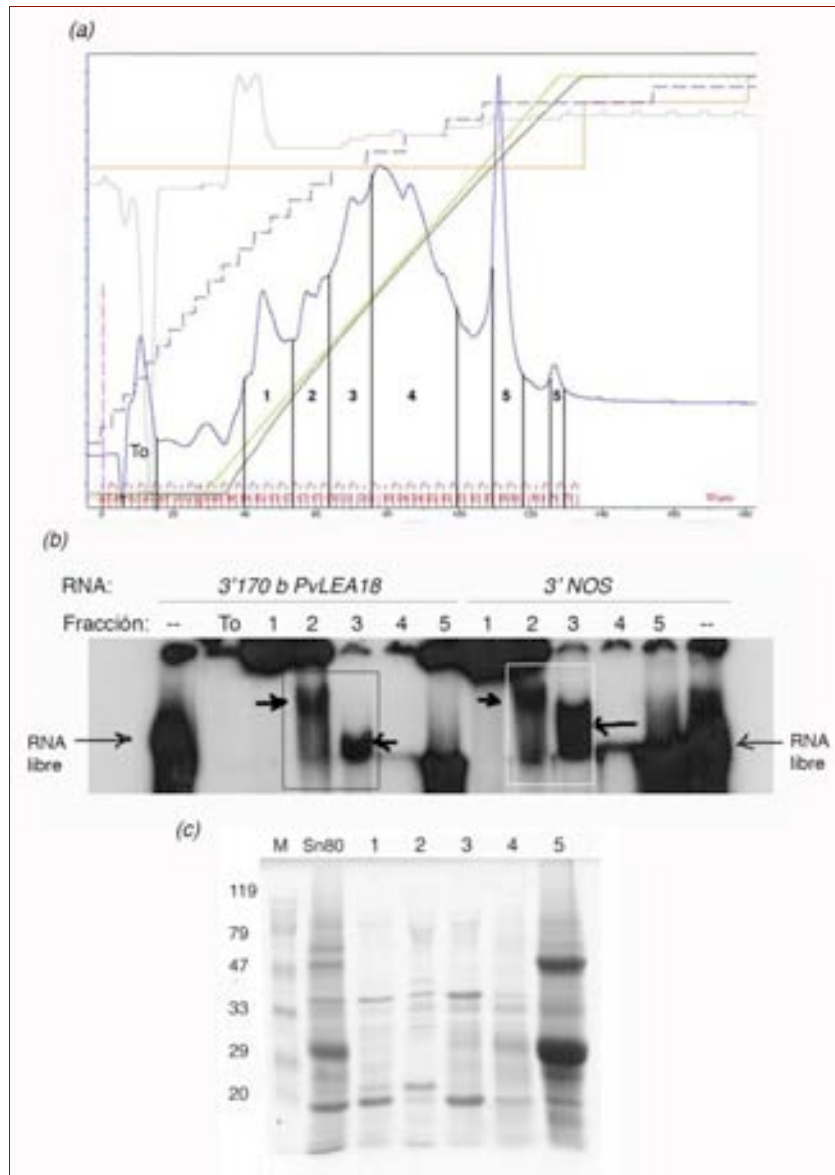


Figura 31: Enriquecimiento de la fracción del sobrenadante de 80% por cromatografía de intercambio iónico. (a) se muestra el perfil de elución de una columna mono Q (ver materiales y métodos para los detalles). Las fracciones eluidas se agruparon para tener muestras (1, 2, 3, 4 y 5), las cuales se ensayaron por su actividad de retardamiento en ensayos con RNA marcado (REMSA) utilizando el RNA marcado de las regiones: *3'170b PvLEA18* o *3'NOS*. To corresponde a las proteínas que no se pegan en la columna (eluito en el momento del lavado de la columna con buffer sin sal) En los recuadros se muestran las bandas obtenidas en ambas interacciones. (c) Perfil de proteínas totales luego de concentrar los grupos de fracciones obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico.

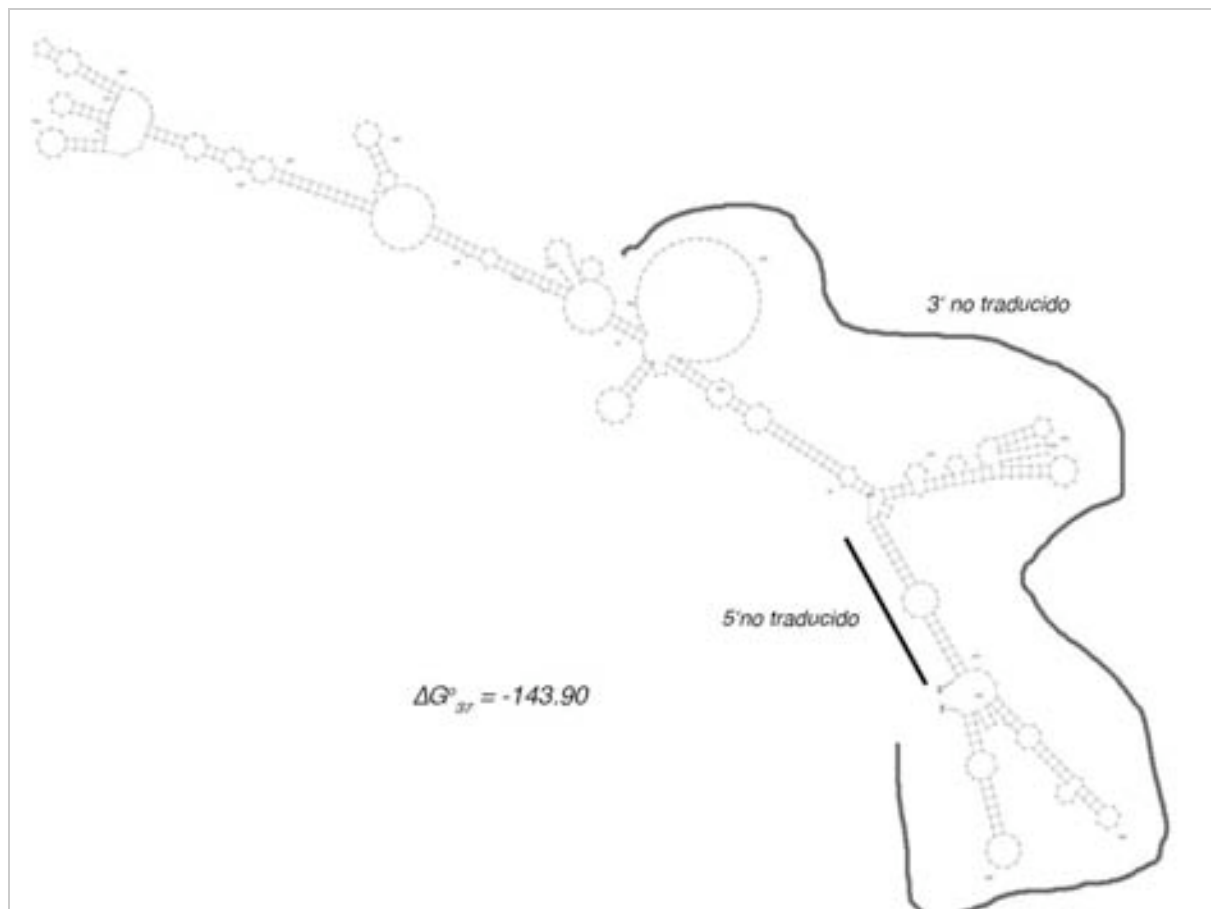


Figura 32: Estructura secundaria teórica del mensajero de PvLEA18 utilizando el algoritmo de Zucker (MFold).



DISCUSIÓN.

Una de las primeras observaciones bioquímicas de plantas sometidas a largos períodos de estrés hídrico sugirieron que la síntesis de proteínas se veía afectada durante el estrés. Estas primeras publicaciones demostraron que el estrés hídrico provoca en las plantas no solo una disminución en el contenido de proteínas totales comparadas con plantas crecidas en riego óptimo (Shah y Loomis, 1965), sino que además mostraban una disminución en la incorporación de aminoácidos (Ben-Zioni *et al.* 1967) y un cambio en el perfil de proteínas sintetizadas (Dhindsa y Cleland, 1975). Estos datos sumados a la disminución en el contenido polisomal demostraron que la inhibición en la síntesis de proteínas es una consecuencia del estrés hídrico (Hsiao, 1970; Dhindsa y Cleland, 1975; Mason *et al.* 1988). Paradójicamente, una de las respuestas de tolerancia al estrés, es el cambio en la expresión genética (Ingram y Bartels, 1996), lo cual requiere de la síntesis *de novo* de proteínas para tener un impacto en la capacidad de respuesta de la planta; por lo tanto, se propuso que se requería de una traducción selectiva. Esto significa que mientras permanezca la condición estresante, la síntesis de proteínas global se mantiene reducida, sin embargo, a pesar de ello, los transcritos para aquellas proteínas necesarias para tolerar el estrés podrán ser traducidos gracias a ciertos mecanismos regulatorios para favorecer su traducción (Bailey-Serres, 1999). La evidencia experimental que apoya la existencia de mecanismos que permiten esta traducción diferencial se obtuvo evaluando los transcritos asociados a polisomas bajo condiciones de estrés hídrico (por ejemplo: *osm* y *lpt*) y la comparación con otros transcritos cuya expresión es constitutiva (por ejemplo: *eIF4A* y *rbcS*) (Kawaguchi *et al.* 2003). Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado los mecanismos por los cuales la célula vegetal en estrés, modula la asociación a polisomas de ciertos transcritos o cómo es que favorece la traducción selectiva. La información que se obtuvo del análisis de la población de transcritos polisomales generada en condiciones de déficit hídrico, permitió identificar algunas secuencias que podrían participar en estos mecanismos regulatorios, particularmente en la región 5' no traducida (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2005). En nuestro laboratorio hemos encontrado que el gen *PvLEA18* ha resultado ser un buen modelo para el estudio de la regulación de la expresión genética en condiciones de déficit hídrico. Se ha caracterizado su expresión en condiciones de desarrollo, de déficit hídrico y por tratamientos con ABA, mostrando un patrón de expresión que durante la embriogénesis es consistente con sus características como proteína LEA (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; 1999); en tanto que durante el desarrollo vegetativo muestra su sensibilidad a cambios en el estatus hídrico de la planta. Adicionalmente a los patrones de expresión deducidos a partir de la acumulación de su transcrito, se llevó a cabo el análisis de la expresión en plantas de *Arabidopsis*, utilizando un gen reportero fusionado al promotor del gen *PvLEA18* y a la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o *NOS*, siendo ésta última la que comúnmente se utiliza para este tipo de análisis. Este análisis permitió establecer otro punto de regulación poco estudiado en los genes de plantas y que se refiere al papel que la región 3' no traducida cumple en la regulación y expresión de un

gen y que, de hecho, es aditiva a la regulación que impone el promotor. *PvLEA18* es el primer gen reportado de plantas, en el cual se ha demostrado que la región 3' no traducida del gen cumple un papel importante que le permite modular su expresión bajo condiciones de déficit hídrico (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001).

En este trabajo hemos demostrado que el efecto que ejerce la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* se produce a nivel post-transcripcional (Figura 11, 12 y 13), específicamente, que ocurre a nivel traduccional. Para llevar a cabo este análisis de la forma apropiada, primero se delimitó la región 3' no traducida del mensajero; ya que, el hecho de no haber podido aislar ninguna clona de cDNA con el poli (A)⁺ impidió establecer la extensión de la misma. Se estableció que la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* es de aproximadamente de 300 bases y que la información necesaria para inducir el efecto incrementador en la expresión de la proteína respectiva esta contenida en un fragmento de 170 bases, contadas a partir del codón de termino (ver figura 23).

El efecto de esta región se restringe al nivel traduccional ya que se demostró que este segmento no afecta la tasa transcripcional del gen, ni la estabilidad de su RNA mensajero en condiciones de bajo potencial hídrico. La ausencia o presencia de esta región en las construcciones quiméricas utilizadas, sólo mostró diferencias cuando se analizó la asociación de los diferentes transcritos (con o sin la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*) a polisomas bajo condiciones de limitación de agua. Estos resultados se validan al compararlos con la asociación a polisomas que se encontró para el RNA mensajero de un gen que se induce por estas condiciones de estrés (*ERD10* que codifica para una proteína LEA) o que mantiene en la población monosomal-polisomal, como es el caso de un factor de inicio de traducción constitutivo (*eIFA1*).

Estos datos son consistentes con las observaciones previas de Kawaguchi *et al.* 2003; 2004, quienes demuestran, como se mencionó anteriormente, que existen en *Arabidopsis* transcritos que se traducen preferencialmente bajo condiciones de déficit hídrico; sin embargo, en este trabajo contribuimos con información adicional al descubrir que estas secuencias localizadas en la región 3' no traducida están conservadas no solo en el transcrito del gen homólogo de *PvLEA18* de soya y de *Medicago*, sino también en otros transcritos, muchos de los cuales se acumulan en respuesta a la limitación de agua. Esto, sumado a que están presentes en la región activa de la región no traducida en la traducción, resulta relevante dado que las secuencias en las regiones no traducidas de un transcrito no presentan conservación a menos que tengan una función específica. Evolutivamente éstas regiones al no ser regiones codificantes pueden sufrir cambios sin que esto afecte la identidad del producto génico, de tal forma que ambas regiones no tienen la misma presión selectiva a menos que cumpla con alguna función en la expresión de las proteínas correspondientes. Esta función podría estar asociada con el procesamiento del RNA para dar lugar al mRNA maduro, aunque al parecer en plantas sólo se requiere

de una composición nucleotídica determinada más que de una secuencia específica. Los datos acumulados a la fecha indican que las secuencias importantes para que ocurra la asociación con proteínas reguladoras son las que se conservan en las regiones no traducidas de un transcrito, como es el caso de los sitios de unión para las proteínas CPEB. Los resultados de los ensayos de interacción con proteínas que se llevaron a cabo en este trabajo mostraron que la asociación de ciertas proteínas se da de manera específica con ciertas secuencias de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* en particular en la caja 2. Aún cuando en este trabajo se sugiere la relevancia de esta región en la traducción preferencial del gen *PvLEA18*, será necesario demostrar que las secuencias correspondientes a las cajas 1 y 2 y su interacción con proteínas realmente son importantes para que se favorezca la traducción de este gen bajo condiciones de estrés hídrico *in vivo*.

También correlaciona el hecho de encontrar secuencias similares en otros genes de plantas, algunos de ellos reportados como genes cuyo mensajero se induce en condiciones de estrés o situaciones de deshidratación fisiológica programada (semilla o polen). Además hemos encontrado otras proteínas de tipo LEA que llevan repetidos similares en su región 3' no traducida, tal es el caso de la WCOR410 de trigo, PM27 de soya y una proteína LEA1.

La unión específica de proteínas a esta región podría cumplir dos funciones. Por un lado, si bien no conocemos el largo del poli(A)⁺, los datos experimentales sugieren que este segmento es corto, (lo que pudiera ser una razón por la que no se logró aislar una cDNA claramente poliadenilado del gen *PvLEA18*), a pesar de que se aisló varias veces de las bibliotecas de expresión construidas a partir de cDNAs generados a partir de una reacción de transcriptasa reversa. Por otro lado, los experimentos de 3'RACE no amplificaron lo suficiente como para permitir la clonación del fragmento y solo se pudo detectar una banda por hibridación, lo cual podría ser explicado por tener un extremo poliadenilado corto que no permitió una adecuada complementación del oligo dT. Transcritos como éste, en el que la longitud pequeña del poli(A) impide una unión eficiente de las PABPs lleva a la idea de que sería necesario seleccionar secuencias adicionales que permitieran la unión de otras proteínas que estabilizaran y/o mimetizaran la unión de las PABPs, con la finalidad última de promover la interacción con los factores de inicio de la traducción; responsables de que la síntesis de proteínas se lleve a cabo (Figura 33).

Otra posibilidad que explicaría este efecto sin recurrir al tamaño de la secuencia del poli(A)⁺ es que estas proteínas de unión al RNA interactúen de forma independiente con los factores de inicio de la traducción y que de esta manera favorezcan o ayuden a promover la formación de los complejos de iniciación y la asociación de los ribosomas al RNA mensajero.

En cuanto a la posibilidad que el mensajero de *PvLEA18* se traduzca por un mecanismo alternativo, existen dos modelos que aquí podemos discutir. Uno de ellos involucra la vía independiente de cap, en

este mecanismo no se requiere del reclutamiento del factor eIF4E y los ribosomas se unen directamente a un sitio de entrada ribosomal interno (IRES), que se localiza en la región 5' no traducida del gen, el cual generalmente suele ser estructurado (Komenis y Wouters, 2006). En nuestro ejemplo, este modelo no sería el adecuado dado que la región 5' no traducida del gen es pequeña comparada con los 5' de plantas (solo 22 b) y al parecer no resulta ser muy estructurada, lo cual sería contradictorio al modelo.

El otro modelo implica la traducción por una vía independiente de poli(A)⁺, como se ha demostrado que ocurre en virus o en las histonas de eucariotas (excepto plantas). En este caso la región 3' no traducida es altamente estructurada y compensa la falta de poli(A)⁺ de dos formas, por un lado puede aparearse con pequeñas zonas de la región 5' no traducida y por otro puede reclutar factores de inicio de la traducción que ahora pueden interactuar con el extremo 5' e iniciar la traducción (ver modelo en Miller *et al.* 2007). En nuestro caso la estructura teórica del mensajero de *PvLEA18* muestra sitios de interacción entre las regiones 5' y 3' no traducidas (Figura 32).

Cabe mencionar aquí que el efecto incrementador de la región 3' no traducida sobre la traducción del transcrito del gen *PvLEA18* se detectó sólo cuando se utilizó el promotor de este gen y no así cuando se fusionó a un promotor fuerte como lo es el 35S del virus del mosaico del coliflor. Una explicación a tal resultado pudiera ser que cuando el transcrito se expresa en niveles demasiado altos que rebasan los niveles que normalmente alcanza el transcrito del gen *PvLEA18* como sería el caso, la función estimulante de la región 3' no traducida se vuelve innecesaria; ya que los niveles serán igualmente altos tanto bajo condiciones de irrigación óptima como en déficit hídrico. Aún cuando el efecto de esta región siguiera ocurriendo sobre estos transcritos, éste se vería ensombrecido por los altos niveles de la proteína reportera en ambas condiciones, los resultados obtenidos previamente (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001) a partir del análisis de múltiples líneas transgénicas conteniendo las construcciones con o sin la región 3' no traducida indican que aunque esta región ejerce un efecto estimulador aún en condiciones óptimas de irrigación, este efecto es claramente mayor en respuesta a condiciones de limitación de agua, lo cual reafirma la idea de que el efecto de esta región no traducida participa en favorecer la traducción del transcrito bajo condiciones de crecimiento óptimo puede de hecho ser el resultado de percibir un cambio en el estatus hídrico de la planta asociado con algún estado de desarrollo particular. Un ejemplo de tal situación ocurre también con la expresión del gen *PvLEA18* durante la elongación del hipocotilo de frijol, en donde el transcrito y la proteína de este gen se acumulan abundantemente en las regiones de mayor elongación, las cuales presentan potenciales hídricos más negativos que las regiones que han dejado de crecer, en donde correlativamente la acumulación del transcrito y la proteína es menor. Estas observaciones plantean un modelo en el que la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* lleva a cabo una función de modulación fina sobre la expresión de la proteína,

asegurando así su acumulación en los momentos y lugares adecuados detectados a través del estatus hídrico de la célula o tejido particular en la planta.

Así mismo hemos observado que la región 3' no traducida puede asociar a otras proteínas dependiendo del estado de desarrollo. Esto se pudo observar cuando realizamos los ensayos de interacción con RNA y extractos de embriones, ahí detectamos a otras proteínas capaces de interactuar con la región 3' no traducida. Esto amplía nuestro punto de vista, ya que la regulación podría modularse de acuerdo con las condiciones fisiológicas o de desarrollo de la planta, sumándose a la propia regulación a nivel transcripcional del gen *PvLEA18*.

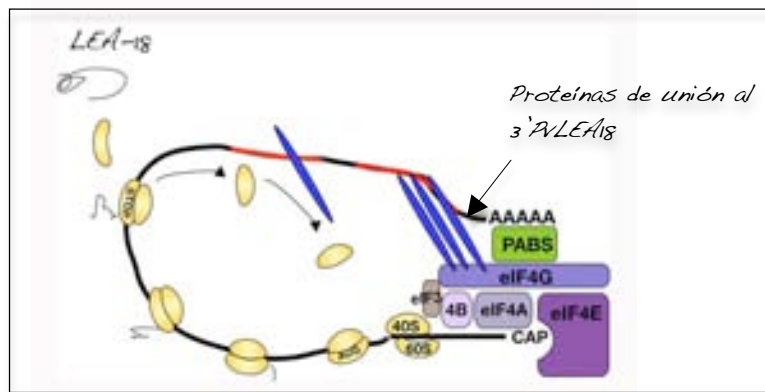


Figura 33: Modelo posible propuesto en el cual las proteínas de unión a RNA podrían interactuar con los factores de inicio de la traducción estabilizando la estructura circular del mensajero.

Conclusiones.

Pudimos establecer parte de la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18* a través de su región 3' no traducida. El gen se induce a nivel transcripcional en condiciones de déficit hídrico y en condiciones de desarrollo. Sin embargo, la región 3' no traducida está involucrada en un mecanismo de regulación post-transcripcional que favorece la carga del mensajero a polisomas durante el déficit hídrico, lo cual explica la mayor actividad del reportero cuando lleva la región 3' del gen *PvLEA18*, reportada por primera vez por Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001.

El elemento funcional de esta regulación se localiza en las primeras 170 bases a partir del codón de terminación, coincidiendo con la presencia de cajas (C1 y C2) que se conservan en los genes homólogos a *PvLEA18* en leguminosas, aunque también se han localizado en otros genes de *Arabidopsis* que responden a estrés. De manera interesante hemos detectado proteínas de extractos de frijol en condiciones de estrés y en embrión que se unen a esta región de manera específica y que la mutación en estas cajas evitan la unión.

Los resultados que obtuvimos si bien no logran establecer el mecanismo por el cual se favorece la traducción, demuestran por primera vez que existen secuencias en la región 3' no traducida que favorecen la traducción de un gen en condiciones de déficit hídrico.

Perspectivas.

Existen diversos puntos que quedan por establecer y que conducirían al esclarecimiento del mecanismo de traducción y que implican:

- el mapeo de la región 3' no traducida del gen en el fragmento de 170 bases a partir del codón de terminación, para lo cual se pueden generar mutantes de ambas cajas y ver la actividad *in vivo* de las mutaciones.

- identificar y caracterizar a la proteína de unión de RNA. Una vez identificada se podría establecer si es capaz de interactuar con las proteínas PABPs y/o con los factores de inicio de la traducción. En este punto cabe mencionar los esfuerzos que hemos realizado en tratar de enriquecer la proteína de 20 kDa por diferentes pasos de purificación. En estos intentos pudimos observar que el pI de la proteína es alto, mayor a 8.8 y por sus características (que no precipitan en alta concentración de sal y también que se requiere de un volumen alto de acetona para que precipiten) parece ser hidrofílica, lo cual sería otra característica importante para su función en condiciones de deshidratación a nivel celular, sin embargo se requieren otros métodos de purificación por que el utilizado no es el adecuado.

- Análisis realizados en el laboratorio sugieren el papel de ABI1 en la regulación por la región 3' no traducida en semilla seca. Transgénicas que llevan las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* en el fondo genético *abi1*, muestran una disminución en las veces de inducción de la actividad de GUS la línea *3'PvLEA18* sobre *3'NOS*. Lo que podría sugerir un efecto indirecto de ABI1 en la regulación de la traducción mediada por el *3'PvLEA18* durante la embriogénesis tardía (Jiménez, Tesis de Maestría, 2008).

- Por otro, desde el punto de vista biotecnológico sería interesante evaluar si esta regulación se da en soya, dada la presencia de las cajas en la región 3' no traducida de los genes PM35 (homólogo a *PvLEA18*). Dado el impacto del uso de la soya transgénica en la agricultura, sería relevante el poder modular la expresión de un transgen en un cultivar a campo, de manera traduccional, teniendo en cuenta que un cultivo a campo sufre de un mayor número de estreses.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material Biológico.

En este trabajo se utilizaron plantas de dos especies: frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa) y *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia).

2. Condiciones de crecimiento óptimas y generación del déficit hídrico.

En este trabajo se utilizó tejido de frijol en dos etapas diferentes de desarrollo, para cada etapa el tratamiento del tejido fue diferente. Cuando se utilizaron semillas para la remoción de los embriones secos se procedió del siguiente modo: se eligieron las semillas de igual tamaño y que no presentaran la testa dañada o de un color diferente al negro-violáceo, propio de la variedad de frijol Negro Jamapa. Las semillas se sumergieron en etanol al 100% durante 2 minutos, luego se escurrieron y se colocaron sobre papel para dejar secar al aire. Posteriormente con ayuda de una navaja, se removieron los embriones que se colectaron en N₂ líquido.

Cuando se utilizaron plántulas de frijol, se siguieron los protocolos que se utilizan en el laboratorio para la esterilización de la semilla y el crecimiento (Covarrubias et al. 1995). La semilla de frijol se selecciona tomando aquellas de igual tamaño y sin daño en su testa. Se esteriliza de forma superficial sumergiendo las semillas en una solución de 50% de cloro y 0.10% Tween-20. Se deja 2 minutos con agitación y luego se enjuaga abundantemente con agua destilada estéril. Se preparan las charolas cubriendo su superficie con varias capas de papel que luego se humedece con agua destilada. Las semillas se colocan dejando un espacio de 2 cm aprox. entre ellas y la charola se cubre con aluminio. Se dejan en oscuridad a 28°C durante 3-4 días hasta que el hipocótilo alcanza aproximadamente 3 cm. Las plántulas se transplantan a vermiculita, un sustrato inerte, descartando aquellas que muestren algún signo de ataque por patógenos o un desarrollo anormal. Se realizan dos trasplantes, uno a condiciones óptimas de riego y otro a condiciones de déficit hídrico. En el primer caso, el sustrato se riega con agua destilada en una proporción de 5 ml/gr vermiculita, en el segundo caso, para generar el estrés hídrico, el sustrato se riega con 1/12 X de la cantidad óptima 0.42 ml/gr de vermiculita. Las charolas se incuban a 28°C en condiciones de oscuridad. En estrés se requiere de 3-4 días para inducir al mensajero de *PvLEA18* (Covarrubias et al. 1995).

Arabidopsis thaliana se utilizó para generar plantas transgénicas o para analizar las líneas transgénicas. Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizan superficialmente con: 100% etanol (2 min), solución de: 40% cloro, 0.02% tritón (7-10 min) y agua estéril (6 lavados) y luego se siembran para su germinación *in vitro*, sobre un medio de crecimiento (1X Murashige & Skoog, 1% sacarosa y 0.65% agar). Durante la estratificación las cajas se mantienen durante 72 hs a 4°C en oscuridad y luego se pasan a un cuarto de crecimiento bajo condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperíodo de 16 hs. luz/ 18 hs oscuridad en 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 22°C).

Cuando se utilizaron para transformar se transplantaron en Metromix-250 y se crecieron durante 30-40 días, cortando los primordios florales para obtener un número mayor de ellos en el momento de la transformación. Para la transformación se siguió el método de Clough y Bent, 1998. Una vez obtenida la semilla (T₀) se siembra en medio MS de selección (50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina, 400 $\mu\text{g/ml}$ de claforán, 1X Murashige & Skoog, 1% sacarosa y 0.65% agar) para obtener las líneas transgénicas. Las líneas transgénicas se seleccionaron durante el crecimiento *in vitro* en medio con antibiótico, en nuestro caso se utilizó como marcador kanamicina, éste marcador sirvió para realizar la genotipia en las distintas generaciones. Se consideraron como líneas con una única inserción del transgen aquellas plantas que mostraron una herencia fenotípica de tipo mendeliano (3:1) al marcador kanamicina en la generación T₁. Las líneas homocigas (100% de crecimiento en kanamicina) se obtuvieron hasta la generación T₃ y se utilizaron para medir la actividad de *GUS*.

Para los tratamientos de estrés hídrico, las plantas que se crecen *in vitro* se transplantan a los 10 días a un sustrato inerte (Turface) para evitar el estrés que se genera en la caja de crecimiento *in vitro*. Cuando se requirió de grandes cantidades de material vegetal de *Arabidopsis*, la semilla transgénica se sembró de forma directa en charolas grandes con Turface. En este sustrato se realizó la estratificación y su crecimiento durante 2-3 semanas.

Los tratamientos de déficit hídrico se aplicaron de diferente forma dependiendo de los requerimientos del experimento, en todos los casos se realizaron tratamientos en cámara húmeda. En esta cámara se genera un ambiente de alta humedad que permite que la planta pierda agua de forma lenta. El experimento se realiza en un contenedor plástico, cuya base se recubre con papel húmedo.

Sobre esta base, se colocan tiras de plástico (Parafilm) sobre el cual se ubican las plantas de *Arabidopsis* de 15-20 días. Una vez puestas las plantas toda la cámara se cubre con una película plástica (film) haciendo pequeños hoyos para que se produzca una evaporación lenta. Esta cámara se deja en el cuarto de cultivo a 21°C con fotoperíodo hasta que las plantas pierden el 30% de su peso inicial.

Para la extracción de núcleos se utilizaron las rosetas de *Arabidopsis* de plantas de 21 días. La roseta se corta y se coloca en una cámara húmeda hasta que pierden el 30% de su peso.

Otro método que utilizamos para la generación del déficit hídrico fue el estrés osmótico. Como se describió en la sección de resultados, las plantas se colocan en una solución al 25% de PEG (Polietilenglicol, peso molecular 8000) disuelto en 0.5 X de Murashige & Skoog (MS). Esta solución se esterilizó por filtración para evitar la degradación del PEG. Las plantas de 15-20 días se coloraron en una cámara, en la cual solo la raíz esta en contacto con la solución de PEG y esta solución se mantuvo con agitación durante el experimento.

Las plantas transgénicas transformadas con *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* se generaron y se analizaron por Moreno-Fonseca LP, (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). De estas líneas elegimos una línea representante para cada construcción (*ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18*, línea 842 y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS*, línea 952).

3. Experimentos para definir la región 3' no traducida.

Las plantas transgénicas que se utilizaron (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001) contienen una región 3' no traducida de 607 bases. Con el objeto de definir con mayor precisión esta región se llevaron a cabo dos experimentos. Por un lado se definió el tamaño del mensajero completo en un ensayo de tipo Northern blot. El tamaño del transcrito así determinado fue de 550 bases \pm 50 bases, con lo cual define una región 3' no traducida para el transcrito del gen *PvLEA18* de 280 \pm 20 bases, considerando que la región 5' no traducida es de 22 bases y la región codificante es de 248 bases. El otro experimento fue de 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA 3' Ends) para lo cual se extrajo RNA de frijol de embrión y de plántulas sometidas a tratamientos de déficit hídrico. Este RNA se utilizó para las reacciones de transcriptasa reversa (RT: Reverse Transcriptase) utilizando el oligo-dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'). Posteriormente se utilizó este cDNA para hacer dos ciclos de PCR anidados usando como oligos, el oligo específico correspondiente a la región codificante del gen *PvLEA18* [5'-TACAAGGATTTGGAGG-3'] (primera reacción de PCR) o el oligo de región 3' no traducida del gen [5'-CAAGGAGCTCCCTGAATTACACCACCTCC-3'] (segunda reacción de PCR) y el otro oligo dT para en ambas reacciones de PCR. En la primer reacción solo se observó un barrido y en la segunda reacción se obtuvieron múltiples bandas. Para definir la amplificación se hibridó con una sonda radiactiva de la región 3' no traducida del gen y se detectó una banda de 300 bases aproximadamente.

Para obtener las construcciones que llevan las 300 bases de la región no traducida y un fragmento de 170 bases se procedió de la siguiente forma: ambos fragmentos se obtuvieron de una reacción de PCR utilizando los oligos con los sitios para las enzimas apropiadas para su clonación y teniendo como templado la región de 600 bases del 3' no traducido del gen *PvLEA18* (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Ambos fragmentos se fusionaron a la región 3' no traducida del gen NOS, y luego se clonaron en el vector binario que lleva la construcción *ProPvLEA18:GUS*, utilizando los sitios de restricción apropiados. Estos vectores se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) por electroporación. Una vez seleccionadas las colonias positivas y corroboradas las secuencias se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* según el método de Clough y Bent, 1998 (ver sección anterior).

Las mutaciones en las cajas 1 y 2 en el fragmento de 170 bases de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* se introdujeron por reacciones de PCR utilizando oligos que llevan las mutaciones. Las mutaciones se hicieron al azar y las secuencias se modificaron de la siguiente forma: la caja1 (C1) cuya secuencia es 5'-TTTTTCGATCATGACATGTT-3', se cambió a 5'-TTAGTTCAGTGTCTTCATA-3' (C1m) y la caja 2 (C2) 5'-TTTTTGTTGTTGCCAAATTT-3' se modificó a 5'-TGCATTGATATTATTCGCT-3' (C2m).

Para la expresión constitutiva se utilizó el vector binario (pBin) que lleva el promotor *ProCaMV35S* fusionado al gen reportero *GUS* y a la región 3' no traducida del gen *NOS*. En este vector solo se cambió la región 3' no traducida por la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*. Las construcciones *ProCaMV35S:GUS:3'PvLEA18* y *ProCaMV35S:GUS:3'NOS* en pBin se introdujeron por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* y luego se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis*, de acuerdo al protocolo antes descrito.

4. Aislamiento de núcleos de *Arabidopsis* y medición de la tasa transcripcional.

Los núcleos se aislaron utilizando el protocolo de Watson y Thompson (1986), con algunas modificaciones: se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de 15 días en condiciones de riego óptimo y bajo tratamiento de déficit hídrico. Luego de los tratamientos el tejido (25g) se colecta sobre hielo y se lava con éter anhidro frío (-20°C) (3-5 vol/gr tejido) varias veces, luego se escurre y se deja evaporar el resto de éter. Se lava con 2 vol de buffer de extracción. Posteriormente se homogeniza utilizando un Polytron a baja velocidad y por tiempos cortos (cuarto frío) en el buffer de extracción frío: 1M hexilenglicol, 10mM Tris-HCl pH 7.0, 10mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol. Posteriormente se filtra por gasa para retirar el tejido y se agrega Tritón X-100 a una concentración final de 0.5%. Este filtrado se pasa por Miracloth. Se centrifuga a 3000 rpm 30 min. Se resuspende en buffer de gradiente (100 ml) y se vuelve a centrifugar 3000 rpm 15 min. El pellet se colecta con pincel, se resuspende en buffer de gradiente (100 ml) y se vuelve a centrifugar 3000 rpm 15 min. Este segundo pellet (núcleos enriquecidos), se resuspende en 2 ml de buffer de núcleos: 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol, y 20% glicerol. Se guardan a -80°C, alicuotados. Inicialmente los núcleos se separaron en un gradiente discontinuo de Percoll (5 ml de 30% y 8ml de 60%) para obtener núcleos purificados. El Percoll se disolvió en una solución 0.5 M hexilenglicol, 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol, 0.5% Triton X-100. Si el extracto excede el volumen para un gradiente se centrifuga (10 min a 1000xg) para concentrar en una pastilla que luego se resuspende en el volumen apropiado. El gradiente se centrifugó a 200 xg por 30 minutos y los núcleos deben quedar en el fondo del gradiente, como una película sobre los amiloplastos. En nuestro caso los núcleos de las plantas que provienen de tejido en déficit hídrico no sedimentaban totalmente, por lo que decidimos utilizar el extracto inicial con núcleos enriquecidos para realizar el experimento.

El número de núcleos por volumen de extracto se cuantificó utilizando una cámara de contaje (Neubauer).

5. Reacción de transcripción.

La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando 3 x 10⁷ núcleos de cada condición. Se siguió el protocolo descrito por Sheu JJ (1994). La reacción de transcripción se inició por la adición de los núcleos (50µl) a 50µl de esta mezcla: 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM DTT, 20 mM MgCl₂, 120 mM (NH₄)₂SO₄, 1mM de ATP, CTP y GTP y 20% glicerol. Luego se agregaron 200 U RNaseOUT (Invitrogen), 50µg RNA de levadura y 250 µCi [³²P] UTP (3000 Ci mmol⁻¹) (Amersham). La reacción se incubó 30 min a 25°C, luego se agregan 10 µl 1mM UTP y se continuó con la incubación por 30 min. Posteriormente se agregan 5 U DNAsal (libre de RNAsas) y se incubó 30 min a 25°C, luego se adicionan 20 µg de Proteinasa K y se incubó 30 min mas. Después de este tiempo se extrae dos veces con fenol: cloroformo (1:1 v/v) y se precipita con acetato-NH₄: etanol (1: 6 v/v). El pellet se lava con etanol al 70%, se resuspende en agua DEPC y se mantiene a -20°C hasta su uso.

Para determinar la tasa transcripcional del gen *GUS* modulada por el promotor *PvLEA18* en presencia o ausente de su región 3' no traducida, en condiciones de riego óptimo o bajo condiciones de déficit hídrico se realizaron las extracciones de núcleos de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que llevan las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* (ver Figura 6). Los RNAs que se transcribieron utilizando un nucleótido radiactivo se utilizaron como sonda para hibridar una membrana de DNA en un experimento de tipo slot-blot. Para el experimento se usaron iguales cantidades en cpms de cada reacción de transcripción. El [³²P] RNA se hibridó contra tres cantidades distintas de plásmido linealizado (2.5, 5 y 7.5 µg) que contiene DNA de las regiones codificantes de los siguientes genes, clonados en el vector pKS⁺: *LT178* (At5g52310), *D113* (At5g06760), *ERD10* (At1g20450), *RCE1* (RUB1, enzima conjugadora de ubiquitina) (At4g36800), *EIF4A1* (At3g13920) y el 28S. pKS⁺ se usó como control interno. *LT178* (Nordin *et al.*1993), *D113* (Hoth *et al.* 2002) y *ERD10* (Kiyosue *et al.*1994) se utilizaron como controles de genes que se

inducen por déficit hídrico. *RCE1* e *eIF4A1* se consideraron como genes constitutivos y cuya expresión no varía por la deshidratación (Seki *et al.* 2002; Oono *et al.* 2003). El gen ribosomal *28S* se utilizó para normalizar la señal en todos los casos. La prehibridación e hibridación de las membranas se realizó a 42°C con el siguiente buffer: 50% formamida (v/v), 1% SDS, 40 X Denhard's, 50 mM Fosfato de Na pH 6.5, 5 X SSC, 0.1 mg/ml DNA de esperma de salmón.

6. Determinación de la vida media del mensajero.

Las líneas de *Arabidopsis* que llevan las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* se utilizaron en este experimento (ver Figura 6). La vida media se calculó como se describe en el trabajo de Newman y Green, (1993), pero con las siguientes modificaciones: se utilizaron plantas de 15 días de *Arabidopsis thaliana*, las cuales se transfirieron a una cámara que contiene una solución de 25% PEG-8000. Las plantas se dejaron en este medio durante 16 hs. Posteriormente se agregó Actinomicina D (Alexis Biochemicals, Qbiogene, Inc. USA) en una concentración final de 200 µg/ml, tiempo de inicio del experimento (t=0). Al mismo tiempo se mantuvieron los controles sin el agregado de Actinomicina D o en medio MS sin estrés osmótico. Se tomaron muestras en función del tiempo y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. El RNA total se extrajo utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen). Posteriormente el RNA se analizó por un ensayo de Northern blot: el RNA se separó en un gel de 1.2% agarosa/2.2% formaldehído. Se transfirió a una membrana de Hybond N⁺ (Amersham Bioscience) por transferencia semiseca utilizando SSC 20 X. El RNA se inmovilizó a la membrana por entrecruzamiento con UV (Stratalinker®). Posteriormente la membrana se hibridó con una sonda de DNA marcada con [α -³²P] CTP en una reacción de tipo random utilizando la enzima Klenow. El buffer de pre-hibridación e hibridación fue: 0.3 M fosfato de Na pH 7.2, 7 % SDS y 1mM EDTA. Se deja hibridando 18 hs a 55 °C. Las membranas se lavaron a alta astringencia con 0.1% SDS (p/v) 0.1X SSC (dos lavados de 15 min a 55°C). Estas cinéticas se hibridaron con la sonda radiactiva del gen reportero *GUS* y como control de carga se utilizó una sonda radiactiva del gen *28S*. Posteriormente las señales obtenidas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa NIHImage 1.63 (NHI, USA). Los valores obtenidos de la señal del mensajero del gen reportero *GUS* se normalizaron con la señal del mensajero del gen ribosomal *28S*. Posteriormente esta relación se graficó como el mRNA remanente (t=0 es el 100%) en función del tiempo, en una gráfica lineal de eje semilogarítmico (log10). Por análisis de regresión lineal se calculó la pendiente de la curva y en función de la línea de la recta calculamos la vida media del gen. Definimos la vida media de un mensajero como el tiempo en el cual la cantidad del RNA inicial es el 50% (Newman *et al.* 1993). La señal del tratamiento control (sin el agregado de Actinomicina D) se utilizó para normalizar el efecto del tratamiento osmótico sobre la transcripción.

7. Análisis de polisomas y del RNA unido a los polisomas.

Las plantas transgénicas de 15 días de las líneas de *Arabidopsis* que llevan las construcciones *ProPvLEA18:GUS:3'PvLEA18* y *ProPvLEA18:GUS:3'NOS* se utilizaron en este experimento (ver Figura 6). Para este experimento se germinaron las semillas sobre el sustrato Turface. Las macetas se dejaron 4 días a 4°C para la estratificación. Posteriormente se pasa a un cuarto de cultivo donde se deja en condiciones controladas de luz y temperatura durante 15 días. Estas plantas se someten a un tratamiento de déficit hídrico en cámara húmeda como se describió anteriormente. Seguido el tratamiento las plantas se congelan y se pulverizan en N₂ líquido. El polvo obtenido se congela a -80°C hasta el momento de la extracción. Los polisomas se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Kawaguchi *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Los complejos se separan en un gradiente continuo exponencial de 15 ml de 20-60% sacarosa (v/v), que se prepara el día anterior. El gradiente se ultracentrífuga (275,000 xg, 4°C 90 min) y se fracciona utilizando un Auto Density Flow (Labconco Corporation, USA). Cada alícuota se midió a A254, A260 and A280. De cada fracción se aisló el RNA, para esto se remueven las proteínas usando 0.02 mg/ml Proteínasa K, 0.5%SDS por 30 minutos a 37 °C. Luego se extrae dos veces con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (Dinkova *et al.*, 2005) y se analiza por ensayos de Northern Blot, para analizar las señales y cuantificarlas.

8. Análisis fluorométrico de GUS.

La actividad de GUS se determinó de acuerdo al método de Jefferson (1987). Brevemente, el tejido se colecta y es muy importante hacer inmediatamente los extractos para medir la actividad, ya que si se congela el tejido (-80°C) disminuye dramáticamente la actividad de GUS. El tejido (100 mg) se homogeniza con un volumen mínimo (50-100 μ l) de buffer de extracción: 50mM NaPO₄ pH 7.0, 10 mM β -mercaptoetanol, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Tritón X-100.

El homogenato se centrifuga 20 min a 16000xg. El sobrenadante (extracto total) se retira con cuidado y se cuantifica la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1977). Posteriormente, se mide la actividad de la siguiente forma: se utilizan 10-20 μ g de proteína total, 10 μ l de buffer de extracción y se lleva volumen final de 90 μ l con agua. La reacción se inicia con el agregado del sustrato para medir la actividad de β -glucuronidasa, 10 μ l de 10 mM MUG (4-metil-umbeliferona-glucósido), se incubaba a 37°C durante 15-30 min. La reacción se detiene con 0.9 ml de 0.2 M Na₂CO₃. Posteriormente se mide la formación de MU (4-metil-umbeliferona) en el fluorómetro. El volumen a cuantificar de cada reacción dependerá de la actividad de GUS en cada reacción. Si la actividad de GUS es muy alta, es conveniente disminuir el tiempo de la reacción y/o la cantidad de proteína para poder obtener una lectura confiable. Para calcular los picomoles de producto de cada reacción se realiza una curva estándar con MU (4-metil-umbeliferona) (0-400 picomoles). La actividad específica se define como los picomoles de MU por miligramo de proteína y por minuto.

9. Ensayos de interacción RNA-proteína.

Los RNA que se utilizaron en los ensayos de interacción se sintetizaron usando plásmidos que contienen la secuencia completa (*pKS+::300b-3'PvLEA18*), o un fragmento (*pKS+::170b-3'PvLEA18*) de la región 3' no traducida del gen *PvLEA18* o el 3' no traducido del gen *NOS* (*pKS+::3'NOS*).

Para la transcripción in vitro se utilizó DNA de plásmido linealizado o un fragmento de reacción PCR (usando los oligos T7-T3). En ambos casos la reacción de transcripción se realizó a partir del promotor de T7. Para la reacción se incubaron 1 μ g de DNA, 1X buffer de transcripción, 10mM DTT, 1 mM de ATP, CTP y GTP, 40 μ Ci [α 32P] UTP (800Ci/mmol, 20mCi/ml, Amersham), 0.1 mM UTP, 40U Inhibidor de RNAsas (Ribolock o RNaseOUT) 2 hs a 37°C. Luego se agrega 1 μ l DNasa I, y se incubaba 30 min a 37°C. El producto de la reacción se separa en un gel de secuencia al 5%. La banda obtenida se eluye del gel con buffer de elución: 200mM Tris pH7.5, 25mM EDTA pH 8.0, 300mM NaCl, 2% SDS, incubando toda la noche a temperatura ambiente con agitación; posteriormente se precipita con etanol al 100%. Al día siguiente se resuspende en agua DEPC y se calcula la actividad específica de la reacción (cpms iniciales totales/nanomoles de UTP totales). En base a la actividad específica y a las cpms totales finales, se calcula la cantidad de UTP incorporado y si lo dividimos por el número de UTPs del fragmento de RNA sintetizado podemos calcular los nanomoles de RNA sintetizados.

10. Extractos proteicos.

Para analizar aquellas proteínas que pudieran interactuar con el fragmento de RNA correspondiente a la región 3' no traducida del gen *PvLEA18*, se hicieron extractos de proteínas totales utilizando como tejido plántulas o embriones secos de frijol o plantas de *Arabidopsis* de 15 días. El tejido se pulverizó finamente en N₂ líquido para luego hacer un homogenato con el siguiente buffer de extracción: 200 mM HEPES-KOH pH 7.50, 15% glicerol, 2 mM DTT, 1% Tritón X-100 (v/v), 1mM PMSF, 5 mM EDTA, usando una proporción de 1 volumen de tejido a 2 volúmenes de buffer. Una vez agregado el buffer al polvo de N₂, se mezcla hasta que se logra homogeneizar y descongelar el tejido, posteriormente se deja 10 minutos en hielo y se filtra por gasa. Este filtrado se centrifuga 20 minutos a 27000xg a 4°C (extracto clarificado). Posteriormente, el extracto clarificado se fraccionó utilizando (NH₄)₂SO₄ sólido (es preferible moler la sal en mortero para que este muy fina en el momento de hacer la precipitación, también se puede hacer en el molinillo eléctrico si es una cantidad mayor). Se realizaron varios cortes: 0-20, 40, 60, 80 % y fracción soluble de 80%. Cada fracción obtenida se dializó exhaustivamente contra el buffer de diálisis: 20 mM HEPES-KOH pH 7.50, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2% glicerol (v/v). Cada fracción dializada se incubó con el RNA marcado en los ensayos de entrecruzamiento con UV o en los experimentos de tipo REMSA. Cuando se identificó la fracción soluble de 80% de (NH₄)₂SO₄, esta fracción se concentró con filtros

de centrifugación (Amicon® Ultra, 5K) cuando el volumen fue pequeño, o alternativamente se precipitó con 5 volúmenes de acetona fría. El precipitado que se obtuvo se resuspendió en buffer de diálisis. Es importante tener en cuenta que para obtener la proteína de 20 kDa se deben realizar los cortes de la forma que se describió, ya que no se obtuvo el mismo resultado cuando los cortes se realizaron de esta forma: 0-60, 80% y fracción soluble de 80%. Cabe aclarar que para realizar los cortes se utilizó una tabla de purificación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ calculada para 4°C.

En un intento de enriquecer la proteína se hizo un paso de purificación utilizando una cromatografía de intercambio iónico (MonoQ). Para esto, la fracción soluble de 80% de sulfato de amonio dializada y precipitada con acetona se resuspendió en 20 mM Piperidina pH 10.6. Antes de sembrar en la columna MonoQ se hace un paso de desalado por filtración en gel, para asegurarnos que la proteína esta totalmente desalada. Este paso se realiza en columnas de Sephadex-G25 equilibradas con 20 mM Piperidina pH 10.6. Las columnas se armaron en jeringas de 5ml y se centrifugaron 5 min a 1500 xg. Posteriormente se siembra la proteína (0.5 ml) y se centrifuga 5 min a 1500 xg. Esta proteína desalada (3 mg), se aplicó a una columna HiTrap Q (5ml, Pharmacia), pre-equilibrada con 20 mM Piperidina pH 10.6. La proteína se eluye con un gradiente lineal de 0-1M NaCl, con un flujo de 2.5 ml/min. Se colectaron fracciones de 2 ml que se concentraron por filtración (Amicon® Ultra, 5K).

11. Ensayos de entrecruzamiento RNA-proteína con UV.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl : 10 μg de extracto proteico se pre-incubaron con 1X de solución de sales (10 mM acetato de Mg, 50 mM acetato de K, 50 μM EDTA), 40U inhibidor de RNAsas (RNaseOUT (Invitrogen) o Ribolock (Fermentas)), 1X de buffer (10 mM Hepes-KOH pH 7.5, 5% glicerol (v/v)), 10 μg tRNA de levadura, durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se agregó el RNA marcado (1×10^5 cpm, 0.25 pmol). Se utilizó el RNA de 300 bases o 170 bases *3'PvLEA18* y el RNA de *3'NOS* como control, se incubó 10 min a 30°C. Después de la incubación los tubos se colocaron sobre hielo y se irradiaron durante 10 min (100 μJ x 100), a 5 cm de la fuente de luz UV (Stratalinker®). Luego se agregaron 20 μg RNasaA y se incubaron 30 minutos a 37°C y se detiene agregando Laemli (1X final) e hirviendo 2 minutos. Las reacciones se separaron en una cromatografía de SDS-PAGE al 15% (Laemli, 1970). Posteriormente el gel se seca (80°C 2hs) y se expone sobre una placa de rayos X (Kodak Films).

12. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de RNA (REMSA; RNA Electrophoretic mobility shift assay)

El ensayo se realizó como se describió previamente (Del Ángel, *et al.*, 1989). El RNA marcado (40 femtomolas) que correspondió a las construcciones *170b-3'PvLEA18*, ó *3'NOS*, ó *170b-(C1m) 3'PvLEA18* ó *170b-(C2m) 3'PvLEA18* se incubó 5 minutos sobre hielo con 10; 20 ó 40 μg de proteína (fracción soluble de 80% de Sulfato de amonio) o extracto parcialmente purificado por cromatografía de intercambio iónico en 50 μl que contienen 5 mM Hepes-KOH pH 7.5, 4 mM MgCl_2 , 10 μM DTT, 50 μM EDTA, 5% glicerol, 8 U de inhibidor de RNAsas (Ribolock, Fermentas). La reacción RNA-proteína se resolvió en un gel nativo de poli(acrilamida) al 6% (acrilamida:bisacrilamida 16:0.2). El gel se pre-corre en TBE 0.5 X (30 min a 25 mAmp) en el cuarto frío a 4°C; se siembran las muestras y se corren a corriente constante (25 mAmp) en TBE 0.5 X durante 3.3 hs. El gel se seca y se expone en un film.

13. Traducción *in vitro*.

Para el experimento de traducción *in vitro* se utilizó el sistema de transcripción/ traducción acoplada usando las construcciones *ProT7:GUS: 3'170PvLEA18*, *ProT7:GUS:3'170PvLEA18B1m* y *ProT7:GUS:3'170PvLEA18B2m*. En este experimento se utilizó el sistema de germen de trigo TNT® acoplado siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega). Los productos de la traducción se analizaron midiendo la actividad de GUS a partir de 1 μg de DNA inicial. Se graficaron las barras de error en cada caso (n=3).



BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFIA.

- AAAS: Atlas of population & environment (2001) American association for the advancement of science. Editado por Lyons, J, Hawkins, C. The University California Press (<http://atlas.aaas.org/>).
- Abaza I, Gebauer F (2008) Trading translation with RNA-binding proteins. *RNA* **14**: 404-409.
- Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada J (2006) A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell* **18**: 3355-3369.
- Bailey-Serres J (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* **4**: 142-148.
- Bailey-Serres J, Dawe RK (1996) Both 5' and 3' sequences of maize *adh7* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* **112**: 685-695
- Bailey-Serres J, Freeling M (1990) Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* **94**: 1237-1243.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research* **34**: W369-W373.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sciences* **24**: 23-58.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* **148**: 6-24.
- Bate N, Spurr C, Foster GD, Twell D (1996) Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* **10**: 613-623.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: From individuals to ecosystems. Organism in their environments: the evolutionary backdrop.* Blackwell Publishing. p 3-29.
- Benfey PN, Ren L, Chua N-H (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* **8**: 2195-2202.
- Bensen RJ, Boyer JS, Mullet JE (1988) Water deficit-induced changes in abscisic acid, growth, polysomes, and translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* **88**: 289-294
- Ben-Zioni A, Itai C, Vaadia Y (1967) Water and salt stresses, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **42**: 361-365
- Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1995) Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Physiol. Plantarum* **93**: 630-638.
- Boyer JS, Silk WK (2004) Hydraulics of plant growth. *Functional Plant Biology* **31**: 761-773.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bradyz SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P (2003) The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **34**: 67-75.
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira R, Bailey-Serres J (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Annals of Botany* **96**: 647-660.
- Bray EA (1988) Drought- and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* **88**: 1210-1214
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp. Bot.* **55**: 2331-2341.
- Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**: 268-280.
- Browne JA, Dolan KM, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell AM (2004) Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot. Cell* **3**: 966-975.
- Campalans A, Messeguer R, Goday A, Pagès M. (1999) Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 327-340.
- Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* **205**: 1144-1147
- Cascardo JC., Almeida RS, Buzeli RA, Carolino SM, Otoni WC, Fontes EP (2000). The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *JBC* **275**: 14494-14500
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Abad M, Kumar G, Salvador S, D'Ordine R, Navarro S, Back S, Fernandes M, Targolli J, Dasgupta S, Bonin C, Luethy MH, Heard JE (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain

yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol.* **147**: 446–455.

CIAT in focus, <http://www.ciat.cgiar.org/ciatinfocus/beans.htm>

Cléry A, Blatter M, Allain FT (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Op. Struct. Biol.* **18**: 290–298.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.

Colmenero-Flores JM, Campos F, Garciarrubio A, Covarrubias AA (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol.Biol.* **35**: 393–405.

Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith CE, Covarrubias AA (1999) Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol.* **120**: 93–103.

Covarrubias AA, Ayala JW, Reyes JL, Hernández M, Garciarrubio A (1995) Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **107**: 1119–1128

Creelman RA, Mason HS, Bensen JR, Boyer JS, Mullet JE (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. *Plant Physiol.* **92**: 205–214

Cutler AJ, Krochko JE (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Sci.* **4**: 472–478.

Chan MT, Yu SM (1998a) The 3' untranslated region of a rice α -amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA. *Plant J.* **15**: 685–695.

Chan MT, Yu SM (1998b) The 3' untranslated region of a rice α -amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *PNAS* **95**: 6543–6547.

Chen R, Silver DL, de Bruijn FJ (1998) Nodule parenchyma-specific expression of the *Sesbania rostrata* early nodulin gene *SrEnod2* is mediated by its 3' untranslated region. *Plant Cell* **10**: 1585–1602.

Chen THH, Murata N (2008) Glycine-betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* **13**: 1360–1385.

Cheng S, Gallie DR (2006) Wheat eukaryotic initiation factor 4B organizes assembly of RNA and eIF5A, eIF4A, and Poly(A)-binding protein. *JBC* **281**: 24351–24364.

Cheng S, Gallie DR (2007) eIF4G, eIF5A, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains. *JBC* **35**: 25247–25258.

Christensen AK, Kahn LE, Bourne CM (1987) Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat anterior pituitary. *Am. J. Anat.* **178**: 1–10.

Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 209–219,

Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J.* **52**: 167–174.

Daie J, Campbell WF. (1981) Response of tomato plants to stressful temperatures. Increase in abscisic acid concentrations. *Plant Physiol.* **67**: 26–29.

de Moor CH, Meijer H, Lissenden S (2005) Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**: 49–58.

De Smet I, Zhang H, Inze D, Beeckman T. (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* **11**: 434–439.

Dhindsa RS, Cleland RE (1975) Water stress and protein synthesis. *Plant Physiol.* **55**: 778–781.

Dickinson W (2000) Integrative plant anatomy. Ecological anatomy. p 295–337 Academic Press.

Dietrich RA, Radke SE, Harada JJ (1992) Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. *Plant Cell* **4**: 1371–1382.

Dinkova T, Keiper B, Korneeva N, Aamodt E, Rhoads RE (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol.* **25**: 100–113.

Dinkova TD, Zepeda H, Martínez-Salas E, Martínez LM, Nieto-Sotelo J, Sánchez de Jiménez E (2005) Cap-independent translation of maize Hsp101. *Plant J.* **41**: 722–731.

Dure L3rd, Greenway SC, Galau GA (1981) Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162–4168.

Dure L3rd, Crouch M, Harada JJ, Ho T, Mundy J, Quatrano RS, Thomas TL, Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol.Biol.* **12**: 475–486.

Dure L3rd. (1993) Structural motifs in LEA Proteins. En, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. p 91–103. Editado por

Close, T.J, Bray, E.A. The American Society of Plant Physiologists.

Dyson HJ, Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 197-208.

Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai K, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E. (2008) Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol.* **147**: 1984–1993.

EXPASY: (EXPASY, <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>)

FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>

Fedoroff NV (2002) Cross-talk in abscisic acid signalling. *Science STKE*. www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2002/140/re10

Fennoy SL, Bailey-Serres J. (1995) Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **7**: 287-295

Fennoy SL, Nong T, Bailey-Serres J (1998) Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **15**: 727-735.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Rev. Genetics* **9**: 102- 114.

Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.

Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **S15–S45**.

Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 387–415.

Fitter A, Hay R (2002) *En, Environmental physiology of plants*. Cap 4, p 131-190. 3rd edition. Academic Press

Flores-Fusaro A, Bocca SN, Braz Ramos RL, Barrôco RM, Magioli C, Cardeal V, Cardoso Coutinho T, Martins Rangel-Lima C, De Rycke R, Inzé D, Engler G, Sachetto-Martins G (2007) AtGRP2, a cold-induced núcleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta* **225**: 1339–1351.

Gallie DR (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development* **5**: 2108-2116.

Gallie DR, Young TE (1994) The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions on expression. *Plant Physiol.* **106**: 929-939.

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcíarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *JBC* **275**: 5668 –5674.

Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* **99**: 15898 –15903.

Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P. (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell* **7**: 373–385.

Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* **5**: 827-835.

George JM (2001) The synucleins. *Genome Biol.* **1**: 3002.1–3002.6.

Gil P, Green PJ (1996) Multiple regions of the *Arabidopsis SAUR-AC1* gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *EMBO J.* **15**: 1678-1686.

Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AR, Vartanian N, Giraudat J. (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Cell* **11**: 1897-1909.

Graham LE, Cook, ME Busse JE (2000) The origin of plants: Body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *PNAS* **97**: 4535– 4540.

Graber JH, Cantor CR, Mohr SC, Smith TF (1999) *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *PNAS* **96**: 14055–14060.

Groot S, Karssen CM (1992) Dormancy and Germination of Abscisic Acid-Deficient Tomato Seeds. Studies with the sitiens Mutant. *Plant Physiol.* **99**: 952-958.

Gutiérrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ (2002) Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *PNAS* **99**: 11513–11518.

Hahn M, Walbot V (1989) Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. *Plant Physiol.* **91**: 930-938.

- Hall A (1993) Is dehydration tolerance relevant to genotypic differences in leaf senescence and crop adaptation to dry environments? En, Plant responses to cellular dehydration during environmental stress, T. Close and E. Bray, eds. The American Society of Plant Physiologist. pp. 1-10.
- Hand SC, Jones D, Menze MA, Witt TL (2007) Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol. **307**: 62-66.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. Planta **217**: 290–298.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. J. Exp. Bot. **56**: 2695-2703.
- Hengherr S, Heyer AG, Köhler HR, Schill RO (2008) Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades—evidence for divergence in responses to dehydration. FEBS J. **275**: 281–288.
- Hinnebusch AG, Dever TE, Sonenberg N (2004) En, Protein synthesis and ribosome structure translating the genome. Editado por Nierhaus KH, Wilson DN. Cap. 7: p 241. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS (2000) Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. **122**: 1129–1136.
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. Trends in Plant Science **8**: 534-540.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J, Hanafey M, Tingey S, Chua N. (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. J. Cell Science **115**: 4891-4900.
- Hsiao TC (1970) Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. Plant Physiol. **46**: 281-285
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. Cell **106**: 477–487.
- Hulzink RJM, de Groot PF, Croes AF, Quaedvlieg W, Twell D, Wullems GJ, van Herpen MMA (2002) The 5-untranslated region of the *ntp303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. Plant Physiol. **129**: 342–353.
- Hunt AG (2008) Messenger RNA 3' end formation in plants. Curr Top in Microbiol. and Immunol. **326**: 151-177.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**: 377–403.
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. **6**: 3901-3907.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. **5**: 387-405.
- Joshi CP, Nguyen HT (1995) 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. Nucleic Acids Res. **23**: 541-549.
- Karim S, Aronsson H, Ericson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mäntylä E, Palva T, Van Dijk P, Holmström KO (2007) Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. Plant Mol. Biol. **64**: 371–386.
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J (2002) Regulation of translational initiation in plants. Curr. Op.Plant Biol. **5**: 460–465.
- Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. Plant, Cell and Environ. **26**: 221–229.
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA., Bailey-Serres J (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **38**: 823-839
- Kim JY, Park SJ, Jang B, Jung CH, Ahn SJ, Goh, C-H, Cho K, Han O, Kang H (2007) Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions, Plant J. **50**: 439-451.
- Kishor P, Hong Z, Miao GH, Hu C, Verma D (1995) Overexpression of $[\Delta]$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol. **108**: 1387-1394.
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) Characterization of two cDNAs (*ERD10* and *ERD14*) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **35**: 225-231
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. Plant Physiol. **131**: 309–316.
- Koornneef M, León-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevart JAD (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem. **36**: 83-89.
- Koumenis C, Wouters BG. (2006) “Translating” tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. Mol Cancer Res **4**:423-436.

- Kuersten S, Goodwin EB (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature Rev. Genetics* **4**: 626-637.
- Kwak KJ, Kim YO, Kang H (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *GR-RBP4* under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. Exp. Bot.* **56**: 3007–3016.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laroche A, Hopkins W (1987) Polysomes from winter rye seedlings grown at low temperature. *Plant Physiol.* **85**: 648-654
- Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Rättsch G, Weigel D (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **105**: 8795-8800.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* **126**: 1109-1120.
- Lewin B (2004) *En, Genes VIII*. Publicado por Pearson Prentice Hall Pearson Education, Inc.
- Li Q, Hunt A (1997) The polyadenylation in plants. *Plant Physiol.* **115**: 321-325.
- Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding XS, Kitagawa Y (2004) The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 481-489.
- Lidder P, Gutiérrez RA, Salomé PA, Robertson McClung C, Green PJ (2005) Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiol.* **138**: 2374-2385.
- Ling J, Wells DR, Tanguay RL, Dickey LF, Thompson WF, Gallie DR (2000) Heat shock protein HSP101 binds to the *Fed-1* internal light regulatory element and mediates its high translational activity. *Plant Cell* **12**: 1213–1227.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L (2007) A G protein–coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716.
- Loke JC, Stahlberg EA, Strenski DG, Haas BJ, Wood PC, Li QQ (2005) Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol.* **138**: 1457–1468.
- López-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua N-H (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* **32**: 317–328.
- Lorkovic Z, Barta A. (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **30**: 623-635.
- Lunde BM, Moore C, Varani G (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:479-490.
- Marcotte WR, Russell SH, Quatrano RS (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the em gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 969-976.
- Mardanov ES, Zamchuk LA, Ravin NV (2007) The 5'-untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene provides efficient translation of mRNA in plants under stress conditions. *Mol. Biol.* **41**: 914–919.
- Mason HS, Mullet JE, Boyer JS (1988) Polysomes, messenger RNA, and growth in soybean stems during development and water deficit. *Plant Physiol.* **86**: 725-733
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki T, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M. (2008) *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1135-1149.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 595–624.
- McCourt P, Creelman R (2008) The ABA receptors - we report you decide. *Curr. Op in Plant Biol.* **11**: 474-478.
- MEME <http://rocks50.sdsc.edu/meme/meme.html>
- Miller WA, Wang Z, Treder K (2007) The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochemical Society Transactions* **35**:1629-1633.
- Moreno-Fonseca LP, Covarrubias AA (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Mol.Biol.* **45**: 501-515.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* **41**: 697–709.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165–85

- Newman TC, Ohme-Takagi M, Taylor C, Green PJ (1993) DST sequences, highly conserved among plant *SAUR* genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell* **5**: 701-714.
- Nicolaï M, Roncato MA, Canoy AS, Rouquié D, Sarda X, Freyssinet G, Robaglia C (2006) Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in *Arabidopsis* cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol.* **141**: 663-673.
- Nierhaus KH (2004) En, Protein synthesis and ribosome structure translating the genome. Editado por Nierhaus, K.H, Wilson, D.N. Cap 2, pag 85. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Nobel PS (2005) Physicochemical and environmental plant physiology. Academic Press 3° edición.
- Nordin K, Vahala T, Palva E (1993) Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol.Biol.* **21**: 641-653.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **9**: 1298-1308.
- Oliver M, Tuba Z, Mishler BD (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* **151**: 85-100.
- Ooms JJJ, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. A comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants. *Plant Physiol.* **102**: 1185-1191.
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* **34**: 868-887.
- Oparka K (1994) Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytol.* **126**: 571-591.
- Ortega JL, Temple SJ, Sengupta-Gopalan C (2001) Constitutive over-expression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. *Plant Physiol.* **126**: 109-121.
- Ortega JL, Moguel-Esponda S, Potenza C, Conklin CF, Quintana A, Sengupta-Gopalan C (2006) The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *Plant J.* **45**: 832-846.
- Pandey S, Assmann SM (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein subunit GPA1 and regulates abscisic acid signalling. *Plant Cell* **16**: 1616-1632.
- Papp I, Mur LA, Dalmadi A, Dulai S, Koncz C (2004) A mutation in the cap binding protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* **55**: 679-686.
- Patel M, Corey AC, Yin LP, Ali S, Taylor WC, Berry JO (2004) Untranslated regions from C4 amaranth *AhRbcS1* mRNAs confer translational enhancement and preferential bundle sheath cell expression in transgenic C4 *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* **136**: 3550-3561.
- Patel M, Siegel AJ, Berry JO Untranslated regions of *FbRbcS1* mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a C4 plant. (2006). *JBC* **28**: 25485-25491.
- Penfield S, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA (2006) DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Curr. Biol.* **16**: 2366-2370.
- Pérez-Amador MA, Lidder P, Johnson MA, Landgraf J, Wisman E, Green PJ (2001) New molecular phenotypes in the *dst* mutants of *Arabidopsis* revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell* **13**: 2703-2717.
- Pesole G (1999) UTRdb: a specialized database of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **27**: 188-191.
- Petracek ME, Dickey LF, Huber SC, Thompson WF (1997) Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of *ferredoxin* mRNA are dependent on photosynthesis. *Plant Cell* **9**: 2291-2300.
- PLACE: (Plant cis-acting Regulatory DNA Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).
- Rascio N, La Rocca N (2005) Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. *Crit. Rev. in Plant Sci.* **24**: 209-225.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Heintzen C, Parthier B (1993) Methyl jasmonate represses translation initiation of a specific set of mRNAs in barley. *Plant J.* **4**: 459-467.
- Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant, Cell Environ.* **28**: 709-718.
- Rhodes P, Matsuda K (1976) Water stress, rapid polyribosome reductions and growth. *Plant Physiol.* **58**: 631-635.
- Richter JD (2007) CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 279-285.

- Rodriguez-Urbe L, O'Connell M (2006) A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). *J. Exp. Bot.* **57**: 1391-1398.
- Schroeder JI, Nambara E (2006) A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell* **126**: 1023-1025.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002 a) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**: 279-292
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. (2002 b) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* **2**: 282-291.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress response. *Curr. Op. Plant Biol.* **10**: 1-7.
- Shah CB, Loomis RS (1965) Ribonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. *Physiologia Plantarum* **18**: 240-254.
- Sharp, R.E, Poroyko, V, Hejlek, L.G, Spollen, W.G, Springer, G.K, Bohnert, H.J, Nguyen, H.T. (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* **55**: 2343-2351.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826.
- Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, Pavitt GD, Ashe MP, Grant, CM (2006) Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *JBC* **281**: 29011-29021.
- Sheu JJ, Yu TS, Tong WF, Yu SM (1996) Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *JBC* **271**: 26998-27004.
- Sheu JJ, Jan SP, Lee HT, Yu SM (1994) Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *Plant J.* **5**: 655-664.
- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC (2002) Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol.* **128**: 822-832.
- Stern, Jansky S, Bidlack J (2003) En, Introductory plant biology. Cap 20. p 382-395. 9th edition. McGraw-Hill, Companies.
- Taiz, Zeiger. (2003) Plant Physiology. Cap 25, Stress physiology. Sinauer Associates Publicaciones
- Tang L, Bhat S, Petracek ME (2003) Light control of nuclear gene mRNA abundance and translation in tobacco. *Plant Physiol.* **133**: 1979-1990.
- Trethowan RM, Reynolds M (2007) Drought resistance: genetic approaches for improving productivity under stress. Pág. 289-299. En, Wheat production in stressed environments. Editado por Buck, H.T, Nisi, J.E, Salomón, N. Publicado por Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
- Tunnacliffe A, Lapinski J, McGee B (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia.* **546**: 315-321.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Op. Biotechnology.* **17**:113-122.
- Velten J, Oliver MJ (2001) Tr288, a rehydrin with a dehydrin twist. *Plant Mol. Biol.* **45**: 713-722.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung, J. (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Molecular Plant* **1**: 198-217.
- Watson JC, Thompson WF (1986) Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Meth. Enzymology* **118**: 57-75.
- Weber C, Nover L, Fauth M (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03623.x. Publicado en linea el 9 julio 08
- Wells SE, Hillner P, Vale R, Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**: 135-140.
- Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussmand MR (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* **20**: 1101-1117.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu.Rev.Plant Biol.* **57**: 781-803.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in*

Plant Science **10**: 88-94.

Yamasaki S, Anderson P (2008) Reprogramming RNA translation during stress. *Curr.Op.Cell Biology* **20**: 222–226.

Yang SH, Zeevaart JAD (2006) Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *Plant J.* **47**: 675–686.

Zhang S, Sheng J, Liu Y, Mehdy MC (1993) Fungal elicitor-induced bean proline-rich protein mRNA down-regulation is due to destabilization that is transcription and translation dependent. *Plant Cell* **5**: 1089-1099.

Zhang S, Mehdy MC (1994) Binding of a 50-kD protein to a U-rich sequence in an mRNA encoding a proline-rich protein that is destabilized by fungal elicitor. *Plant Cell* **6**: 135-145.

Zhang H, Ohyama K, Boudet J, Chen Z, Yang J, Zhang M, Muranaka M, Maurel C, Zhu JK, Gong Z. (2008) Dolichol biosynthesis and its effects on the unfolded protein response and abiotic stress resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, en prensa /doi/10.1105/tpc.108.061150.

Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W (2005) Gene expression analysis and network discovery using Geneinvestigator. *Trends in Plant Science* **10**: 407-409.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox *Plant Physiology* **136**: 2621-2632.

Zinselmeier C, Jeong BR, Boyer JS (1999) Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol.* **121**: 25–35.

Zonia L, Munnik T (2007) Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends in Plant Science* **12**: 90-96.

Translational enhancement conferred by the 3' untranslated region of a transcript encoding a late embryogenesis abundant protein

Marina Battaglia and Alejandra A. Covarrubias*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México

Running title: Translational enhancement by a 3' UTR

*For correspondence: fax 52 777 3139988; e-mail crobles@ibt.unam.mx

Abstract

To assure an efficient protein production under stress conditions, some transcripts are modulated at the translational level. In this work we analyse the role of the 3' untranslated region (UTR) of the water deficit responsive gene *PvLEA18* from *Phaseolus vulgaris* on the regulation of its expression. Using constructs containing the *GUS* transcript with and without the *PvLEA18*-3'UTR, driven by the *PvLEA18* promoter, and introduced into *Arabidopsis* plants, we demonstrate that the *PvLEA18*-3'UTR allows a preferential polysome loading of the *GUS* reporter transcript under water deficit. We also show that protein(s) specifically interact with this 3'UTR, and we identify particular sequences that play an important role in this interaction. Our data support a major role of this 3'UTR in translation and suggest the participation of some mRNA binding proteins in translational enhancement of the *PvLEA18* mRNA, which lead to an efficient protein synthesis and hence a competent response to this stress condition.

Keywords: translational regulation, 3' untranslated region, water deficit, *LEA* genes, common bean, RNA-binding proteins.

Introduction

Water limitation is an environmental condition that adversely affects plant growth, development and productivity. Plants have developed several adaptation mechanisms to tolerate and survive these unfavourable conditions, as well as specific growth strategies that allow them to avoid stressful situations. Once plants perceive an adverse environment, they can elicit an appropriate response, which will depend on the species and genotype, the severity and duration of the water deficit, the age and developmental stage, the occurrence of a simultaneous stress condition, etc. The plant response to water limitation is a very complex process that involves multiple changes at different levels including metabolism, growth and development. Some of the adjustments consist of reduction in the growth rate, the activation and inactivation of proteins and enzymes, the induction and repression of gene expression, transient increases in ABA levels, accumulation of compatible osmolytes and protective proteins, increased levels of anti-oxidants, and suppression of energy-consuming pathways, among others (Zhu, 2002; Bartels and Sunkar, 2005). The ability of the plant to tolerate water limitation depends on whole-plant mechanisms, which are the consequence of a complex network of interactions that result in the integration of the different cellular responses.

Molecular and genomic analyses have shown that several different transcriptional regulatory systems are involved in the plant response to water deficit and have suggested that transcriptional regulation may be one of the important mechanisms implicated in stress tolerance (Seki *et al.*, 2002; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). However, several other factors contribute to the specific, temporal and spatial regulation of gene expression and the production of the corresponding functional proteins, such as post-transcriptional, translational and post-translational regulation (Fennoy *et al.*, 1998; Bailey-Serres, 1999; Gutierrez *et al.*, 1999). Among these different levels of control, mRNAs translation is an important mode of gene regulation in plants, in such a way that the levels of a particular protein is determined not only by the transcript abundance but also by its ability to be successfully translated. A process where this regulation is evident is the plant response to environmental stimuli, though also occurs during development and in response to growth regulators. Often this control is exerted at the initiation of translation, a rate-limiting step of protein synthesis, where the mRNA is recruited to the ribosome. This mode of regulation implies that in certain processes the cell mRNAs acquire hierarchies to be translated, which has as a consequence the transcript differential translation; those encoding fundamental proteins for survival will be preferentially translated. Consequently, selective mRNA translation is most obvious under stress conditions where the global protein synthesis is down-regulated and mRNA recruitment to ribosomes allows for rapid responses to transient changes in the environment (Hsiao, 1970; Rhodes and Matsuda, 1976; Mason *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1999; Kawaguchi *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2004). Examples of this have been observed in response to water deficit (Dhindsa and Cleland, 1975; Kawaguchi and Bailey Serres, 2002; Kawaguchi *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2004) to oxygen deprivation (Fennoy and Bailey Serres, 1995; Fennoy *et al.*, 1998; Branco-Price *et al.*, 2005), to oxidative stress caused by H₂O₂ (Shenton *et al.*, 2006), to heat shock treatment (Joshi and Nguyen, 1995; Dinkova *et al.*, 2005) and to light (Tang *et al.*, 2003), in response to pathogen infection (Zhang *et al.*, 1993), to jasmonate treatments (Reinbothe *et al.*, 1993), exogenous sucrose (Nicolaï *et al.*, 2006) and during pollen maturation (Bate *et al.*, 1996) and germination (Hulzink *et al.*, 2002).

Recent data suggest that selective translation is regulated by translational factors and *cis*-acting mRNA sequences. Some particular regions in transcripts can be sufficient to maintain translation or to enhance or inhibit translation initiation under certain conditions, in particular those in the 5' and 3' UTRs, together with the

selective phosphorylation of components of the translational machinery, including initiation factors, the mRNA 5'-cap-binding complex, ribosomes and mRNA binding proteins (Preiss and Hentze, 2003). Recently, DNA microarrays were used to evaluate the characteristics in polysomal mRNAs during mild dehydration stress in *Arabidopsis* leaves. This analysis confirmed that global translation in response to water limitation resulted in a significant reduction of the majority of mRNAs corresponding to housekeeping (normal expressed) genes in polyribosomal complexes; however, those corresponding to the stress-induced genes maintained their polysomal association (over 60%) (Kawaguchi *et al.*, 2004). According to this study, the initiation codon context, the length, the structure and the GU content in the 5'UTR, as well as, the length of the 3'UTR influence ribosome loading. However, little is known about the contribution of specific sequences in these regions to this translational regulation (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005).

Interested in the mechanisms of gene regulation in response to water deficit, we have studied the control of the expression of a gene encoding a late embryogenesis abundant protein (LEA) from *Phaseolus vulgaris* called PvLEA18, a representative of group 6 of the plant LEA proteins (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Colmenero-Flores *et al.*, 1999; Battaglia *et al.*, 2008). Both, transcript and protein accumulate in dry seeds as well as in response to water deficit treatments in different tissues of bean plants. Also, they accumulate in the growing regions of bean seedlings grown under optimal conditions (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). The analysis of the *PvLEA18* gene regulation was carried out in *Arabidopsis* transgenic lines with constructs containing the *PvLEA18* promoter fused to the *GUS* reporter gene, with the *PvLEA18*-3'UTR or *NOS*-3'UTR. The activity of the reporter gene showed that this chimeric gene in *Arabidopsis* responds similarly to the native gene in *P. vulgaris* upon water deficit and ABA treatments, and during development. In addition, the comparative analysis of different transgenic lines containing the chimeric constructs with either the *PvLEA18*-3'UTR or *NOS*-3'UTR showed that downstream DNA sequences in the *PvLEA18* gene are required to enhance its expression, particularly, in its ABA-independent dehydration response (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001).

To gain further knowledge on the role of *PvLEA18*-3'UTR in the regulation of gene expression, in this work we analyze the effect of *PvLEA18*-3'UTR at different control levels of gene expression using the transgenic *Arabidopsis* lines described above grown under optimal irrigation or under water deficit. Our data indicate that the *PvLEA18*-3'UTR allows a preferential polysome loading of the *GUS* reporter transcript under water deficit, suggesting that this region and some mRNA binding proteins are important for a translational enhancement of the *PvLEA18* mRNA for an efficient response to this stress condition.

Materials and Methods

Gene constructs

The transcriptional fusion constructs *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR* (Figure 1a) were those described by Moreno-Fonseca and Covarrubias (2001). In the *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* construct, a 607 bp fragment (containing transcribed and untranscribed sequences) represented the 3'UTR containing the transcriptional terminator. To define more precisely the terminal end of the *PvLEA-18* transcript, a 3'RACE was performed starting from total RNA obtained from stressed bean seedlings as previously described (Covarrubias *et al.*, 1995). Reverse transcription reactions (RT) were performed using oligo(dT) 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN 3'. After synthesis of the first strand of cDNA, two nested PCRs were done using an oligo(dT) and *PvLEA-18* specific oligonucleotides. The specific oligonucleotides used in the first and second PCR rounds corresponded to the *PvLEA-18*-ORF (5'-TACAAGGATTTGGAGG-3') and to the 3'-end of the gene (5' CAAGGAGCTCCCTGAATTTACACCACCTCC 3'). After the second PCR reaction, the specific product was detected by hybridization using the *PvLEA18-3'UTR* as probe. The results from this experiment defined the *PvLEA18-3'UTR* as a ~300 b fragment downstream the *PvLEA-18* stop-codon.

To obtain *Pro_{PvLEA-18}:GUS:300_{PvLEA-18}NOS-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:170_{PvLEA-18}NOS-3'UTR* constructs (Figure 5a), DNA fragments of the *PvLEA18-3'UTR* of 300 bp and 170 bp, starting from *PvLEA-18* stop-codon, were obtained by PCR and fused upstream of a *NOS-3'UTR* region previously inserted into pKS⁺ vector.

Subsequently, the fused regions, *300_{PvLEA-18}NOS-3'UTR* and *170_{PvLEA-18}NOS-3'UTR*, were introduced into pBin containing *Pro_{PvLEA-18}:GUS* to obtain *Pro_{PvLEA-18}:GUS:300_{PvLEA-18}NOS-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:170_{PvLEA-18}NOS-3'UTR*. The resultant plasmids were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101), selecting for kanamycin resistance (25 µg ml⁻¹).

Mutations in Box1 or Box2 in the *PvLEA18-3'UTR* were introduced by PCR (Shen, 2002). Wild type Box1 5'-TTTTCGATCATGACATGTT-3' was randomly changed to 5'-TTAGTTCAGTGTCTTCATA-3' (B1m); whereas, wild type Box2 5'-TTTTTGTTGTTGCCAAATTT-3' was also randomly modified to 5'-TGCATTGATATTATTCGCT.-3' (B2m). After PCR, the fragments were cloned in pBluescript KS⁺ and their nucleotide sequence was verified before *in vitro* transcription reactions.

Plant transformation

Arabidopsis thaliana plants (Columbia ecotype) were transformed by vacuum infiltration (Clough and Bent, 1998). To obtain the transgenic lines, T₀ seeds were grown in MS selection medium [50 µg ml⁻¹ kanamycin; 400 µg ml⁻¹ claforan; 1X Murashige & Skoog (Caisson Laboratories, Inc), 1% sucrose and 0.65% agar (Research Organics, Inc)]. The number of insertions of the transgene was deduced from genetic segregation data of the kanamycin resistance marker. All the experiments were done using homozygous lines, obtained from plants in which the kanamycin resistance phenotype segregated as a monogenic characteristic.

Growth conditions and water deficit treatments

A. thaliana seeds were germinated in sterile Turface (Hummert Seed, St. Louis, MO) after stratification at 4°C during 4 days. Subsequently, plants were grown under controlled conditions (16h/ 8h photoperiod at 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 22°C). After 15 days under optimal irrigation, plants were transferred to a humid chamber and maintained under controlled conditions of light and temperature until they loss 30% of their fresh weight. Control plants were maintained under optimal irrigation conditions. After treatment, plants were harvested, frozen in liquid N₂ and maintained at -80°C until use. In all experiments we used those homozygous lines that showed the highest GUS specific activity upon water deficit treatments.

For nuclei extraction, plants were stratified, germinated and grown in sterile soil (Metro-Mix-250, Scotts-Sierra, Marysville, OH). After 15 days, rosettes were removed and transferred to a humid chamber, where they were maintained under controlled conditions of light and temperature until they loss 30% of fresh weight. Control plants were kept in soil under optimal irrigation. After treatment, plants were harvested and used for nuclei extraction, as described below.

Common bean, *Phaseolus vulgaris* (cv Negro Jamapa), seeds were surface-sterilized with 50% sodium-hypochloride, 0.1% Tween-20 for 2min and immediately rinsed with sterile water. Then, seeds were germinated on water saturated paper towels, at 28°C under dark. After 4 days, seedlings were transplanted to vermiculite containing different amounts of water depending on the growth conditions to be used. For well-irrigated conditions, vermiculite was saturated to field capacity, 5 ml of water/gram of vermiculite, whereas for water deficit conditions, 0.42 ml of water were added per gram of vermiculite to obtain 1/12 of the water used in well irrigated conditions. Water deficit treatments were imposed during 24h.

Common bean embryos were excised from surface-sterilized seeds (100% ethanol during 2min). Embryos were harvested, frozen in liquid N₂ and maintained at -80°C until use.

Osmotic treatment

Hyperosmotic treatments were imposed using 25% (w/v) PEG-8000 (Carbowax Brand Polyethylene MW 7000-9000, Research Organics, Inc.) prepared in 0.5X Murashige & Skoog liquid medium. This solution was 1.14 Osmol/kg equivalent to 0.57 M NaCl. The PEG-8000 concentration used in these treatments was selected after carrying out a concentration-response curve traced by the expression levels of *Pro^{PvLEA-18}:GUS* fusion, being 25% PEG-8000 the concentration that led to the highest *GUS* expression levels. Two week-old *Arabidopsis* plants were transferred onto a plastic mesh, floated on 5 ml of the PEG solution in a glass Petri dish, with gently shaking, to favour the root contact with the PEG solution. After the treatment, plants viability was monitored following their growth recovery under optimal growth conditions.

Nuclear run-on transcription assays

Nuclei were isolated as previously described (Watson and Thompson, 1986). Because after the Percoll gradient nuclei recovery from dehydrated tissue was very poor, we preferred to work with a filtered lysate. The lysate were stored in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol and 20% glycerol (v/v). Run-on transcription reactions were carried out using 3×10^7 nuclei and transcription reactions were initiated by the addition of 200 U RNaseOUT™ (Invitrogen), 50 μg yeast tRNA, and 250 μCi [α -

^{32}P] UTP (3000 Ci mmol⁻¹, Amersham). This mixture was incubated at 25 °C for 30 min, then 10 µl UTP 1mM were added and incubation proceed 30 min further. After transcription, nuclei were treated with 5U RNase-free DNase I (Invitrogen) at 25°C for 30 min. Then 20 µg proteinase K (Sigma-Aldrich) was added and the reaction was incubated at 25°C for 30min, after which this was extracted twice with phenol:chloroform (1:1, v/v) and precipitated with ammonium acetate:ethanol (1:6, v/v). The pellet was dissolved in water and maintained at -20°C until used (Sheu et al., 1994).

To determine the transcriptional rate from *PvLEA-18* promoter in the presence or absence of the *PvLEA18*-3'UTR, upon water limitation or well-irrigated conditions, transcription reactions were carried out from nuclei of plants containing *ProPvLEA-18::GUS::PvLEA18*-3'UTR or *ProPvLEA-18::GUS::NOS*-3'UTR constructs. The *in vitro* transcribed RNAs were used as probes in a DNA slot-blot experiment, using the same amount of radioactivity for each sample. Newly transcribed [^{32}P]-labelled RNA was hybridized to three different amounts (2.5, 5 and 7.5 µg) of linearized plasmid DNA containing the coding regions of *LTI78* (At5g52310), *D113* (At5g06760), *ERD10* (At1g20450), *RCE1* (RUB1 ubiquitin-like conjugating-enzyme) (At4g36800), *EIF4A1* (At3g13920) and *28S* genes. pKS⁺ plasmid DNA was used as internal control.

LTI78 (Nordin et al., 1993), *D113* (Hoth et al., 2002), *ERD10* (Kiyosue et al., 1994) genes were used as reference of dehydration inducible genes, whereas *RCE1*, *EIF4A1* and *28S* were considered as reference of genes, whose expression is not affected by dehydration (Seki et al., 2002; Oono et al., 2003). Pre-hybridizations and hybridizations were performed under high-stringency conditions, followed by washing at 42°C with 0.2% SSC, 0.1% SDS. Radioactive signals were quantified by densitometry, using ImageJ-1.34s software (NIH, USA). Transcriptional rate was expressed as the value obtained for each gene relative to ribosomal values.

mRNA half-life determination

Arabidopsis transgenic lines carrying *ProPvLEA-18::GUS::PvLEA18*-3'UTR and *ProPvLEA-18::GUS::NOS*-3'UTR were used in these experiments. Half-lives were determined as described previously (Newman and Green, 1993) with the following modifications. Two-week-old *Arabidopsis* plants were transferred to 25% PEG-8000 containing medium. After 16h of osmotic treatment, Actinomycin D (Alexis Biochemicals, Qbiogene, Inc., USA) was added to a final concentration of 200 µg ml⁻¹ (t=0). Parallel experiments were carried out, in which *Arabidopsis* plants were maintained in PEG medium without Actinomycin D or in MS medium. Tissue samples were harvested at regular intervals and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was purified using Trizol reagent (Invitrogen). RNA was analyzed by electrophoresis on 2.2% formaldehyde/1.2% agarose gels, blotted onto nylon membrane Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences) and immobilized by UV-crosslinking (Stratalinker®). DNA probes were labelled with [α - ^{32}P] dCTP by random-primer (Feinberg and Vogelstein, 1983). The RNA blots were hybridized at high stringency. Filters were washed twice for 15min at 65°C in 0.1% SDS (w/v) 0.1 x SSC. A *GUS* coding region DNA fragment was used as the [^{32}P]-labelled probe. As loading control, RNA blots were hybridized against [^{32}P]-labelled DNA probe for the *28S* ribosomal gene. Radioactive signals were quantified by densitometry using the NIH Image 1,63 software (NIH, USA). The obtained values were normalized with those obtained from the hybridization against the *28S* ribosomal RNA probe. The mRNA half-life was determined by plotting the log₁₀ RNA remaining versus time (h), and the values were subjected to linear

regression analysis (Newman and Green, 1993). Control treatment (without Actinomycin D) was used to standardize the effect of the osmotic treatment on transcription.

Analysis of polysomes and polysomal RNA

Transgenic *Arabidopsis* lines, carrying *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* or *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR*, were germinated in sterile Turface, after 4 days of stratification at 4°C and grown during 15 days under controlled conditions. Then, plants were subjected to water deficit treatment as described above. Following the treatment, the complete plants were frozen, pulverized in liquid N₂ and stored at -80°C until use. Polysomes were isolated from extracts of complete plant tissues by resuspending the pulverized tissues in extraction buffer (Kawaguchi et al., 2003). Extracts were fractionated in a 20-60% (v/v) exponential sucrose density gradient (15ml) by ultracentrifugation (275,000 x g, 4°C 90min). Thirty-two fractions were obtained using an Auto Density Flow (Labconco Corporation, USA). An aliquot of each fraction was measured at A₂₅₄, A₂₆₀ and A₂₈₀. RNA was isolated from gradient fractions (Dinkova et al., 2005) and analyzed by Northern blot. Radioactive signals were quantified as described above.

Fluorometric analysis of GUS activity

GUS activity was determined as described previously (Jefferson *et al.*, 1987). Specific activity was expressed as pmol of MU mg⁻¹protein min⁻¹. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

Identification of RNA-binding proteins

To obtain the protein extracts used to identify specific *PvLEA18-3'UTR* RNA-binding proteins, plant tissues from stressed bean seedling were pulverized with liquid N₂ and resuspended in extraction buffer (200 mM HEPES-KOH, pH 7.50, 15% glycerol, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton, 1mM PMSF, 5 mM EDTA). Afterwards, the protein extract was filtered through gauze and clarified by centrifugation (30 min 27,000 g, 4°C). Fractionation of the total protein extract was carried out using ammonium sulfate (AS). The fractions were exhaustively dialyzed against several changes of 20 mM HEPES-KOH, pH 7.50, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2% (v/v) glycerol. The resultant fractions were used for UV-RNA crosslinking assays or for REMSA experiments to identify RNA-binding proteins. The specific RNA-binding proteins were detected only in the 80% AS soluble fraction (80-ASF), which represents 4.5% of the initial total protein extract. After dialysis, the 80-ASF was concentrated using centrifugal filters (Amicon® Ultra, 5K) or by cold acetone precipitation (5:1). The protein pellet obtained was dissolved in dialysis buffer before determination of the RNA-binding activity, or in Piperidine buffer (20 mM Piperidine pH 10.6) when this fraction was further purified. In both cases, the extracts were applied to a equilibrated Sephadex G25 (5ml syringe), and centrifuged 5 min at 1500 x g. The 80% ASF soluble proteins were further fractionated by ion exchange chromatography (IEC). G25 desalted proteins (3 mg) were applied to a HiTrap Q HP column (Pharmacia, 5ml, equilibrated with 20 mM Piperidine pH 10.6), and eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl at 2.5 ml/min. Fractions (2ml) were collected and concentrated using centrifugal filters (Amicon® Ultra, 5K). After dialysis, the fractions were assayed for RNA-binding activity.

In vitro transcription

RNAs used as substrate in UV-RNA crosslinking assays were produced by *in vitro* transcription using plasmids containing the complete (pKS⁺300_{PvLEA-18}), a fragment (pKS⁺170_{PvLEA-18}) of the *PvLEA18*-3'UTR or the *NOS*-3'UTR (pKS⁺3'UTR_{NOS}). *In vitro* transcription reactions were carried out in 50 µl using T7 RiboMAX™ Large scale RNA production systems kit (Promega) with 40 µCi [α ³²P] UTP (20 mCi/ml 800 Ci/mmol; Amersham Bioscience) following the manufacturer's instructions. RNA products were separated in 5% polyacrylamide denaturing gels to elute a single RNA band of the expected size. The yield of the reaction was calculated from the RNA specific activity. None of the 3'UTRs fragments produced by *in vitro* transcription contained the poly-A region.

RNA-protein UV-crosslinking assays

For RNA-protein UV-crosslinking assays, the reactions were performed in 20 µl: 10 µg of protein extracts were pre-incubated with 1X salt solution (10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 50 µM EDTA), 40 U RNaseOut™ (Invitrogen), 1X buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5% glycerol (v/v)), 10 µg yeast tRNA, 10 min on ice. RNA of 300_{PvLEA18}-3'UTR (1x10⁵ cpm, 0.25 pmol), 170_{PvLEA18}-3'UTR (1x10⁵ cpm, 0.25 pmol), or *NOS*-3'UTR (control; 1x10⁵ cpm, 0.25 pmol) was added and incubated at 30 °C 10 min. After incubation, the mixtures were irradiated twice during 10 min (100 µJ x 100), maintaining tubes on ice, 5 cm from the UV-light source (Stratalinker®). Then, 20 µg RNase A (Fermentas) was added and incubated 30 min at 37°C. Reactions were stopped by boiling for 2 min in 1X Laemmli buffer. Samples were analyzed in a 15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Gels were dried and exposed to X-ray films.

RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA).

REMSAs were carried out as previously described (Del Angel et al., 1989). Labelled RNA (40 femtomoles, corresponding to 170b-*PvLEA18*-3'UTR or *NOS*-3'UTR or 170b-*PvLEA18*-3'UTR with B1m or B2m) was incubated 5 minutes on ice with 80% AS soluble protein fraction or with IEC partially purified protein extracts (10, 20 or 40 µg) in 50 µL, containing: 5 mM HEPES- KOH pH 7.5, 4 mM MgCl₂, 10 µM DTT, 50 µM EDTA, 5% glycerol, 8 units of Ribolock (Fermentas). Protein-RNA complexes were resolved in a pre-run 6% native polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide 16:0.2) in a cold-room and electrophoresed at constant current (25 mAmp) for 3.3 h. Gels were dried and exposed to X-ray films.

Results

The PvLEA18-3'UTR did not affect the transcriptional rate of the reporter gene

To evaluate whether *PvLEA18-3'UTR* was participating in the regulation of the *PvLEA18* gene expression at the level of transcription, the transcriptional rate of the *GUS* reporter gene was determined from *Arabidopsis* transgenic plants, containing the constructions described above (*Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR*, Figure 1a), grown under optimal irrigation or under water deficit. For this, *in vitro* transcription reactions, in the presence of [α^{32} P] UTP, were carried out using nuclei purified from the plants and conditions described above. Equal amounts of the synthesized labelled RNA was used as probe to hybridize against the *GUS* reporter gene, a set of genes known to be induced by dehydration [*LTI78* (Nordin *et al.*, 1993), *D113 (LEA4)* (Hoth *et al.*, 2002), *ERD10 (LEA2)* (Kiyosue *et al.*, 1994)], and genes whose expression does not change upon dehydration treatments such as *EIF4A1* and *RCE1* (Seki *et al.*, 2002) (Figure 1b). As shown in Figure 1b, the transcriptional rate of the *EIF4A1* and *RCE1* genes did not change in response to dehydration; in contrast, the transcriptional rate of the dehydration responsive genes, used as reference, was higher in those plants subjected to water limitation. Likewise, the transcriptional rate corresponding to the *GUS* reporter gene increased (4-fold) in response to water deficit. However, when the transcriptional rates of the *GUS* gene from the transgenic lines containing the *NOS-3'UTR* or the *PvLEA18-3'UTR* were compared, both showed to be similar (Figure 1b), indicating that the regulation exerted by its 3'UTR does not take place at the transcriptional level, being the *PvLEA18* promoter region sufficient for the *PvLEA18* gene transcriptional regulation.

The PvLEA18-3'UTR did not modify the mRNA stability of the reporter gene

The results described above indicated that *PvLEA18-3'UTR* participates in the regulation of the *PvLEA18* gene expression at post-transcriptional level. The maintenance of appropriate transcript levels of particular genes upon specific stimuli, by promoting or circumventing the degradation of the transcript, is one of the mechanisms beyond transcription that modulates gene expression. To explore whether the *PvLEA18-3'UTR* was implicated in the regulation of the *PvLEA18* transcript stability in response to water deficit, the decay rates of the *GUS* transcript, with (*Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR*) or without (*Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR*) the *PvLEA18-3'UTR*, were determined from plants grown under stress or under optimal growth conditions. For these experiments, we established a system, in which it was possible to impose the treatment to attain transcription inhibition while plants were subjected to water deficit (see Experimental procedures). Hence, two-week-old transgenic *Arabidopsis* lines containing *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* or *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR* constructs were transferred to liquid medium containing 25% PEG-8000 and, after 16 h of osmotic treatment, Actinomycin D (200 μ g ml⁻¹) was added. Parallel experiments were carried out, in which *Arabidopsis* plants were maintained in PEG medium without Actinomycin D or in MS medium. Northern blot analyses of the different samples taken along the experiment allowed us to monitor the mRNA decay levels in the transgenic lines to be compared. The results in Figure 2b showed that the half-life of the *GUS* reporter transcript was similar for both hybrid transcripts, 2.6 h \pm 0.21 for the *GUS: PvLEA18-3'UTR* transcript and 2.6 h \pm 0.42 for the *GUS:NOS-3'UTR*, indicating that the presence of the *PvLEA18-3'UTR* is not involved in the control of the stability of the *PvLEA18* transcript under water deficit.

The PvLEA18-3'UTR affects the transcript loading into polysomes

Another factor that may affect the final levels of a gene product is the efficiency to which a particular transcript is translated, therefore the possibility that the *PvLEA18-3'UTR* was involved in *PvLEA18* mRNA translational enhancement under water limitation was also investigated. To this end, we analysed the distribution of the *GUS* transcripts in polysomes from *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR* transgenic lines grown under optimal irrigation or under water deficit (Materials and methods). In agreement with previous reports, water deficit treatments induced a decrease in the polyribosomes level (Dhindsa and Cleland, 1975), which in the conditions imposed in these experiments led to a reduction from 26% to 8% in polysomes and an increase in monosomes from 64% to 78%. As expected, a high percentage (64%) of a water limitation responsive endogenous transcript, *ERD 10*, was found to be loaded into polysomes (Figure 3b), whereas in the case of a gene non-responsive to water stress, *EIF4A1*, its transcripts were mostly associated to monosomes (48%) and a smaller fraction was loaded into large polysomes (23%) (Figure 3c). When the distribution in polysomes of *GUS* mRNAs was examined, we found that its association to polysomes relied on the presence of the *PvLEA18-3'UTR* (Figure 3a). In the case of the *Pro_{PvLEA-18}:GUS:PvLEA18-3'UTR* transgenic line, 52.8% (± 12.1) of the *GUS* transcript was loaded into polysomes and 35.9% (± 13.0) on monosomes. In contrast, the *GUS* transcript containing the *NOS-3'UTR* produced in the *Pro_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR* transgenic line, was mostly associated to monosomes (57.4% ± 5.7) and polysomes (34.4% ± 7.0) (Figure 3a y 3d). A comparison with the ribosome-loading pattern of the transcripts obtained from non-stressed plants is not included because the *GUS* transcript produced from the *PvLEA18* promoter did not show a detectable accumulation under optimal conditions.

The information necessary to enhance the expression of the GUS reporter gene in response to water deficit is contained in the most upstream 170 b of the 3'UTR

To evaluate the presence of putative *cis* acting sequences in the *PvLEA18-3'UTR*, a BLAST analysis was made using the UTRsite database (<http://www2.ba.itb.cnr.it/UTRSite/>) (Pesole, 1999). This study uncovered two sequences (Box 1 and Box 2), which are also present in the 3'UTR of the soybean (*PM35/PM21*) and *Medicago truncatula* orthologous genes (Figure 4). Both conserved sequences were localized 89/107 b (Box 1) and 120/138 b (Box 2) downstream the stop-codon of the *PvLEA18* ORF (Figure 4). Similar sequences were also found in the 3'UTRs of several plant transcripts, many of them known to be responsive to water deficit (Supplemental data, S1 – S3). In order to support the idea that these sequences in the *PvLEA18-3'UTR* contained the information sufficient to modulate the *PvLEA18* expression in response to water limitation, we first delimited the 3'UTR in the *PvLEA18* transcript. Since after many attempts we were unable to obtain cDNA clones containing a poly(A) tail, the 3'UTR of the *PvLEA18* transcript was delimited by determination of the transcript size through a high resolution RNA electrophoresis, which after a hybridization against a *PvLEA18* allowed to define an approximately 300 b 3'UTR. A 3' RACE experiment confirmed this length. Additionally, two more constructs were obtained, in which the complete *PvLEA18-3'UTR* (300 bp) or the 170 bp fragment, immediately downstream the *PvLEA18* stop-codon, were fused to the promoter region of *PvLEA18* and *GUS* reporter gene (*Pro_{PvLEA-18}:GUS:300_{PvLEA-18}NOS-3'UTR* and *Pro_{PvLEA-18}:GUS:170_{PvLEA-18}NOS-3'UTR*, see Figure 5a). In both cases, the *NOS-3'UTR* was maintained at the end of the transcripts to guarantee a suitable processing.

The GUS activity determined from homozygous *Arabidopsis* transgenic lines containing *PvLEA18*-3'UTR (300 b) or *PvLEA18*-3'UTR (170 b) showed that all three different 3'UTR segments (607, 300 and 170 b) contained the essential information to enhance the translation of the *PvLEA18* transcript in response to water deficit; therefore, providing evidence to affirm that this translational enhancer effect requires only the 170 b 3'UTR fragment, which includes Box 1 and Box 2 (Figure 4). Again, this effect was not detected in those transgenic lines containing the *PRO_{PvLEA-18}:GUS:NOS-3'UTR*' construct (Figure 5b). Notice that only a small difference was detected in the GUS activities between the different lines containing the *PvLEA18*-3'UTR (300 b) or *PvLEA18* (170 b) and those with the *NOS*-3'UTR under optimal irrigation consistent with the previous results obtained by Moreno-Fonseca and Covarrubias (2001), and supporting the idea the *PvLEA18*-3'UTR enhancing effect on *GUS* expression preferentially occurs under low water availability.

A RNA-binding protein(s) from common bean specifically interacts with the PvLEA18-3'UTR.

The possibility that the role of the 3'UTR on *PvLEA18* protein expression was achieved in association with a protein(s) bound to a particular RNA sequence in this region was investigated. For this, UV-crosslinking experiments were performed using as substrates *in vitro* synthesized labelled 300*PvLEA18*-3'UTR, 170*PvLEA18*-3'UTR and *NOS*-3'UTR transcripts, which were incubated with different ammonium sulfate (AS) fractions (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80% soluble fraction) obtained from total protein extracts prepared from bean seedlings subjected to water deficit (Materials and Methods). The autoradiograph of the SDS-PAGE analysis of the UV-crosslinking products showed several common RNA binding proteins able to interact with the different 3'UTRs used, which probably correspond to those proteins involved in the general 3'-end processing (data not shown). However, the presence of a protein with an apparent molecular mass of approximately 20 kDa was reproducibly and specifically detected only in those experiments in which the 80% AS soluble fraction and the 170 b and 300 b RNAs of the *PvLEA18*-3'UTR were used and not in those, where the *NOS*-3'UTR RNA was the substrate in the binding assays (Figure 6a), indicating that this protein is able to distinctively recognize a sequence and/or a structure in the *PvLEA18*-3'UTR.

To verify these results, REMSA experiments were carried out. As shown in Figure 6b (lane 2), this allowed us to detect RNA-protein complexes when 80% AS soluble protein fraction, obtained from plants subjected to water deficit, was incubated with the *in vitro* transcribed 170 b fragment of the *PvLEA18*-3'UTR. A further fractionation of the 80% AS soluble proteins by IEC showed an enrichment of some of the RNA-protein complexes (Figure 6b, lanes 3 and 4). To investigate whether water availability has an effect on the formation of the RNA-protein complexes, REMSA experiments were performed using the 80% AS soluble fraction obtained from well-irrigated or from stressed plants. The results showed that the mobility of the complex from plants grown under optimal irrigation was slower than of the complex obtained with protein extracts from stressed plants (Figure 6c).

To investigate whether Box1 and/or Box 2, contained in the 170 b segment of the *PvLEA18*-3'UTR, were important for the protein-RNA interactions, we carried out REMSA experiments using different versions of the 170 b RNA region that contained *in vitro* modified Box 1 or Box 2 (Materials and Methods). When the 170b *PvLEA18*-3'UTR RNA containing the Box 1 mutated version was used, the signal corresponding to the RNA-protein complex decreased when compared to that obtained with the 170b *PvLEA18*-3'UTR RNA containing the wild type Box 1 (Figure 7). The effect was even more severe using the 170b *PvLEA18*-3'UTR RNA containing the Box 2 mutated version, indicating that the sequences in Box 1 and 2 play an important role in

the binding of the protein(s) interacting with the *PvLEA18*-3'UTR (Figure 7). This hypothesis is supported by data obtained from *in vitro* coupled transcription/translation experiments, which showed that mutated Box1 and Box2 led to a decrease in the produced protein (17.5% and 50.3%, respectively) when compared to wild type (Figure S5).

Discussion

A wealth of information exists regarding mRNAs accumulation patterns in response to water deficit; however, little is known about the effects of this adverse condition on changes in gene expression at the post-transcriptional and translational levels. Previous studies have demonstrated that several abiotic stresses, including water deficit, cause a significant reduction in the levels of protein synthesis in different plant species. Despite the decrease in protein synthesis, several stress-induced proteins are produced under these adverse conditions, as a result of a selective translation process. Although there are some examples in the literature indicating that RNA-binding proteins and *cis*-acting elements determine the preferential translation of a gene transcript, little is known about the particular characteristics that could help us to better understand this process (Zhang and Mehdy, 1994; Hugouvieux et al., 2001; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). In this work, we show that the enhanced expression of a gene encoding a LEA protein is partially regulated at the translational level in response to water limitation and that this regulation is mediated by the 3'UTR of its transcript. Our results from the gene expression analysis using chimeric *GUS* genes fused to the *PvLEA18* promoter and to the *PvLEA18*-3'UTR or alternatively to the *NOS*-3'UTR demonstrate that the accumulation of the PvLEA18 protein in response to stress conditions is the result of a transcriptional activation and translational enhancement of its transcript. The fact that only the transcripts containing the *PvLEA18*-3'UTR, but not those carrying the *NOS*-3'UTR, were localized in polysomes upon water deficit was indicative of the presence of *cis*-acting elements in the *PvLEA18*-3'UTR that favour the recruitment to polysomes of the transcripts that contain it. The influence of this region on the transcription efficiency of the gene and on the stability of the transcript was discarded. These observations are in agreement with the report by Kawaguchi *et al.* (2004), where it was evident that *Arabidopsis* mRNAs encoding water deficit responsive proteins, including those classified as LEA proteins, are efficiently loaded in ribosomes upon dehydration.

Regulation of translation involving a 5' cap and/or 3' poly(A) tail, most likely via protein-mRNA interactions, appears to be essential for efficient translation of plant mRNAs. In some cases, these interactions might be promoted by *cis*-acting elements in the 5'- and/or 3'UTRs improving the effective use of limiting translational components. Even though, there are many examples where the participation of the 5'UTRs in translational regulation of transcripts from plant genes has been demonstrated (Joshi and Nguyen, 1995; Bailey-Serres and Dawe, 1996; Bate et al., 1996), the knowledge on the role of the 3'UTRs as translational regulators is scarce. The requirement of 3'UTRs for an efficient translation has been suggested for the maize *ADH1* mRNA in hypoxic protoplasts and for the barley α -amylase gene in protoplasts from the aleurone layer of maize kernels (Gallie and Young, 1994; Bailey-Serres and Dawe, 1996); while a detailed analysis of the soybean glutamine synthetase gene regulation showed that its 3'UTR plays a role not only in modulating transcript turnover but also as a translational repressor (Ortega *et al.*, 2006). In this work, we demonstrate that the *PvLEA18*-3'UTR is required for an efficient mRNA translation and consequently for an optimal expression of the PvLEA18 protein under water limitation. The identification of sequences localized in the *PvLEA18*-3'UTR segment that are conserved not only in the 3'UTR of the soybean orthologous gene but also in the 3'UTRs of different transcripts (many of them known to be induced by dehydration during development or by environmental conditions) in various plant species, suggest that they may be involved in the recognition of a common factor implicated in translational enhancement upon a decrease in water availability.

Although the participation of the *PvLEA18*-5'UTR in the regulation of the *PvLEA18* gene expression has not been evaluated, the analysis of its nucleotide sequence shows features that could facilitate the translational initiation of the corresponding transcript. Some of these distinctive characteristics are the small size of this region (22 nt), a high A content and the absence of thermodynamically stable structures, which have been associated with high ribosome loading (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). In addition, the nucleotide sequence context of the AUG codon seems to have favourable features for an efficient translation such as an A-rich context, in particular, the presence of A at positions -1, -3, -7, -9 and -10 and G at position +4 (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005). All these characteristics have been found to be common in the 5'UTRs of highly translated mRNAs from *Arabidopsis* plants grown under water limitation (Kawaguchi *et al.*, 2004), which is consistent with the idea that *PvLEA18* mRNA corresponds to this kind of transcripts in *P. vulgaris*. Moreover, our data indicate that a protein of, approximately, 20 kDa in common bean is able to specifically bind to RNA sequences contained into the most upstream 170 b segment of the *PvLEA18*-3'UTR. The formation of a protein-RNA complex involving this region was confirmed by REMSA experiments, which also allowed us to detect the formation of different protein-RNA complexes between well-irrigated and stressed plants. The results in this work show that even though both Box 1 and Box 2 are required for an optimal protein-RNA interaction, Box 2 seems to play an essential role in this process since the presence of the mutated Box 2 version completely avoids the formation of the protein-RNA complex. This suggestion is supported by the finding that Box 2 is present in the 3'UTR of a larger number of transcripts than Box 1 (Supplemental data, S1 – S3) and by the results from *in vitro* translation experiments, where the absence of a wild type Box 2 led to a 50.3% reduction in protein synthesis. The fact that the sequences identified as Box 1 and Box 2 are conserved in the 3'UTR of various transcripts from different plant species implies that the protein(s) recognizing these *cis*-acting elements may be a conserved protein(s). Interestingly, a protein with a similar molecular mass was detected in the UV-crosslinking protein-RNA-binding assays when protein extracts from *Arabidopsis* plants subjected to water deficit were used. Moreover, this protein was also enriched in the 80% AS soluble fraction suggesting similar physicochemical properties (see Supplemental data, S4). Because, at this point, we have not been able to identify the protein(s) interacting with this RNA region, it is difficult to predict a specific function; however, it is possible that this RNA-binding protein(s) may be required for the selection of the transcripts to be translated in a particular condition but also should have the ability to interact with proteins of the translational machinery; for instance, the translation initiation factors. It is possible that the *PvLEA18*-3'UTR binding protein(s) participates in the *PvLEA18*-5'UTR and 3'UTR interaction to facilitate, together with the proteins in the translation initiation complex, the mRNA circularization and consequently increase the translation efficiency (Gallie, 2002).

The findings in this work show that despite the general decrease in protein synthesis that occurs in most plant tissues in response to water scarcity, the transcript encoding the *PvLEA18* protein is efficiently translated under this stress conditions because its 3'UTR contributes with sequence determinants that allow its efficient recruitment in ribosomes. We also show that the high levels of the *PvLEA18* mRNA accumulated in response to dehydration are not enough to sustain the high levels of protein needed, but rather that some sequences in the 3'UTR are necessary to maintain translational initiation and/or re-initiation under this adverse conditions. Previous results showed that the *PvLEA18* protein also accumulates in relative high levels during specific developmental stages and particular tissues or regions of the plant during normal development, such as late embryogenesis, pollen maturation, during germination and seedling establishment, in vascular tissues, in

meristematic regions and in the stem growing regions; in all these cases, the presence of its transcript 3'UTR was required to enhance the expression of the protein (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2000), suggesting that these developmental stages also imposed a translational selection of a subset of transcripts, which include that encoding the PvLEA18 protein.

In this work we provide evidence showing for the first time that proteins different to PABP may bind to the 3'UTRs of some plant genes to modulate translation, which is relevant in view of the fact that the information regarding translational regulation in plants has been focused mainly on the role of the 5'UTRs in translational regulation (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Gallie, 2002). Considering that the 5' and 3'UTRs of a transcript are important to facilitate an efficient translation initiation via circularization of the mRNA through the interaction with initiation factors and PABP (Gallie, 2002), the identification of sequences within the 3'UTRs provides valuable information to understand the mechanisms involved in the regulation of translation.

Although it has been shown that differential mRNA translation contributes to gene regulation under dehydration stress (Kawaguchi, et al., 2003; Kawaguchi, et al., 2004), this report is the first example where it is demonstrated that the 3'UTR of a dehydration responsive transcript participates in its translational enhancement under water deficit.

Acknowledgements

We thank to T. Dinkova, F. Lledías and J. L. Reyes for critical reading of the manuscript and stimulating discussions, and to R. M. Solórzano, T. Dinkova, P. Rueda and V. Pando for technical assistance. We are also grateful to the Oligonucleotides Synthesis and DNA Sequencing Facilities of the IBt for providing us with the oligonucleotides and DNA sequences used in this work, to F. Campos for kindly providing the plasmids containing *LT178*, *D113* and *ERD10* cDNAs and to J. L. Citalpopoca for support in the greenhouse work. We thank the reviewers for their contribution in the improvement of this manuscript. M. Battaglia was supported by a scholarship from DGEP-UNAM. This work was partially funded by grants from the DGAPA-UNAM (IN225002-2) and CONACyT-Mexico (40603-Q, 50485-Q).

References

- Bailey Serres J** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* **4**: 142-148.
- Bailey TL, Elkan C** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*: 28-36
- Bailey-Serres J, Dawe RK** (1996) Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol* **112**: 685-695
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58
- Battaglia M, Covarrubias AA** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* **148**: 6-24.
- Bate N, Spurr C, Foster GD, Twell D** (1996) Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'UTR of a late pollen transcript. *The Plant Journal* **10**: 613-623
- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira R, Bailey Serres J** (2005) Genome-wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in Arabidopsis Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation. *Annals of Botany* **96**: 647-660
- Clough S, Bent A** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*- mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743
- Colmenero-Flores J, Moreno LP, Smith C, Covarrubias AA** (1999) Pvlea-18, a Member of a New Late-Embryogenesis-Abundant Protein Family That Accumulates during Water Stress and in the Growing Regions of Well-Irrigated Bean Seedlings. *Plant Physiology* **120**: 93-103
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* **35**: 393-405
- Covarrubias AA, Ayala JW, Reyes JL, Hernandez M, Garcarrubio A** (1995) Cell-Wall Proteins Induced by Water Deficit in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings. *Plant Physiol* **107**: 1119-1128
- Del Angel R, Papavassiliou A, Fernandez Tomas C, Silverstein S, Racaniello V** (1989) Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. *PNAS* **86**: 8299-8303
- Dhindsa RS, Cleland RE** (1975) Water stress and protein synthesis. *Plant Physiol* **55**: 778-781
- Dinkova T, Keiper B, Korneeva N, Aamodt E, Rhoads RE** (2005) Translation of a Small Subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Isoform. *Mol Cell Biol*. **25**: 100-113.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem* **132**: 6-13.
- Fennoy S, Bailey Serres J** (1995) Post transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *The Plant Journal* **7**: 287-295
- Fennoy S, Nong T, Bailey Serres J** (1998) Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *The Plant Journal* **15**: 727-735.
- Gallie DR, Young TE** (1994) The Regulation of Gene Expression in Transformed Maize Aleurone and Endosperm Protoplasts. Analysis of Promoter Activity, Intron Enhancement, and mRNA Untranslated Regions on Expression. *Plant Physiol* **106**: 929-936
- Gallie DR** (2002) Protein-protein interaction required during translation. *Plant Mol Biol* **50**: 949-970
- Gutierrez R, Macintosh G, Green P** (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science* **4**: 429-438
- Henikoff S, Henikoff JG, Alford WJ, Pietrovski S** (1995) Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene-COMBIS* **163**: 17-26
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J, Hanafey M, Tingey S, Chua N** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* **115**: 4891-4900
- Hsiao T** (1970) Rapid Changes in Levels of Polyribosomes in *Zea mays* in Response to Water Stress. *Plant Physiol* **46**: 281-285
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI** (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* **106**: 477-487
- Hulzink R, de Groot P, Croes A, Quaedvlieg W, Twell D, Wullems G, van Herpen M** (2002) The 5' Untranslated Region of the *ntp303* Gene Strongly Enhances Translation during Pollen Tube Growth, But Not during Pollen Maturation. *Plant Physiol* **129**: 342-353
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907

- Joshi CP, Nguyen HT** (1995) 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucleic Acids Res* **23**: 541-549
- Kawaguchi R, Bailey Serres J** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 460-465
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **33**: 955-965
- Kawaguchi R, Williams AJ, Bray E, Bailey Serres J** (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell and Environment* **26**: 221-229
- Kawaguchi R, Girke T, Bray E, Bailey Serres J** (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **38**: 823-839
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **35**: 225-231
- Laemmli U** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Mason H, Mullet J, Boyer J** (1988) Polysomes, messenger RNA, and growth in soybean stems during development and water deficit. *Plant Physiology* **86**: 725-733
- Moreno-Fonseca LP, Covarrubias AA** (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate Pvlea-18 gene expression in response to dehydration. *Plant Mol Biol* **45**: 501-515
- Newman T, Green P** (1993) DST Sequences, Highly Conserved among Plant SAUR Genes, Target Reporter Transcripts for Rapid Decay in Tobacco. *The Plant cell* **5**
- Nicolai M, Roncato MA, Canoy AS, Rouquie D, Sarda X, Freyssinet G, C. R** (2006) Large-Scale Analysis of mRNA Translation States during Sucrose Starvation in Arabidopsis Cells Identifies Cell Proliferation and Chromatin Structure as Targets of Translational Control. *Plant Physiol* **141**: 663-673
- Nordin K, Vahala T, Palva E** (1993) Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* **21**: 641-653
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* **34**: 868-887
- Ortega JL, Moguel-Esponda S, Potenza C, Conklin CF, Quintana A, Sengupta-Gopalan C** (2006) The 3'untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *The Plant Journal* **45**: 832-846
- Pesole G** (1999) UTRdb: a specialized database of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic acids research* **27**: 188-191
- Preiss T, Hentze M** (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* **25**: 1201-1211
- Reinbothe S, Reinbothe C, Heintzen C, Seindenbecher C, Parthier B** (1993) A methyl jasmonate-induced shift in the length of the 5' untranslated region impairs translation of the plastid *rbcl* transcript in barley. *The EMBO Journal* **12**: 1505-1512
- Rhodes P, Matsuda K** (1976) Water stress, rapid polyribosome reductions and growth. *Plant Physiol* **58**: 631-635
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Shen B** (2002) PCR cloning protocols: second edition, Vol 192. Humana Press
- Shenton D, Smirnova J, Selley J, Carroll K, Hubbard S, Pavitt G, Ashe M, Grant C** (2006) Global Translational Responses to Oxidative Stress Impact upon Multiple Levels of Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 29011-29021
- Sheu J-J, Jan S-P, Lee H-T, Yu S-M** (1994) Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *The Plant Journal* **5**: 655-664
- Tang L, Bhat S, Petracek ME** (2003) Light Control of Nuclear Gene mRNA Abundance and Translation in Tobacco. *Plant Physiol* **133**: 1979-1990
- Watson J, Thompson W** (1986) Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. *Methods in Enzymology* **118**: 57-75
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 781-803
- Zhang S, Mehdy M** (1994) Binding of a 50-kD protein to a U-rich sequence in an mRNA encoding a proline rich protein that is destabilized by fungal elicitor. *The Plant Cell* **6**: 135-145

- Zhang S, Sheng J, Liu Y, Mehdy M** (1993) Fungal Elicitor-Induced Bean Proline-Rich Protein mRNA Down-Regulation is Due to Destabilization That is Transcription and Translation Dependent. *The Plant Cell* **5**: 1089-1099
- Zhu J-K** (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 247-273.

Figure legends

Figure 1. Effect of the *PvLEA18*-3'UTR on the transcriptional rate of the *GUS* reporter gene. **(a)** Diagram representing the constructions containing the control regions of the *PvLEA18* gene. Each construction contains the *PvLEA18* promoter fused to the *GUS* reporter gene and to 0.607 kb of the *PvLEA18*-3'UTR or to the *NOS* 3'UTR. In this work, we used homozygous *Arabidopsis thaliana* transgenic lines containing each of these constructions. **(b)** Transcriptional rate of different genes in the *Pro_{PvLEA18}:GUS:PvLEA18*-3'UTR (containing transcribed and untranscribed sequences) and *Pro_{PvLEA18}:GUS:NOS*-3'UTR homozygous transgenic lines grown under optimal irrigation or water deficit conditions. Rosettes of 15 days-old *A. thaliana* plants were harvested and dehydrated in a humid chamber until they loss 30% of the fresh weight (WD). Controls were maintained in optimal water conditions during the treatment (I). Nuclear run-on experiments were carried out as described in Experimental procedures. RNA slot blot analysis was carried out using as probe equal amounts of those labelled transcripts synthesized in the run-on experiment to hybridize against the *GUS* reporter gene or against inducible dehydration genes: *LT178* (At5g52310), *D113* (At5g06760), *ERD10* (At1g20450), or against non-responsive stress genes: *RCE1* (At4g36800), *EIF4A1* (At3g13920) and *28S*. After hybridization the intensity of the signals was measured using NIHImage 1.63. Transcriptional rate was expressed as the signal intensity of each gene relative to the signal intensity of the ribosomal gene. The results in this figure correspond to the media of a triplicate from one representative transgenic line from each construction, selected from the analysis of nine different lines (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001). Error bars are shown for each case (n=3). The mean for *GUS* transcriptional rate is not significantly different (significance level: 0.05) according to Fisher's -test.

Figure 2. Effect of *PvLEA18* 3'UTR on the half-life of the *GUS* reporter transcript in response to water deficit induced by PEG treatment. Fifteen days-old *Pro_{PvLEA18}:GUS:PvLEA18*-3'UTR and *Pro_{PvLEA18}:GUS:NOS*-3'UTR homozygous transgenic lines were treated with 25% PEG solution during 16 h, at this time, the treatment solution was changed for a fresh solution now containing Actinomycin D, a transcriptional inhibitor. Controls were maintained in PEG solution without Actinomycin D. Total RNA was extracted from samples treated during 1, 2 and 4 h. RNAs were analyzed by Northern blotting. (a). Representative Northern blot to determine transcripts half-life. (b). Representative quantification of the decrease in *GUS* mRNA abundance during water deficit treatments. Signals were quantified and normalized with the signals from the *28S* gene and from control treatments (without Actinomycin D). The results were analyzed by semi-logarithmic plotting of the remaining mRNA versus time. Linear regression analysis is shown for each set of points. Results shown in a and b panels are representative of three independent experiments using one representative transgenic line from each construction, selected from the analysis of nine different lines (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001). Transcript half-life was calculated from the slope of the decay curve. The average half-life and SE values shown in panel b were calculated from three independent experiments (see Materials and Methods for details).

Figure 3. Sedimentation profile of different mRNAs from extracts obtained from *A. thaliana* plants grown under water deficit conditions. *A. thaliana* plants containing constructs *Pro_{PvLEA18}:GUS:PvLEA18*-3'UTR or *Pro_{PvLEA18}:GUS:NOS*-3'UTR were grown on Turface soil. After 15 days, plants were placed in a humid chamber until 30 % of their fresh weight was lost. Controls were maintained in optimal irrigation conditions. Then,

samples were frozen in liquid N₂ and poly-ribosomes were isolated and separated on 15%-60% (w/v) sucrose density gradient. The gradient was fractionated and RNA was extracted from each fraction and analysed by Northern blot. After hybridization the intensity of the signals was measured using Image J 1.34s. The distribution of *GUS* (a), *ERD10* (b) and *EIF4A* (c) mRNAs in the ribosomal sedimentation profile is expressed as percentage. This figure shows the data from a typical experiment using one representative transgenic line from each construction, which were selected from the analysis of nine different lines (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001). Panel (d) shows the distribution of *GUS* transcript in monosomes and polysomes, expressed as percentage, considering 100% the *GUS* transcript in the total fractions from the gradient. Error bars are shown for each case (n=3).

Figure 4. Schematic diagram of *PvLEA18* transcript showing the *PvLEA18* open reading frame (ORF) and the 5'- and 3'-UTRs. The approximate length of the *PvLEA18*-3'UTR is shown (275 b). Two distinctive motifs (BOX 1 and BOX 2) were found in the most upstream 170 b segment of this 3'UTR (delimited with the dotted line). In the lower part of the figure a comparison between *PvLEA-18*, *GmLEA-18* (*PM35*) and *MtLEA-18* Box 1 and 2 present in their 3'UTRs is shown. The presence of putative *cis* acting sequences in the *PvLEA18*-3'UTR, was analyzed by BLAST, using UTRsite database (<http://www2.ba.itb.cnr.it/UTRSite/>) (Pesole, 1999). The numbers in Box1 and Box2 sequences correspond to their localization from the stop codon of each ORF. *Gm*: *Glycine max*, *Mt*: *Medicago truncatula*.

Figure 5. Comparison of the effect between *PvLEA18*-3'UTRs of different length on the *GUS* reporter gene activity under water deficit conditions. (a) Diagram of the constructions used to transform Arabidopsis plants. Two segments of the *PvLEA18*-3'UTR [*300PvLEA18* (upper) and *170PvLEA18* (lower)] were fused upstream *NOS*-3'UTR sequence. (b) *GUS* activity was determined from Arabidopsis transgenic plants containing constructs with Pro_{*PvLEA18*}:*GUS* fused to *PvLEA18*-3'UTR, *NOS*-3'UTR, *300PvLEA18NOS*-3'UTR or *170PvLEA18NOS*-3'UTR, subjected to water deficit treatment. Water stress was imposed by progressive dehydration using humid chambers, while controls were maintained under optimal irrigation conditions (for details see Materials and Methods). The control (optimal irrigation) values are shown with lightest-gray shading, to the left of the respective water deficit values. The boldface numbers (below) correspond to the numbers of the different lines. The results in this figure correspond to the media of triplicates from two independent experiments using four transgenic lines containing *170PvLEA18NOS*-3'UTR and five transgenic lines containing *300PvLEA18NOS*-3'UTR. Error bars are shown for each case (n=12).

Figure 6. Protein-RNA-binding assays to detect proteins from *P. vulgaris* that specifically bind to *PvLEA18*-3'UTR segments. (a) In this panel, UV-crosslinking experiments show that a protein with an approximate molecular mass of 20 kDa (arrowhead) specifically binds to the *PvLEA18*-3'UTR. These experiments were carried out using the soluble fraction obtained after 80% ammonium sulfate fractionation (80-ASF) of total protein extracts from dry embryo (E) and seedlings subjected to water deficit (WD). The *NOS*-3'UTR was used to differentiate those proteins that bound specifically to the *PvLEA18*-3'UTR segments. The samples were separated in a 15% SDS-PAGE and all lanes were loaded with the same amount of protein. *NOS*-3'UTR, *300* and *170 PvLEA18*-3'UTR's were labelled by *in vitro* transcription as described in Materials and Methods. (b) REMSA experiments show the formation of protein-*170 PvLEA18*-3'UTR RNA complexes when 80-ASF

fraction (Lane 2) or IEC further purified fractions (Lanes 3 and 4) were used. These fractions were obtained from protein extracts from bean plants grown under water deficit. The results shown in lanes 3 and 4 correspond to independent experiments using the same IEC fraction. Lane 1 shows a typical result in our hands of REMSA control experiments when protein extracts are not included. Grey arrowheads indicate those labelled bands corresponding to free-RNA, some of which may be highly structured. (c) REMSA experiments show the formation of protein-170 *PvLEA18*-3'UTR RNA complexes when 80-ASF fractions obtained from irrigated (C) and stressed bean plants (WD) were used.

Figure 7. Effects on the formation of protein-RNA complexes using wild type and mutated Box 1 and Box 2. REMSA experiments using mutated Box 1 (B1m) and Box 2 (B2m) show a decrease in the formation of protein-RNA complexes when compared with the results obtained using the wild type sequences (*170 PvLEA18*-3'UTR). When mutated Box 2 (B2m) was used, the formation of the protein-RNA complex was not detected. In these experiments, 80-ASF fractions obtained from stressed bean plants were used. Grey and black arrowheads indicate those labelled bands corresponding to free-RNA and the bands corresponding to the protein-RNA complex, respectively. The bottom panel shows the sequence of the wild type and mutated Box1 and Box2.

Figure 1

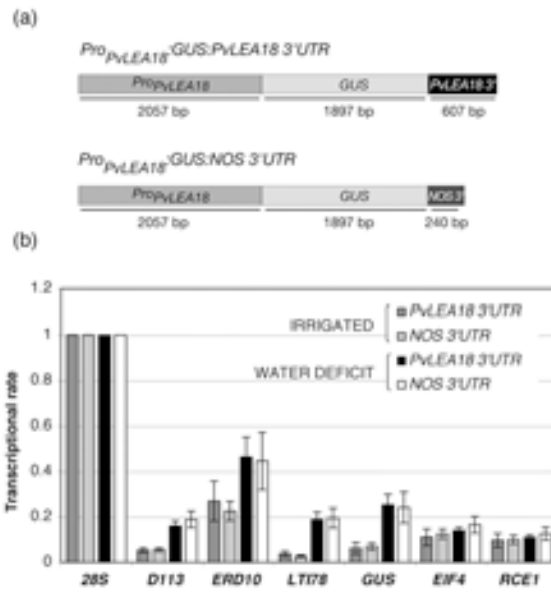
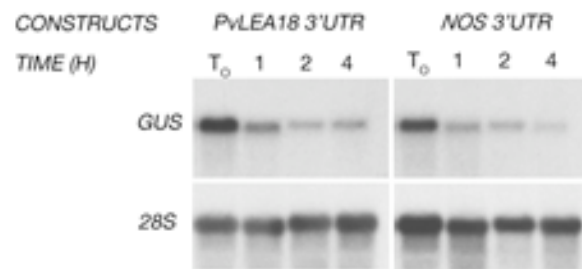


Figure 2

(a)



(b)

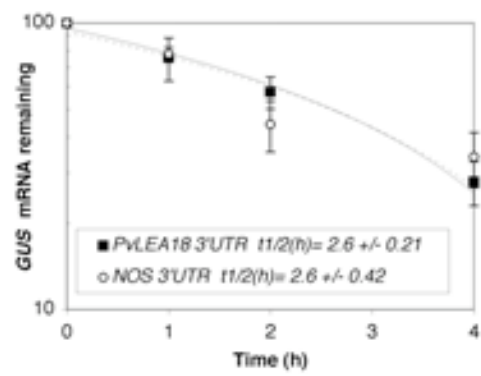


Figure 3

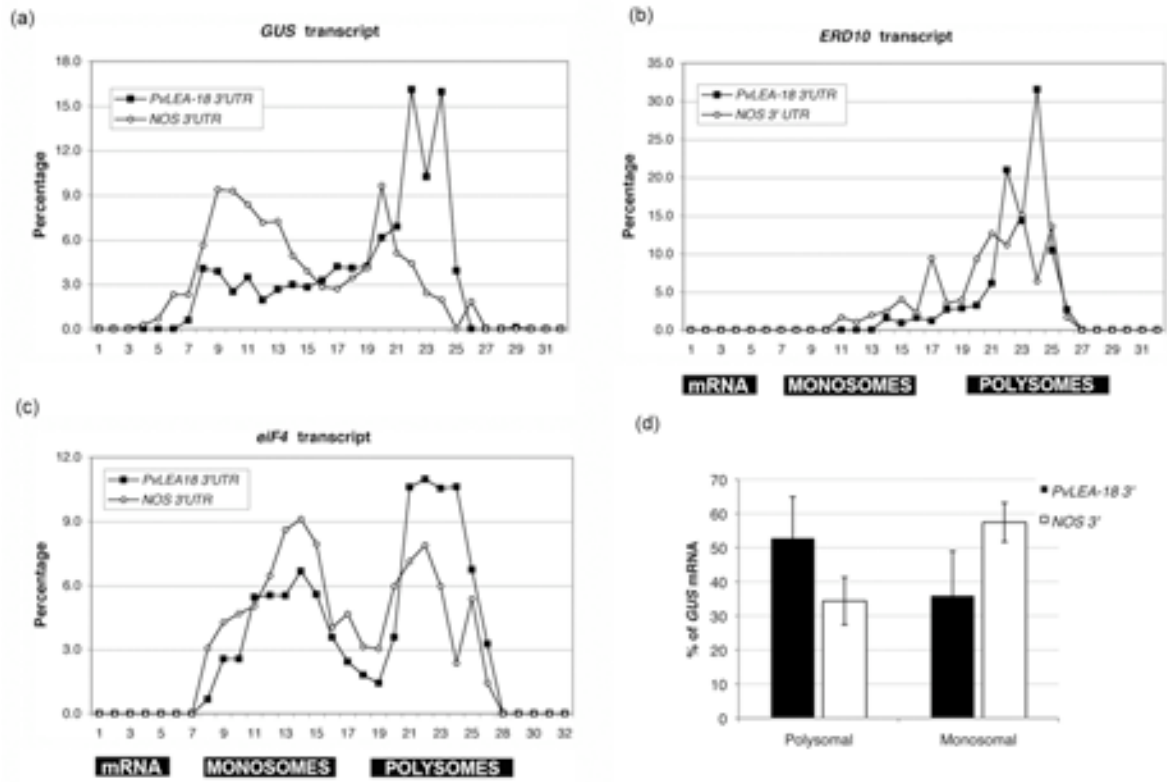


Figure 4

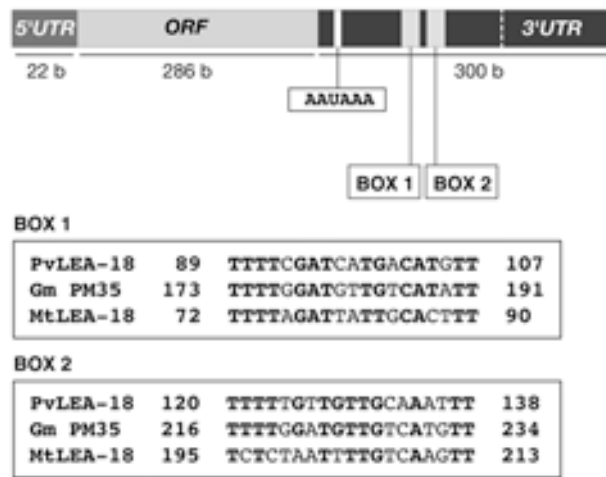


Figure 5

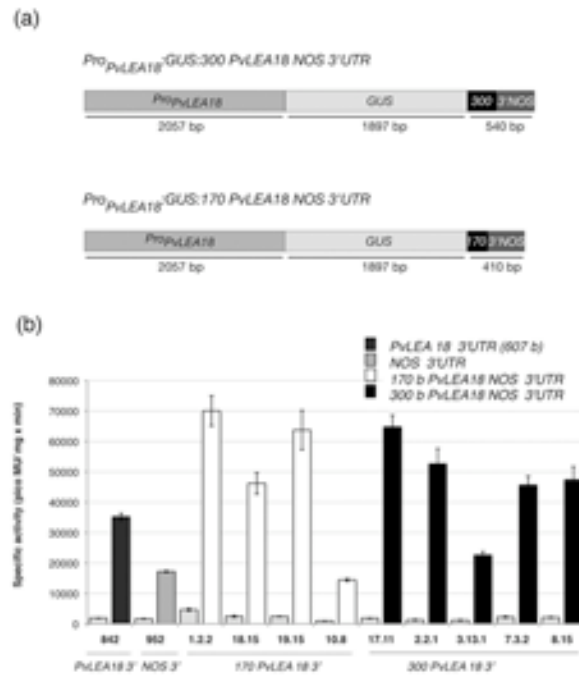


Figure 6

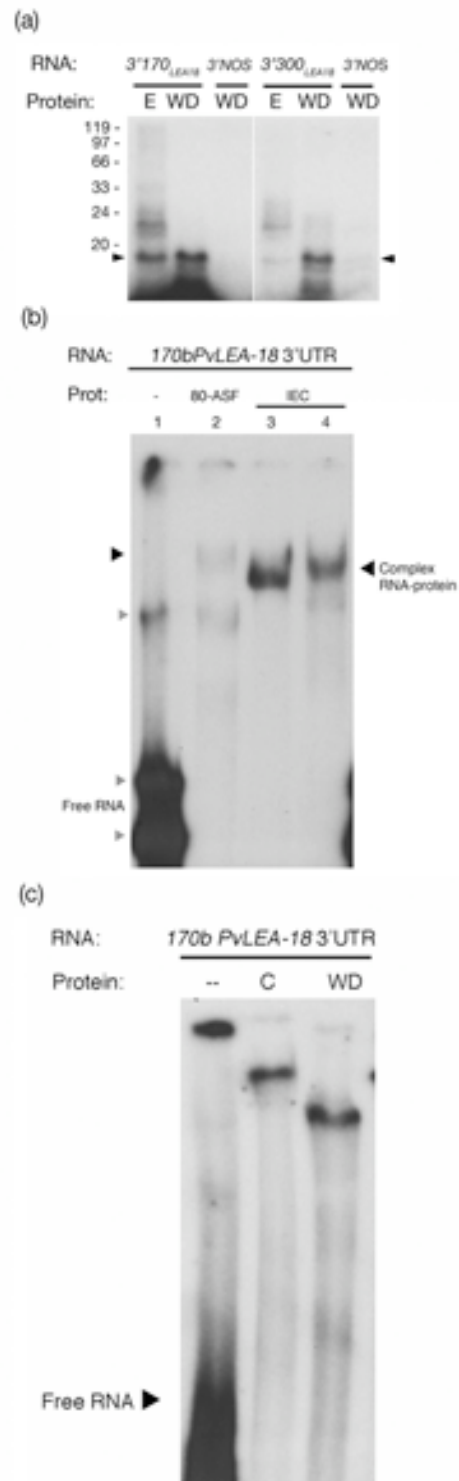
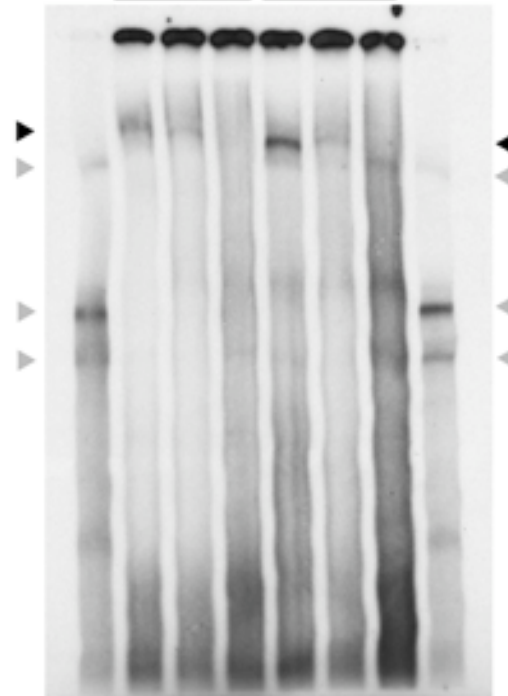


Figure 7

RNA: 170 B1m B2m 170 B1m B2m
Protein: 20 μ g 40 μ g



BOX 1	TTTTCGATCATGACATGTT
BOX 1m	TTAGTTCAGTGTCTTCATA
BOX 2	TTTTTGTGTTGCAAATTT
BOX 2m	TGCATTGATATTATTCGCT

The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins^{1[W]}

Marina Battaglia², Yadira Olvera-Carrillo², Alejandro Garcarrubio, Francisco Campos, and Alejandra A. Covarrubias*

Departamento de Biología Molecular de Plantas (M.B., Y.O.-C., F.C., A.A.C.) and Departamento de Microbiología Molecular (A.G.), Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Water limitation affects all types of organisms at some stage during their life cycle; therefore, many strategies have been selected through evolution to cope with water deficit, including changes in enzyme activities and in gene expression, among others. In plants, a group of very hydrophilic proteins, known as LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) proteins, accumulate to high levels during the last stage of seed maturation (when acquisition of desiccation tolerance occurs in the embryo) and during water deficit in vegetative organs, suggesting a protective role during water limitation (Dure, 1993b; Bray, 1997; Garay-Arroyo et al., 2000; Hoekstra et al., 2001).

LEA proteins have been grouped into various families on the basis of sequence similarity (see below; Dure et al., 1989; Ingram and Bartels, 1996; Colmenero-Flores et al., 1999; Cuming, 1999). Although significant similarity has not been detected between the members of the different families, a unifying and outstanding feature of most of them is their high hydrophilicity and high content of Gly and small amino acids like Ala and Ser (Baker et al., 1988; Dure, 1993b).

Most LEA proteins are part of a more widespread group of proteins called "hydrophilins." The physicochemical characteristics that define this set of proteins are a Gly content greater than 6% and a hydrophilicity index greater than 1. By database searching, it was shown that this criterion selects most LEA proteins, as well as additional proteins from different taxa (Garay-Arroyo et al., 2000). The genomes of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* contain five and 12 genes, respectively, encoding proteins with the characteristics of hydrophilins. The fact that the transcripts of all these genes accumulate in response to osmotic stress suggests that hydrophilins represent a widespread

adaptation to water deficit (Garay-Arroyo et al., 2000; Posas et al., 2000; Yale and Bohnert, 2001; Saccharomyces Genome Database project, <http://www.yeastgenome.org>). Remarkably, now it is known that these proteins are distributed across archeal, eubacterial, and eukaryotic domains, as will be described later in this review.

Although the functional role of hydrophilins remains speculative, there is evidence supporting their participation in acclimation and/or in the adaptive response to stress. Ectopic expression of some plant hydrophilins (LEA proteins) in plants and yeast confers tolerance to water-deficit conditions (Imai et al., 1996; Xu et al., 1996; Swire-Clark and Marcotte, 1999; Zhang et al., 2000), and their presence has been associated with chilling tolerance (Danyluk et al., 1994, 1998; Ismail et al., 1999a, 1999b; Puhakainen et al., 2004a; Nakayama et al., 2007). An osmosensitive phenotype is caused by the deletion of the RMF hydrophilin gene in *E. coli* (Garay-Arroyo et al., 2000) and by the absence of a LEA protein in the moss *Physcomitrella patens* (Saavedra et al., 2006).

To gain further insight into their function, *in vitro* assays have been established similar to those used to test the role of other protective molecules such as chaperones. Examples of these are cryoprotection assays, in which the protective role of LEA proteins is tested using freeze-labile enzymes (Lin and Thomashow, 1992). Dehydration assays, in which the activities of malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in the presence or absence of a putative protecting protein, showed that hydrophilins from plants, bacteria, and yeast were able to protect their enzymatic activity. Under similar conditions, trehalose was required in a 10⁵-fold molar excess over hydrophilins to confer the same protective level to LDH, suggesting that they confer protection via different mechanisms (Reyes et al., 2005). While hydrophilin research in different organisms has provided us with significant advances to understand their biological properties, we are still far from a complete understanding of their biological functions and activities.

Here, we review the structural and functional characteristics of hydrophilins to provide a reference platform to understand their role during the adaptive response to water deficit in plants and other organisms and to generate new ideas to elucidate their function.

¹ This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico (grant nos. 40603-Q and 50485-Q). M.B. and Y.O.-C. were supported by scholarships from Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, respectively.

² These authors contributed equally to the article.

* Corresponding author; e-mail crobles@ibt.unam.mx.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Alejandra A. Covarrubias (crobles@ibt.unam.mx).

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.120725

LEA PROTEINS

Twenty-seven years ago, Leon Dure III identified several families of proteins that accumulated to high levels during the maturation phase of cotton (*Gossypium hirsutum*) embryogenesis (Dure and Chlan, 1981; Dure and Galau, 1981; Dure et al., 1981), which gave rise to their name as LEA proteins. The characterization of different representative cDNAs from many of these protein families uncovered their common structural features, some of which were first noticed by Dure and his colleagues. These include a high hydrophilicity, a lack or low proportion of Cys and Trp residues, and a preponderance of certain amino acid residues such as Gly, Ala, Glu, Lys/Arg, and Thr, which later led them to be considered as a subset of hydrophilins (Dure, 1993b; Garay-Arroyo et al., 2000; Fig. 1). The common structural elements among the members of different families indicate that most exist principally as randomly coiled proteins in solution. While structure modeling and structure prediction programs suggest that at least some LEA proteins from particular families contain defined conformations (Dure et al., 1989; Dure, 1993a; Close, 1996), all hydrophilic LEA proteins studied experimentally have revealed a high degree of unordered structure in solution. This has led them to be considered as intrinsically unstructured proteins (Fig. 2; McCubbin et al., 1985; Eom et al., 1996; Lisse et al., 1996; Russouw et al., 1997; Ismail et al., 1999b; Wolkers et al., 2001; Soulages et al., 2002, 2003; Goyal et al., 2003; Shih et al., 2004;

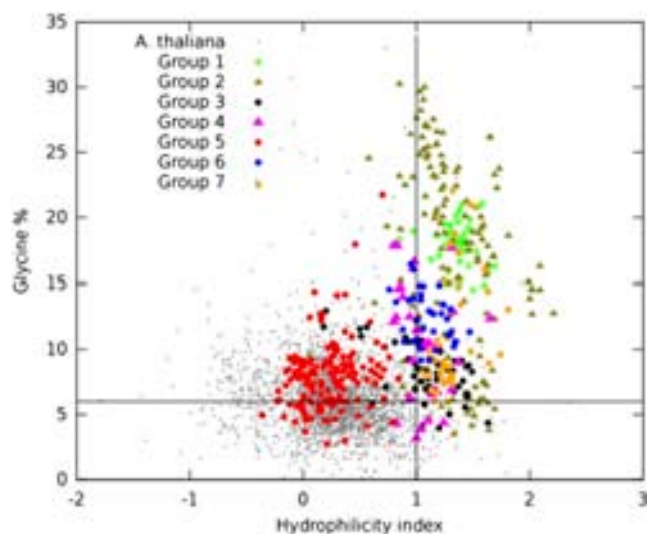


Figure 1. Graphic representation of LEA proteins according to the properties that define the hydrophilins. This analysis includes data for all LEA proteins considered in this work (378). All points on the top right quadrant correspond to proteins that can be considered as hydrophilins according to their definition (hydrophilicity index > 1, Gly > 6%). Also, 3,000 randomly chosen Arabidopsis proteins are shown as reference. To obtain the hydrophilicity index, the average hydrophobicity of all amino acids in the protein was multiplied by -1 (Kyte and Doolittle, 1982).

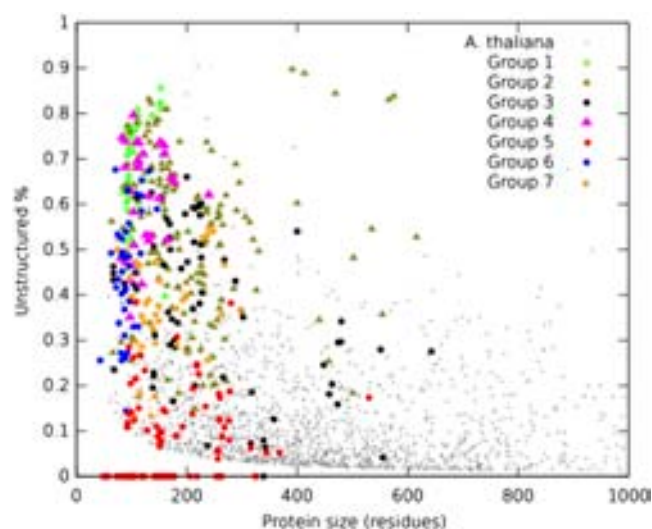


Figure 2. Protein size and fraction predicted as unstructured of LEA proteins belonging to different groups. Also, 3,000 randomly chosen Arabidopsis proteins are shown as reference. Many of them (1,350 of 3,000) cannot be seen because they overlap the x axis, as they were predicted to be 0% unstructured. The unstructured fraction was calculated according to Dosztányi et al. (2005), using a sliding window of 21 amino acids.

Dyson and Wright, 2005; Tompa, 2005; Mouillon et al., 2006; Kovacs et al., 2008).

In plants, most of these proteins and their mRNAs accumulate to high concentrations in embryo tissues during the last stages of seed development before desiccation (Baker et al., 1988; Hughes and Galau, 1989; Ingram and Bartels, 1996; Oliveira et al., 2007; Bies-Ethève et al., 2008; Hundertmark and Hinch, 2008) and also in vegetative tissues exposed to dehydration, osmotic, and/or low-temperature stress (Dure et al., 1989; Chandler and Robertson, 1994; Robertson and Chandler, 1994; Ingram and Bartels, 1996; Bray, 1997; Campbell and Close, 1997; Thomashow, 1998; Bies-Ethève et al., 2008; Hundertmark and Hinch, 2008). These observations have suggested their involvement in the plant response to water-limiting environments, probably by playing roles in ameliorating different stress effects; however, their precise functions remain elusive.

Members of the LEA protein families appear to be ubiquitous in the plant kingdom. Their presence has been confirmed not only in angiosperms and gymnosperms (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997; Cuming, 1999) but also in seedless vascular plants (e.g. *Selaginella*; Oliver et al., 2000; Alpert, 2005; Iturriaga et al., 2006) and even in bryophytes (e.g. *Tortula*, *Physcomitrella*; Alpert and Oliver, 2002; Oliver et al., 2004; Saavedra et al., 2006; Proctor et al., 2007), pteridophytes (e.g. ferns; Reynolds and Bewley, 1993), and algae (Honjoh et al., 1995; Tanaka et al., 2004). In addition, similar proteins are found in bacteria and yeast (Stacy and Aalen, 1998; Garay-Arroyo et al., 2000), nematodes (Solomon et al., 2000; Browne et al.,

2004), archaea (F. Campos, unpublished data), and fungi (Mtwisha et al., 1998; Abba et al., 2006).

Recently, computational methods to study and/or classify these proteins have been developed (Wise, 2002; Wise and Tunnacliffe, 2004). These methods consider the similarities in peptide composition rather than the similarities in their amino acid sequences. Although this kind of analysis may emphasize those characteristics related to the amino acid composition of a protein, it neglects the importance of conserved motifs that could be essential to define their structural, functional, and evolutionary relationships.

Here, we will adopt the classification introduced by Dure's group, in which LEA proteins are categorized into at least six families by virtue of similarities in their deduced amino acid sequences (Galau and Hughes, 1987; Baker et al., 1988; Dure et al., 1989; Dure, 1993b; Colmenero-Flores et al., 1997; Cuming, 1999). This classification has been very useful because it not only allows the identification of different families, but it is also possible to distinguish motifs conserved across species, which are unique to each family. Based on these characteristics and considering all available sequence information from different plant species, we have grouped LEA proteins into seven distinctive groups or families. Groups 1, 2, 3, 4, 6, and 7 correspond to the hydrophilic or "typical" LEA proteins (Supplemental Tables S1–S6), whereas those LEA proteins that show hydrophobic characteristics ("atypical") have been kept in group 5, where they could be subclassified according to their homology.

The nomenclature in this work will follow the terminology introduced by Cuming (1999), in which groups 1 to 4 correspond to the first LEA proteins described from cotton: group 1 (D-19), group 2 (D-11), group 3 (D-7/D-29), and group 4 (D-113). In group 5 are the atypical LEA proteins (D-34, D-73, D-95; Dure, 1993b; Cuming, 1999). Similarly, the remaining two groups are designated with the consecutive numbers and associated to the name of the proteins that were used to describe these groups for the first time: group 6 (LEA18; Colmenero-Flores et al., 1997) and group 7 (ASR1 [for ABSCISIC ACID STRESS RIPENING1];

Silhavy et al., 1995; Rossi et al., 1996). Although two recent publications report an inventory of the LEA proteins encoded in the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) genome (Bies-Ethève et al., 2008; Hundertmark and Hinch, 2008), we did not follow the same nomenclature because they have included in their classification Arabidopsis LEA proteins not found in other plant species. Table I shows a comparison of the nomenclature used in this work with the corresponding PFAM number and other classifications.

GROUP 1 (D-19)

This set of LEA proteins, originally represented by the D-19 and D-132 proteins from developing cotton seeds, were recognized by an internal 20-mer sequence (Galau et al., 1992; Baker et al., 1995). They contain a very large proportion of charged residues, which contributes to their high hydrophilicity, and a high content of Gly residues (approximately 18%). This last characteristic allows us to predict that they exist largely as random coils or unstructured in aqueous solution (Eom et al., 1996; Russouw et al., 1997; Soulages et al., 2002). Structural analyses using circular dichroism (CD) strongly indicate that group 1 members exhibit a high percentage (70%–82.5% of their residues) of random coil configuration in aqueous solution, with a small percentage of the protein exhibiting a left-handed extended helical or poly-(L-Pro)-type (PII) conformation (Soulages et al., 2002). NMR analyses also indicate that this group of proteins have an unstable structure and are quite flexible (Eom et al., 1996). A comparison between group 1 proteins from all taxa reveals substantial homology, especially in the hydrophilic 20-mer motif (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]). This motif may be present in several copies arranged in tandem (from one to four in plant species, and up to eight in other organisms). In plant proteins, two other conserved motifs were identified in this work, an N-terminal motif (TVVPGGTGGKSLEAQE[H/N]LAE) located just upstream of the 20-mer and a C-terminal motif (D[K/

Table I. Correspondence between different nomenclatures given to LEA protein groups

*, Used by Bies-Ethève et al. (2008) to differentiate proteins initially identified as related to group 5 but revealed as belonging to group 3. –, Used to denote groups that were not identified by these authors.

This Work	Dure	Bies-Ethève	PFAM	PFAM No.	Name
1	D-19	1	LEA_5	PF00477	Em1, Em6
2	D-11	2	Dehydrin	PF00257	Dehydrin, RAB
3A	D-7	3	LEA_4	PF02987	ECP63, PAP240, PM27
3B	D-29	3*	LEA_4	PF02987	D-29
4A	–	4	LEA_1	PF03760	LE25_LYCES
4B	D-113	4	LEA_1	PF03760	PAP260, PAP051
5A	D-34	5	SMP	PF04927	PAP140
5B	D-73	6	LEA_3	PF03242	AtD121, Sag21, lea5
5C	D-95	7	LEA_2	PF03168	LEA14
6	–	8	LEA_6	PF10714	LEA18
7	–	–	ABA_WDS	PF02496	ASR

E]SGGERA[A/E][E/R]EGI[E/D]IDESK[F/Y]; Fig. 3; Supplemental Table S1).

Noteworthy, similar proteins to group 1 LEA proteins have been found in *Bacillus subtilis* (Stacy and Aalen, 1998) and in other soil bacterial species. Homologous sequences have been detected in uncultured methanogenic archaeons, containing one, two, or three 20-mer repeats, and in the crustacean *Artemia franciscana*, in which two genes encoding group 1 LEA-like proteins containing four and eight 20-mer repeats, respectively, were found (F. Campos, unpublished data). Therefore, LEA group 1 is unique in its representation across all taxonomic domains: archaea, bacteria, and eukarya.

In plants, group 1 LEA proteins are preferentially accumulated during embryo development, especially in dry seeds, although they have also been detected in organs that undergo dehydration, such as pollen grains (Ulrich et al., 1990; Espelund et al., 1992; Wurtele et al., 1993; Hollung et al., 1994; Williams and Tsang, 1994; Prieto-Dapena et al., 1999; Vicient et al., 2001). Additionally, many of the characterized genes of this group are responsive to abscisic acid (ABA) and/or water-limiting conditions, mainly in embryos and, in a few cases, in vegetative tissues of young seedlings (Gaubier et al., 1993; Vicient et al., 2000).

Their possible role in the adaptation of different organisms to water scarcity is supported by the fact that the transcripts of bacterial group 1 LEA-like proteins also accumulate under stressful conditions, such as stationary growth phase, Glc or phosphate starvation, high osmolarity, high temperature, and hyperoxidant conditions (Stacy and Aalen, 1998). Further evidence comes from the presence of these proteins in organisms with extreme habitats, such as archaeons (uncultured like methanogenic RC1), as well as in some primordial saltwater crustaceans such as *Artemia* (Wang et al., 2007). Group 1 LEA-like proteins are particularly abundant in the thick-shelled eggs of *Artemia*, whose encysted form can survive in a dried, metabolically inactive state for 10 or more years while retaining the ability to endure severe environmental conditions (Macrae, 2005).

Direct evidence showing a function for group 1 LEA proteins is scarce. In vitro experiments using recombinant versions of wheat (*Triticum aestivum*) Em protein suggested their ability to protect citrate synthase or LDH from aggregation and/or inactivation due to desiccation or freezing (Goyal et al., 2005; Gilles et al., 2007). A mutation in one of the predicted α -helical domains in the N terminus of the rEm protein suggested a role for this region in providing protection from drying (Gilles et al., 2007). Tolerance to stress conditions induced by the constitutive expression of genes from this group has not been reported in plants; however, the expression of wheat TaEm in *S. cerevisiae* seems to attenuate the growth inhibition of yeast cultures normally observed in high-osmolarity media (Swire-Clark and Marcotte, 1999). Also, the absence of

one of two group 1 members in Arabidopsis plants led to a subtle phenotype of premature seed dehydration and maturation, suggesting a role during seed development (Manfre et al., 2006). The expression in vegetative tissues from plants grown under optimal growth conditions of some of the group 1 LEA proteins implies that they may also have a role during normal seed/seedling development.

GROUP 2 (D-11)

This group of LEA proteins, also known as “dehydrins,” was originally identified as the “D-11” family in developing cotton embryos. Group 2 LEA proteins are the most characterized group of LEA proteins. Typically, they are highly hydrophilic, contain a high proportion of charged and polar amino acids and a low fraction of nonpolar, hydrophobic residues, and lack Trp and frequently Cys residues; hence, they can also be considered as hydrophilins (Garay-Arroyo et al., 2000). A distinctive feature of group 2 LEA proteins is a conserved, Lys-rich 15-residue motif, EKKGIMDKIKEKLP, named the K-segment (Close et al., 1989, 1993), which can be found in one to 11 copies within a single polypeptide (Fig. 3; Table II). An additional motif also found in this group is the Y-segment, whose conserved consensus sequence is [V/T]D[E/Q]YGNP, usually found in one to 35 tandem copies in the N terminus of the protein (Fig. 3; Table II; Close et al., 1993; Close, 1996; Campbell and Close, 1997). Many proteins of this group also contain a tract of Ser residues, called the S-segment, which in some proteins can be phosphorylated (Fig. 3; Table II; Vilardell et al., 1990; Plana et al., 1991; Goday et al., 1994; Jiang and Wang, 2004). Less conserved motifs (Φ -segments), which are usually rich in polar amino acids and lay interspersed between K-segments, are present in some proteins of this group (Campbell and Close, 1997). The presence and arrangement of these different motifs in a single polypeptide allow the classification of group 2 LEA proteins into five subgroups (Campbell and Close, 1997). Proteins that only contain the K-segment are in the K-subgroup, and those that include the S-segment followed by K-segment are in the SK-subgroup. In addition, there are the YSK-, YK-, and KS-subgroups (Fig. 3; Supplemental Table S2; Campbell and Close, 1997). Proteins with these structural characteristics have been detected in different organisms of the Plantae kingdom, in nonvascular plants, like the moss *P. patens* (Saavedra et al., 2006), in seedless vascular plants such as the lycopod *Selaginella lepidophylla* (Iturriaga et al., 2006), and, more commonly, in all seed plants investigated (Supplemental Table S2).

Experimental structural analysis of four group 2 LEA proteins, Dsp16 (YSK₂) from resurrection plant (*Craterostigma plantagineum*; Lisse et al., 1996), 35-kD protein (Y₂K) from cowpea (*Vigna unguiculata*; Ismail et al., 1999b), rGmDHN1 (Y₂K) from soybean (*Glycine*

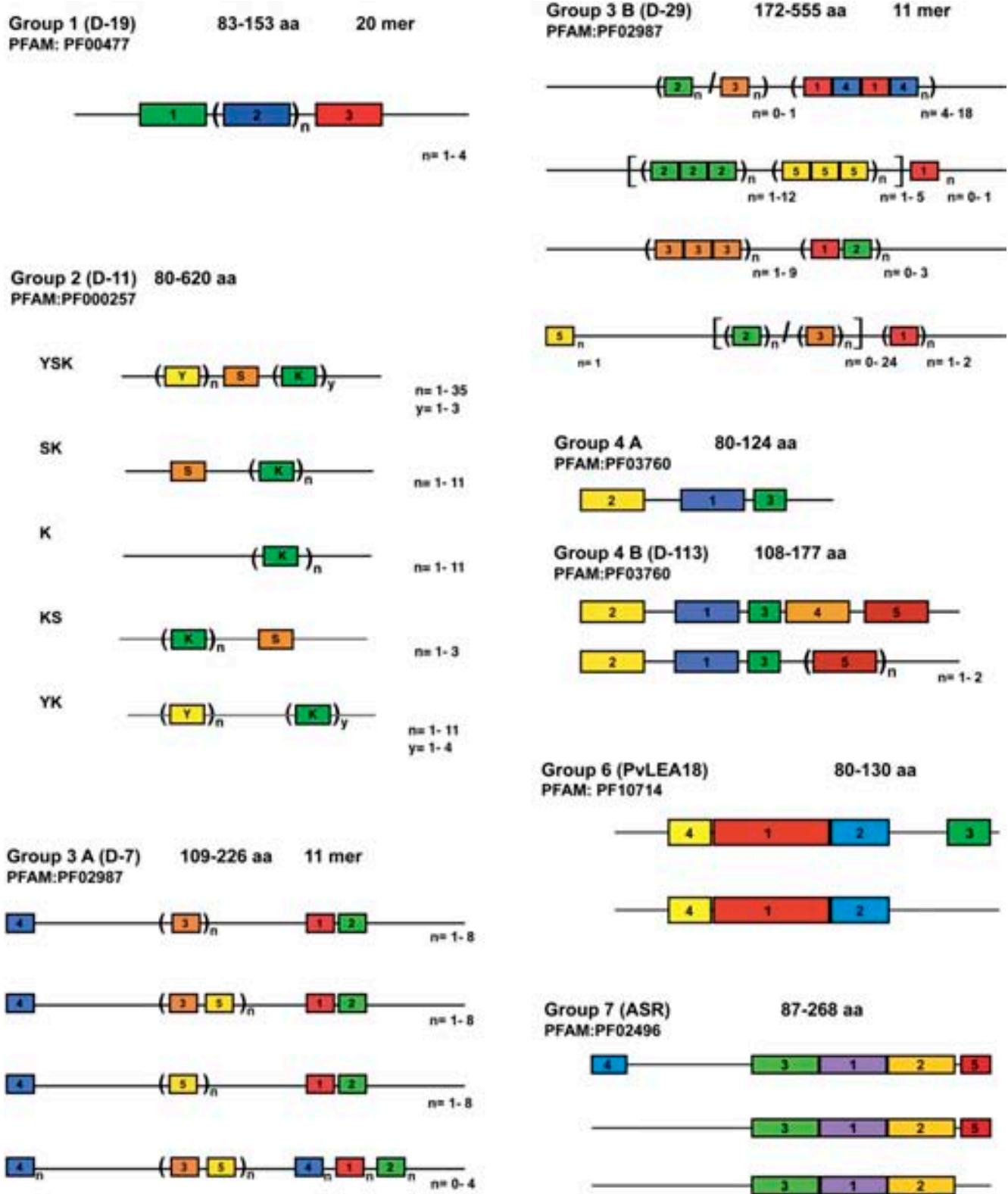


Figure 3. Array of the distinctive motifs in the LEA protein groups. Each block contains a schematic representation of the arrangement of the motifs that distinguish each group of LEA proteins and their corresponding subgroups. Although similar colors and numbers indicate the different motifs for each group, they do not imply any sequence relation among the motifs in the different blocks. The amino acid sequence corresponding to each motif represented here is shown in Table II. The range of protein sizes in each group is indicated at the top of each block, in number of amino acid (aa) residues.

Table II. Consensus amino acid sequences of the different motifs characteristic of each LEA protein group

GROUP	MOTIF	CONSENSUS SEQUENCE
LEA 1 (D-19)	1	T V V P G G T G G K S L E A G E H L A E N
PF00477	2	T R K E Q L G T E G Y Q E M G R K G G L M E K E
	3	D K S G G E R A A E E G I E I D E S K F E E R D Y
LEA 2 (D-11)	K	E K K G I M D K I K E K L P Q K L L E D I R M K F
PF00257	S	L H R S G S W S S S S S D D D H H S E E E
	Y	R T D E Y G N P V H Q V I Q
LEA 3 (D-7)	1	Q G V L Q Q T G E Q V S F S A K
PF02987	2	A A D A V K H T L G M K E N F T
	3 ^a	T A Q A A K Q K T S E S E Q Q
	5 ^a	A T E A A K Q K A S E T A Q T E A
	4	S Y K A G E T K Q R K T R A K A Q
LEA 3 (D-29)	1 ^a	T A E K A G E Y K D Y A
PF02987	4 ^a	T V E K A K E A K D T A Q T R T A M
	2 ^a	A Y E K A G S A K D M D A
	3 ^a	A A Q K A K D Y A G D S E D T S
	5	E S W T E W A K E K I A G D
LEA 4 (D-113)	1	A Q E K A E K A T A R D P x E K E M A H E K K E A K V E V R M T H T K Q I T Q R K E R L
PF03760	2	M Q S A K E K A S N M A A S A K A G M E K T K A K E A T V A D V G S A E K V D I T T K S
	3	E A E M D K H Q A K A H H A A E K Q Q K E L Q A E R E N R E A E R
	4	P T G T H Q M S A L P G H G T G Q P T G H V V E G G M A T M A T D H
LEA 6 (LEA-18)	1	L E D Y K M Q G Y G T G G H Q Q P K P G R G R K A A E L E V S D V P H R P
PF10714	2	Q S T D A P T L S G G A V S G E I P A L A T
	3	T D A I N R H G V P T Q
	4	G L P T E T S P Y V Q V D D P T S
LEA 7 (ASR)	1	A A G A Y A L H E K H K A K K D P E H A H R R K I F E
PF02496	2	E I A A A A V G A G G F A F H E H H E K K E A K V V A S Y V Y Q D D H
	3	D Y K K E E K H H K H M E H L G E L G A V K R L Q Q I M T M
	4	H H H H L F H H H K D W F R K Q Q
	5	E E E E E A H G K K H H L F K D Q H E F

The color in letters indicates the type of amino acid. Non-polar: violet = aliphatic (A, V, G, M, L, I, P); grey = aromatic (Y, W, F); Polar: green = uncharged (S, Q, N, T); blue = positively charged (R, K, H); red = negatively charged (D, E).

^a 11-mers as described by Dure (2001).

max; Soulages et al., 2003), and ERD10 (SK₃) from mouse-ear cress (*Arabidopsis*; Bokor et al., 2005), indicated that these proteins are in a largely hydrated and unstructured conformation in aqueous solution. However, equilibrium between two extended conformational states, unordered and PII structures, were also detected in the case of GmDHN1, with a low degree of transitional cooperativity. CD spectra of full-length *Arabidopsis* dehydrins (COR47, LTI29, LTI30, RAB18) and isolated peptides (K-, Y- and K-rich segments) showed mostly unordered structures in solution, with a variable content of poly-Pro helices. However, neither temperature, metal ions, nor stabilizing salts could promote ordered structures in either the peptides or the full-length proteins (Mouillon et al., 2006).

The K-segment motifs of group 2 LEA proteins are predicted to form amphipathic α -helical structures and are thought to protect membranes (Dure, 1993b; Close, 1996). Accordingly, dehydrins from cowpea and the resurrection plant showed an estimated α -helical content of approximately 15%; however, this was not the case for GmDHN1, a soybean LEA protein that, although containing K-segment motifs, does not contain α -helical regions. The limited ability of this protein to adopt α -helical conformation was confirmed by CD spectroscopy in the presence of trifluoroethanol (TFE), a helix-promoting cosolvent. Even with the addition of high concentrations (up to 60% [v/v]) of TFE or SDS (1%–4%), only a small fraction of protein was able to form α -helices. Additionally, CD spectra of the protein in the presence of liposomes showed it had a very low intrinsic ability to interact with phospholipids (Soulages et al., 2003). However, it is still possible that under certain conditions promoted by dehydration, such as high ionic content or high solute concentration, the GmDHN1 protein could assume a higher proportion of ordered structure, which may play a physiological role in the plant response to water deficit.

Like group 1 LEA proteins, several studies of specific group 2 LEA proteins have confirmed that they accumulate during seed desiccation and in response to water deficit induced by drought, low temperature, or salinity (Ismail et al., 1999a; Nylander et al., 2001). These proteins are also present in nearly all vegetative tissues during optimal growth conditions (Rorat et al., 2004). A role in bud dormancy has also been attributed to group 2 LEA proteins (Muthalif and Rowland, 1994; Levi et al., 1999; Karlson et al., 2003a, 2003b). The ability to withstand freezing is highly developed in some trees, in which the buds, which are critical for reassuming growth after winter, can build up tolerance to temperatures as low as -196°C (Guy et al., 1986). Therefore, of particular interest is the fact that LEA proteins from this group are expressed in birch (*Betula* spp.) apices during wintertime dehydration, a period in which buds become highly desiccated during endodormancy (Rinne et al., 1998, 1999; Puhakainen et al., 2004b). Similarly, the accumulation of chilling-responsive LEA proteins from

this group was detected in floral buds of blueberry (*Vaccinium myrtillus*), a woody perennial (Muthalif and Rowland, 1994; Arora et al., 1997).

The data in the literature, obtained from different species, indicated that different types of group 2 LEA proteins can localize to common tissues (in root tips, root vascular system, stems, leaves, and flowers) during development under optimal growth conditions, while other proteins of this group seem to accumulate in specific cell types (e.g. root meristematic cells, plasmodesmata, pollen sacs, or guard cells; Nylander et al., 2001; Karlson et al., 2003a). Most of these proteins accumulate in all tissues upon water deficit imposed by drought, low temperature, or salinity, although there are those that preferentially respond to particular stress conditions: some dehydrins are strongly accumulated in response to low-temperature treatments but not to drought or salinity (Rorat et al., 2006). Other group 2 members are detected under normal growth conditions but not in response to low temperatures, while a small number of dehydrins show an unusual constitutive expression (Gilmour et al., 1992; Houde et al., 1992; Danyluk et al., 1994; Rorat et al., 2004; Sánchez-Ballesta et al., 2004). Because of the observed accumulation upon cold stress, some of the proteins in this group and some proteins in group 3 were originally designated as COR (for COLD RESPONSIVE) proteins (Lin et al., 1990; Gilmour et al., 1992; Guo et al., 1992). However, as limited information is available for proteins of the different subgroups, it is not possible to assign confidently specific accumulation patterns to particular groups or subgroups of these proteins. A similar situation is found when studying their regulation by ABA. Consistent with the fact that the ABA-responsive element was first described for a group 2 LEA gene from rice (*Oryza sativa*; Mundy and Chua, 1988), there are genes for this group of proteins whose expression during seed development or in response to stress is mediated by ABA (Nylander et al., 2001). However, some others are not responsive to ABA or are regulated by ABA during development but not in response to stress (Stanca et al., 1996; Giordani et al., 1999). Moreover, there are examples of dual regulation; that is, their response to stress is mediated by more than one pathway, one of which may be ABA dependent (Welling et al., 2004).

Effort has been made to determine the subcellular localization for some of these proteins. The majority of group 2 LEA proteins accumulate in the cytoplasm, and some of them are also localized to the nucleus. For nucleus-directed SK2 proteins, the phosphorylated S-segment and the RRKK sequence have been postulated as nuclear localization signals (Plana et al., 1991). However, for some proteins of this group, nuclear localization seems to be independent of the phosphorylation state of the S-segment, and even more, proteins lacking the S-segment or RRKK motif have been localized to the nucleus (Riera et al., 2004). Such complexity suggests that the transport of different

types of dehydrins to the nucleus occurs via different nuclear localization pathways.

Some dehydrins are also found in other cell compartments, including the vicinity of the plasma membrane, mitochondria, vacuole, and endoplasmic reticulum (Houde et al., 1995; Egerton-Warburton et al., 1997; Danyluk et al., 1998; Borovskii et al., 2000, 2002; Heyen et al., 2002). Hence, the subcellular localization attributed to a particular protein of this group does not seem to be a general characteristic for the different group 2 LEA proteins, and care should be taken in considering membranes as a common location for these proteins.

For some proteins of this group, an ion-binding activity has been demonstrated. Various dehydrins from *Arabidopsis* can be efficiently purified by immobilized metal ion affinity chromatography; in particular, they bind Cu^{2+} and Ni^{2+} ions (Svensson et al., 2000). Since no metal-binding motif is found in group 2 LEA proteins, this ability seems to be due to their high content of His residues, some of which are disposed as His-His pairs with a strong metal-binding affinity. For example, a citrus (*Citrus unshiu*) dehydrin binds Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} through a specific sequence (HKGEHHSGDHH) rich in His residues (Hara et al., 2005). Moreover, acidic dehydrins such as a vacuole-associated dehydrin from celery (*Apium graveolens*; VCaB45) and *Arabidopsis* ERD14 possess calcium-binding properties, which seem to be positively modulated by phosphorylation (Heyen et al., 2002; Alsheikh et al., 2003, 2005). These findings suggest ion binding as one of the major biochemical functions of the acidic dehydrins, acting as calcium buffers or as calcium-dependent chaperone-like molecules (Alsheikh et al., 2003). Alternatively, metal binding may be related to a detoxification function needed under stress conditions, where metal toxicity is associated with the production of reactive oxygen species, commonly generated in plants exposed to water limitation (Hara et al., 2004). Thus, these proteins could act as scavengers of radicals under oxidative stress. The modulation of changes in dehydrin conformation leading to the recognition of a particular set of targets by ion binding should also be considered.

Most of the attempts to elucidate the function of these proteins have been focused on the *in vitro* characterization of their biochemical properties. Several proteins of this group show cryoprotective activity, which is enhanced in the presence of compatible solutes (Bravo et al., 2003; Reyes et al., 2005). Also, there is evidence indicating that dehydrins from *Arabidopsis*, *Craterostigma*, and *Citrus* (Hara et al., 2001; Reyes et al., 2005) prevent the inactivation of enzymes induced by partial dehydration *in vitro*. It is predicted that the K-segments may form amphipathic α -helices similar in structure to the lipid-binding class A2 amphipathic α -helical region found in apolipoproteins and α -synucleins associated with membranes (Segrest et al., 1992; Davidson et al., 1998). This obser-

vation raised the hypothesis that one of the roles of the group 2 LEA proteins may be related to an interaction with hydrophobic surfaces present in membranes and/or partially denatured proteins. While maize (*Zea mays*) DHN1 dehydrin is able to bind *in vitro* to lipid vesicles containing acidic phospholipids, there is no direct evidence for membrane binding through lipid-protein interactions in solution, nor for such a function in planta (Koag et al., 2003). Moreover, the prevalence of extended PII helical and unordered conformations in dehydrins is consistent with a role in providing or maintaining enough water molecules in the cellular microenvironment to preserve the functionality or stability of macromolecules or cellular structures during water scarcity conditions.

In most cases, the contribution of dehydrins to stress tolerance has been limited to the phenotypical analysis in plants and yeast, in which some of these proteins were overexpressed. For instance, overexpression of multiple *Arabidopsis* group 2 LEA proteins, ERD10, RAB18, COR47, and LTI30, resulted in plants with increased freezing tolerance and improved survival under low-temperature conditions (Puhakainen et al., 2004a). Also, ectopic expression of wheat *DHN-5* in *Arabidopsis* plants improved their tolerance to high salinity and water deprivation (Brini et al., 2007). A role in stress tolerance for dehydrins is also supported by the cosegregation of a dehydrin gene with chilling tolerance during seedling emergence in cowpea (Ismail et al., 1999a). More recently, the mutation of a dehydrin gene from the moss *P. patens* resulted in a plant severely impaired in its capacity to resume growth after salt and osmotic stress, strongly suggesting its contribution to stress tolerance (Saavedra et al., 2006).

GROUP 3 (D-7/D-29)

Group 3 LEA proteins are characterized by a repeating motif of 11 amino acids (Dure, 1993a). Differences found in the molecular mass in this group of proteins are usually a consequence of the number of repetitions of this 11-mer motif. Additionally, we have found other conserved regions (motifs 1, 2, and 4 in subgroup D-7, and motif 5 in subgroup D-29; Table II), which may or not be repeated and whose sequences are completely different from the 11-mer (Table II). In comparison with other groups of LEA proteins, the group 3 members are quite diverse. This diversity is a consequence of changes introduced in the repeating 11-mer amino acid motif, first noticed by Dure (1993a), as well as of changes in the sequences of the other motifs. A more detailed analysis of numerous proteins (65) from different plant species confirmed the consensus sequence for the 11-mer proposed by Dure (1993a; Supplemental Table S3), as follows: hydrophobic residues (F) in positions 1, 2, 5, and 9; negative or amide residues (E, D, Q) in positions 3, 7, and 11; positive residues (K) in positions 6 and 8; and a

random assortment (X) in positions 4 and 10 (FF[E/Q]XFK[E/Q]KFX[E/D/Q]). Hence, in support of the suggestion by Dure (2001), the variability in the 11-mer motif leads to a subclassification of the group 3 LEA proteins into two subgroups: 3A, represented by the cotton D-7 LEA protein; and 3B, represented by the cotton D-29 LEA protein (Fig. 3; Supplemental Table S3). The first subgroup is highly conserved; two of the motifs characteristic of these proteins (motifs 3 and 5) correspond to almost the same 11-mer described originally for this subgroup, with some variation at positions 9 and 10 (TAQ[A/S]AK[D/E]KT[S/Q]E; Table II). At the N-terminal portion of 3A proteins, we found motif 4 (SYKAGETKGRKT), and at the C-terminal portion, we found motifs 1 and 2 (GGVLQQTGEQV and AADAVKHTLGM; Table II). The other subgroup (3B) is more heterogeneous; four variations of the 11-mer were found (motifs 1–4), but the variability was restricted to the consensus sequence described above. Yet, motif 5 is highly conserved and is unique to this subgroup (Table II).

In silico predictions of the secondary structure of some group 3 proteins suggest that the 11-mer exists principally as amphipathic α -helices, which may dimerize in an unusual right-handed coiled-coil arrangement, with a periodicity defined by the 11-mer motif (Dure, 1993a). This hypothetical structure was later found in a surface layer tetrabrachion protein from *Staphylothermus marinus* (Peters et al., 1996; Stetefeld et al., 2000). CD analysis and IR spectroscopy of various group 3 LEA proteins indicated that they are mostly devoid of secondary structure, being largely in a random coil conformation in solution. However, in the presence of Suc, glycerol, ethylene glycol, or methanol, or after fast drying, they adopt an α -helical conformation (Dure, 2001; Wolkers et al., 2001; Goyal et al., 2003; Tolleter et al., 2007). The presence of TFE or SDS also promotes helical folding of these proteins. A slow-drying treatment led to the formation of α -helical and intermolecular extended β -sheet structures; thus, the structures of these proteins in the final dry state might depend on the drying rate (Wolkers et al., 2001). The fact that rehydration of the dried protein samples leads to the reformation of random coil structures indicates that these structural transitions are fully reversible (Tolleter et al., 2007). Soluble nonreducing sugars seem to contribute to the formation of a cytoplasmic “glass” at low water content in both mature seeds and pollen cells, which could stabilize cellular structures during this severe desiccation (Wolkers et al., 2001). As plants coaccumulate sugars and LEA proteins at the onset of desiccation, it is possible that sugars could be affecting the molecular structure of LEA proteins in the sugar glass. When D-7, a group 3 LEA protein from pollen, is dried in the presence of Suc, the protein adopts an α -helical conformation irrespective of drying rate (Wolkers et al., 2001). Structural modeling suggested that in the α -helical conformation, these proteins may form an amphipathic structure, which closely resembles that of

the class A amphipathic helices involved in the membrane association found in different plasma apolipoproteins (Woods et al., 2007). This structural similarity may imply that some of the group 3 LEA proteins interact with membranes during dehydration. In support of this hypothesis, a pea (*Pisum sativum*) mitochondrial group 3 LEA protein (PsLEAm) was found to interact with and protect liposomes subjected to drying (Tolleter et al., 2007).

The group 3 LEA proteins are widely distributed in the plant kingdom. Their transcripts have been detected in algae (Joh et al., 1995), in nonvascular plants (Hellwege et al., 1996), in seedless vascular plants (Salmi et al., 2005), and in all seed plants in which they have been looked for.

Interestingly, proteins similar to plant group 3 LEA proteins accumulate in several nonplant organisms in response to dehydration. Examples of these are proteins from the prokaryotes *Deinococcus radiodurans* (Battista et al., 2001) and *Haemophilus influenzae* (Dure, 2001) as well as a protein from *Caenorhabditis elegans* (CeLEA-1), whose expression is correlated with the survival of this nematode under conditions of desiccation, osmotic, and heat stress (Gal et al., 2004). Interestingly, anhydrobiotic organisms such as the nematodes *Steinernema feltiae* (Solomon et al., 2000) and *Aphelenchus avenae* (Browne et al., 2004), as well as the bdelloid rotifer *Philodina rosola* (Tunnacliffe et al., 2005), the chironomid *Polypedilum vanderplanki* (Kikawada et al., 2006), and the eucoelomate crustacean *A. franciscana* (Hand et al., 2007; Wang et al., 2007), also accumulate these proteins in their desiccated states. *A. franciscana* is the most complex metazoan in which group 3 LEA-like proteins have been detected. Outside the plant kingdom, the best characterized group 3 protein is AavLEA1 from *A. avenae*, which showed an unstructured conformation in solution with a high degree of hydration and low compactness; yet, upon dehydration, a remarkable but reversible increase in α -helical structure was observed (Goyal et al., 2003).

Expression analysis of plant proteins in this group, as well as information available from transcriptomic projects, shows their accumulation in mature seeds and in response to dehydration, salinity, or low temperatures (Harada et al., 1989; Cattivelli and Bartels, 1990; Hsing et al., 1995; Romo et al., 2001). Some members also respond to hypoxia (Siddiqui et al., 1998) or to high-excitation pressure imposed by high light (NDong et al., 2002). As for LEA proteins from other groups, the expression of group 3 LEA proteins appears to be regulated by ABA during specific developmental stages and/or upon stress conditions (Piatkowski et al., 1990; Curry et al., 1991; Curry and Walker-Simmons, 1993; Dehaye et al., 1997; Dong and Dunstan, 1997).

The diversity of proteins in this group could suggest variety in their intracellular localization and possibly in their targets, with specific members selected to carry out their function in particular cellular compartments.

In plant embryos, these proteins are uniformly distributed in the cytosol of all cell types. Group 3 D-7 LEA protein from cotton accumulates to a concentration of about 200 μM in mature cotton embryos (Roberts et al., 1993). Studies of seeds have localized group 3 LEA proteins to the cytoplasm and protein storage vacuoles, as is the case for HVA1 from barley (*Hordeum vulgare*; Marttila et al., 1996), whereas PsLEAm is distributed within the mitochondrial matrix of pea seeds (Grelet et al., 2005). Group 3 proteins are also detected in vegetative tissues. WAP27A and WAP27B are abundantly accumulated in endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells of the mulberry tree (*Morus bombycis*) during winter (Ukaji et al., 2001); and WCS19 accumulates specifically in wheat leaves and rye (*Secale cereale*) during cold acclimation, where it was localized within the chloroplast stroma (NDong et al., 2002).

The different approaches followed to elucidate the function of group 3 proteins indicate that they also contribute to counteract the damage produced by water limitation. One of their roles in anhydrobiotic organisms might be to contribute to the formation of a tight hydrogen-bonding network in the dehydrating cytoplasm, together with sugars to promote a long-term stability of sugar glasses during anhydrobiosis. This hypothesis is supported by the observation that a dehydrated mixture of Suc and LEA protein (D-7 from pollen) shows both a higher glass transition temperature and increased average strength of hydrogen bonding than dehydrated Suc alone (Wolkers et al., 2001).

The high correlation found between the accumulation of group 3 LEA proteins or their transcripts and the onset of stress, induced by low temperatures (cold and freezing), dehydration, or salinity, prompted their consideration as essential factors of the adaptation process to this type of environmental insult. This hypothesis was strengthened by several observations of the expression of these proteins in different plant species. In wheat, roots lacking group 3 LEA proteins were unable to resume growth and died upon dehydration and subsequent rehydration, in contrast to shoot and scutellar tissues, which accumulated high levels of these proteins and survived the treatment (Ried and Walker-Simmons, 1993). In *indica* rice varieties, group 3 LEA protein levels were significantly higher in roots from salt-tolerant compared with salt-sensitive varieties (Moons et al., 1995). Also, the accumulation of the chloroplastic group 3 LEA-L2 protein was directly correlated with the capacity of different wheat and rye cultivars to develop freezing tolerance (NDong et al., 2002). Gain-of-function experiments in different plant species further reinforce their role in the adaptation to stress conditions. The constitutive expression of the wheat group 3 LEA-L2 protein in *Arabidopsis* resulted in a significant increase in the freezing tolerance of cold-acclimated plants (NDong et al., 2002). Expression of the barley *HVA1* gene regulated by the *ACTIN1* gene promoter, leading to

high-level constitutive accumulation of the *HVA1* protein in both leaves and roots of transgenic rice plants, conferred tolerance to water deficit and salt stress (Xu et al., 1996). Comparable results were obtained when the same gene was constitutively expressed in transgenic wheat, rice, creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* var. *palustris*), and mulberry (Sivamani et al., 2000; Chandra Babu et al., 2004; Fu et al., 2007; Lal et al., 2008). The overexpression of the soybean PM2 protein in transgenic bacteria, and of wheat TaLEA3 and barley *HVA1* proteins in yeast, also resulted in the generation of salt- and freezing-tolerant organisms (Zhang et al., 2000; Yu et al., 2005).

The direct contribution of these proteins to adaptation to water-limiting environments has been addressed through loss-of-function experiments in bacteria and nematodes. Mutants lacking group 3 LEA-like proteins from *D. radiodurans*, a bacterium highly tolerant to ionizing radiation and desiccation, showed sensitivity to dehydration. Similarly, *C. elegans* containing an interrupted group 3 LEA-like gene was susceptible to desiccation (Battista et al., 2001; Gal et al., 2004).

Employing in vitro assays to explore a protective role of enzymatic activities under dehydration conditions showed that group 3 LEA proteins from *Arabidopsis* (AtLEA76 and COR15am; Reyes et al., 2005; Nakayama et al., 2007), pea (PsLEAm; Grelet et al., 2005), and *A. avenae* (AavLEA1; Goyal et al., 2005) are effective in protecting enzymes such as LDH, malate dehydrogenase, citrate synthase, fumarase, and rhodanese against partial dehydration. Likewise, freeze-thaw assays in the presence of group 3 LEA proteins from the green alga *Chlorella vulgaris* (HIC6; Honjoh et al., 2000) and of group 3 LEA-like protein from the anhydrobiotic nematode *A. avenae* (AavLEA1; Goyal et al., 2005) showed that these types of LEA proteins are capable of preventing enzyme inactivation when enzymes such as LDH are used. Recent in vitro experiments suggested that the nematode group 3 LEA-like protein is able to prevent the aggregation induced by severe desiccation of water-soluble proteins from nematodes and mammalian cells (Chakrabortee et al., 2007). In addition to supporting a role as protector molecules under water limitation, these results indicate that LEA proteins may function to provide a water-rich environment to their target enzymes, preventing their inactivation by possibly maintaining protein integrity as long as water is restrictive.

GROUP 4 (D-113)

Group 4 LEA proteins are of widespread occurrence in the plant kingdom, including nonvascular plants (bryophytes) and vascular plants (gymnosperms and angiosperms). As predicted by Dure's classification, the proteins of this family are conserved in their N-terminal portion, which is about 70 to 80 residues long and is predicted to form amphipathic α -helices,

while the less conserved C-terminal portion is variable in size (Dure, 1993b).

A motif that has characterized the proteins in this group is motif 1, located at the N-terminal region with the following consensus sequence: AQEKA EKMTA [R/H]DPXKEMAH ERK[E/K][A/E][K/R] (Table II). However, four additional motifs can be distinguished in many group 4 LEA proteins. The presence or absence of motif 4 or 5 defines two subgroups within the family (Fig. 3). The first subgroup (group 4A) consists of small proteins (80–124 residues long) with motifs 2 and/or 3 flanking motif 1. The other subgroup (group 4B) has longer representatives (108–180 residues) that, in addition to the three motifs in the N-terminal portion, may contain motifs 4 and/or 5 at the C-terminal region (Supplemental Table S4). D-113 protein from cotton, the first discovered of this group, belongs to group 4B.

In silico analysis for group 4 LEA proteins predicts that the first 70 to 80 residues could adopt an α -helix structure, whereas the rest of the protein assumes a random coil conformation (Kyte and Doolittle, 1982). Spectroscopic analysis of a soybean group 4 LEA protein (GmPM16) partially confirmed these predictions. In aqueous solution, this protein is mainly disordered, although some helical structures were detected (Shih et al., 2004). Interestingly, in the presence of compounds able to induce ordered structures, such as 1% SDS, 50% TFE, or in the dry state, this protein adopts an almost 90% α -helix conformation. Most notably, these conformational changes are reversible. Similar to group 3 LEA proteins, the GmPM16 protein interacts with Suc and raffinose and increases the glass transition temperature of the sugar-protein matrix, which leads to the suggestion that a common role for group 3 and group 4 LEA proteins is related to the formation of tight glass matrices in dry seeds (Shih et al., 2004).

The proteins of this group were originally found highly accumulated in dry embryos. One of these, cotton D-113 protein, was found homogeneously distributed in all embryo tissues at a concentration of nearly 300 μ M (Roberts et al., 1993). Later, similar proteins were found to accumulate in vegetative tissues in response to water deficit. In tomato (*Solanum lycopersicum*) plants, group 4 LEA transcripts (LE25) accumulated in leaves in response to water deficit and ABA (Cohen et al., 1991). In Arabidopsis vegetative tissues, the transcripts of the group 4 LEA proteins also accumulated in response to water-deficit treatments (Y. Olvera-Carrillo, unpublished data). As for the LEA proteins in the other groups, scarce information exists regarding the distribution of group 4 LEA proteins in different plant tissues. Soybean GmPM16 transcripts accumulated in mesophyll cells of cotyledons and in small amounts in the hypocotyl-radicle axis tissues (Shih et al., 2004). In wheat, quantitative reverse transcription-PCR from developing seeds showed high accumulation of group 4 LEA transcripts in coleorhizae, whereas in developing seeds under abi-

otic stress, they accumulated in coleoptiles (Ali-Benali et al., 2005). More general information can be extracted from data available from ESTs obtained from Arabidopsis cDNA libraries of dry seeds, in which all group 4 LEA members are among the most abundantly accumulated transcripts in the dry seed stage (Delseny et al., 2001). In addition, scrutiny of the publicly available EST data banks indicates that group 4 LEA homologues in many plant species accumulate under drought in shoot meristems and in developing and dry seeds.

Although genes in this group respond to ABA (Zimmermann et al., 2004), the ability of this phytohormone to control group 4 LEA protein expression during development or in response to stress conditions remains undefined. One of the few examples in which the participation of ABA in the regulation of group 4 LEA gene expression was shown is the *PAP51* gene (the Arabidopsis homolog of cotton D-113), which during seed development is repressed in the *lec1-1* mutant, is not affected in the *abi3-4* mutant, but is up-regulated in the *abi5-5* background (Delseny et al., 2001). *GUS* expression driven by the *LEA D-113* promoter in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) seedlings showed that this gene responds to ABA, dehydration, and high salinity in vegetative tissues and further confirms its specific expression at the late stage of seed development (Luo et al., 2008). Gene expression analysis during germination suggests that the decrease in the transcript levels for some group 4 LEA genes is partially due to their repression associated with histone deacetylation (Tai et al., 2005).

As for other LEA proteins, in vitro studies using one member of the Arabidopsis group 4 LEA protein family (D-113 homolog) showed that its presence during controlled dehydration experiments prevented the inactivation of LDH, even after 99% water loss (Reyes et al., 2005), suggesting a protective role during dehydration. This possibility is supported by a functional analysis of the Arabidopsis group 4 LEA protein family using overexpression and loss-of-function approaches, which indicate that these proteins contribute to the plant's ability to cope with water deficit (Y. Olvera-Carrillo, unpublished data). Similarly, the transient silencing of a peanut (*Arachis hypogaea*) group 4 LEA gene in tomato plants appeared to result in a lower tolerance to drought (Senthil-Kumar and Udayakumar, 2006).

GROUP 5 (HYDROPHOBIC OR ATYPICAL LEA PROTEINS)

To avoid further confusion, we have kept group 5 for those LEA proteins that contain a significantly higher proportion of hydrophobic residues. Because this work is focused on the hydrophilic LEA proteins, this section does not represent an extensive review of the available information on this group of proteins. All LEA proteins with a higher content of hydrophobic

residues than typical LEA proteins are included in this group (Fig. 1); thus, this group incorporates non-homologous proteins. For further classification, we suggest the designation of subgroups according to their sequence similarity. Because the first proteins described for this group were D-34, D-73, and D-95 (Baker et al., 1988; Cuming, 1999), we assigned them to subgroups 5A, 5B, and 5C, respectively (Table I). Given their physicochemical properties, these proteins are not soluble after boiling, suggesting that they adopt a globular conformation (Baker et al., 1988; Galau et al., 1993; Cuming, 1999). Further experimental data from some of the proteins in this group confirmed this prediction (Singh et al., 2005). Although little is known about this set of proteins, the available data indicate that their transcripts accumulate during the late stage of seed development and in response to stress conditions, such as drought, UV light, salinity, cold, and wounding (Kiyosue et al., 1992; Maitra and Cushman, 1994; Zegzouti et al., 1997; Stacy et al., 1999; Park et al., 2003; Kim et al., 2005).

GROUP 6 (PVLEA18)

PvLEA18 protein from bean (*Phaseolus vulgaris*) was the first protein described from this group (Colmenero-Flores et al., 1997). To date, 36 members of this family have been identified from different species of vascular plants (Supplemental Table S5). The proteins in this group are characterized by their small size (approximately 7–14 kD) and high conservation. Four motifs distinguish this group, two of which (motifs 1 and 2) are highly conserved (Table II). Noteworthy, the sequence LEDYK present in motif 1 and the Pro and Thr residues located in positions 6 and 7, respectively, in motif 2 show 100% conservation (Table II; Fig. 3). In general, these proteins are highly hydrophilic, lack Cys and Trp residues, and do not coagulate upon exposure to high temperature. Typically, during SDS-PAGE, they migrate at a higher molecular mass than the one predicted from their deduced amino acid sequences. Their physicochemical characteristics and in silico analyses predict that group 6 LEA proteins are intrinsically unstructured (Garay-Arroyo et al., 2000).

Expression studies in plants are exemplified by work carried out on PvLEA18. The PvLEA18 transcript and protein levels are highly accumulated in dry seeds and pollen grains and also respond to water deficit and ABA treatments. Under normal growth conditions, the expression of this gene is also regulated during development (Colmenero-Flores et al., 1999). For example, high protein and transcript accumulation was detected in the expansion zone of bean seedling hypocotyls, which show lower water potentials than those from nongrowing regions. They also accumulate in meristematic regions, such as the apical meristem and root primordia, as well as in the vascular cylinder and within epidermal tissue.

The high accumulation of PvLEA18 in the embryo radicle during the early stages of germination suggested a protective role during this process. Immunolocalization experiments indicated that the PvLEA18 protein is present in the cytosol and nuclei of different cell types in vegetative tissues (Colmenero-Flores et al., 1999).

Analysis of Arabidopsis transgenic lines harboring the *PvLEA18* promoter fused to the *GUS* reporter gene, either with the 3' untranslated region (UTR) from *PvLEA18* or with the *NOS* 3' UTR, showed that the expression pattern of the chimeric gene is similar to that of the endogenous gene in bean upon water deficit and ABA treatment and during development. The *PvLEA18* 3' UTR is responsible for most of the *GUS* activity induction under water deficit but not in response to ABA treatments (Moreno-Fonseca and Covarrubias, 2001). Further analysis indicates that the *PvLEA18* 3' UTR participates in the regulation of PvLEA18 protein expression at the translational level, allowing for preferential polysome loading of the *GUS* reporter transcript under water deficit (M. Battaglia and A.A. Covarrubias, unpublished data). These results suggest that this region and some mRNA binding proteins are important for a selective translational enhancement of the PvLEA18 mRNA to enable an efficient response to this stress condition.

While there is no direct information regarding the possible function of the proteins in this group, results obtained from in vitro dehydration assays indicated that PvLEA18, in contrast to LEA proteins from other groups (2, 3, and 4), was unable to prevent dehydration inactivation of reporter enzymes (Reyes et al., 2005). This result suggests that the molecular targets of these proteins are different from those of other LEA proteins, and it indicates that their hydrophilicity is not the only characteristic relevant for their protective function under water-limiting environments.

GROUP 7 (ASR1)

The ASR proteins, considered to be members of the hydrophilins, are small, heat stable, and intrinsically unstructured (Silhavy et al., 1995; Frankel et al., 2006; Goldgur et al., 2007). They not only share physicochemical properties with other LEA proteins, but like all proteins of this type, they accumulate in seeds during late embryogenesis and in response to water-limiting conditions (Maskin et al., 2008). Several ASR genes have been identified from various species of dicotyledonous and monocotyledonous plants (Silhavy et al., 1995; Rossi et al., 1996; Wang et al., 1998; Vaidyanathan et al., 1999) as well as from gymnosperm species like *Pinus taeda* (Padmanabhan et al., 1997) and *Ginkgo biloba* (Shen et al., 2005; Supplemental Table S6). However, no ASR-like genes are found in Arabidopsis. All known ASR proteins contain three highly conserved regions (motifs 1, 2, and 3; Fig. 3). One of these motifs (motif 3) is located within the C-terminal region and

contains a putative nuclear localization signal (Silhavy et al., 1995; Wang et al., 2003, 2005). The other three motifs (1, 2, and 5) contain stretches of His residues. Motif 5 has only been found in the N terminus of the ASR1 protein (Fig. 3). The sequence-specific Zn²⁺-dependent DNA-binding activity shown for motif 5 suggests that the His-rich regions in this motif and in motifs 1 and 2 may contribute to this activity (Kalifa et al., 2004a; Goldgur et al., 2007). An additional conserved region (motif 4) has been detected at the C terminus of many proteins in this group, and like motifs 1, 2, and 5, it shows long His stretches (eight to 12; Table II; Fig. 3). Subcellular fractionation experiments using tomato fruit chromatin fractions indicated that tomato ASR1 is located within the nucleus; however, it has also been detected in the cytoplasm (Kalifa et al., 2004a). ASR gene expression pattern varies between different plant species. Transcripts for these genes accumulate during senescence, fruit ripening, and/or seed and pollen maturation. They also respond to environmental stress conditions, such as water deficit, salt, cold, and limited light (Silhavy et al., 1995; Padmanabhan et al., 1997; Doczi et al., 2005). There is also evidence of regulation by sugar, although for some of them this has not been confirmed (Carrari et al., 2004), and, as suggested by their name, gene expression can be induced by ABA (Wang et al., 1998; Vaidyanathan et al., 1999; Cakir et al., 2003). However, the drought response of the potato (*Solanum tuberosum*) ortholog ASR gene (*DS2*) is primarily ABA independent (Silhavy et al., 1995; Doczi et al., 2005).

The organ or tissue specificity of the group 7 LEA proteins is also diverse. Their transcripts have been detected in fruits of tomato, melon (*Cucumis melo*), pomelo (*Citrus maxima*), apricot (*Prunus armeniaca*), and grape (*Vitis vinifera*; Iusem et al., 1993; Canel et al., 1995; Mbeguie-A-Mbeguie et al., 1997; Hong et al., 2002; Cakir et al., 2003), in potato tubers (Frankel et al., 2007), in roots of rice (Yang et al., 2004), in leaves or stems of tomato, rice, and maize (Amitai-Zeigerson et al., 1994; Riccardi et al., 1998, 2004; Vaidyanathan et al., 1999; Maskin et al., 2008), in pollen of lily (*Lilium longiflorum*; Wang et al., 1998), and in developing tomato seeds (Maskin et al., 2008).

Overexpression of tomato ASR1 protein in tobacco plants resulted in increased salt tolerance (Kalifa et al., 2004b). Increased drought and salt tolerance were obtained when the lily ortholog was overexpressed in *Arabidopsis* (Yang et al., 2005). Maize ASR1 was proposed as a candidate gene for the quantitative trait locus for drought stress response (Jeanneau et al., 2002).

As is the case for other LEA proteins, biochemical and biophysical analysis showed that tomato ASR1 protein is disordered in aqueous solutions; however, upon binding to zinc ions, a transition from a disordered to an ordered state is induced. This transition in protein conformation can also be induced by desiccation (Goldgur et al., 2007).

OTHER HYDROPHILINS

Some years ago, we set out to investigate how widespread were proteins that shared the physicochemical characteristics of typical plant LEA proteins. We searched databases for proteins that exhibited high hydrophilicity and a high content of Gly residues. In spite of the deceptively loose definition, hydrophilins represent less than 0.2% of the total protein of a given genome. Not only were these structural features present in plant LEA proteins, but they were shared by proteins from very diverse organisms (Garay-Arroyo et al., 2000). In spite of their common characteristics, proteins in different groups do not show an evident sequence similarity, suggesting that they do not have a common ancestor. Accordingly, our data suggest that these physicochemical characteristics have evolved independently in different protein families and in different organisms, but with the similar goal of protecting specific functions under partial dehydration. It is noteworthy that all hydrophilins from different phyla show higher expression under water-limiting conditions, imposed either by the environment or by developmental programs. This is not only the case for LEA and non-LEA hydrophilins from plants but also for hydrophilins expressed in bacterial and fungal spores or conidia (Garay-Arroyo et al., 2000) or for others that accumulate under dehydration in anhydrobiotic organisms (Tunnacliffe et al., 2005).

Although the definition for hydrophilins appears simple, it is remarkable that 92% (348 of 378) of the different typical LEA proteins described to date can be considered hydrophilins (Fig. 1), and those whose expression patterns have been characterized are responsive to conditions of low water availability.

The accumulated data from in vitro assays strongly suggest that hydrophilins are able to prevent enzyme inactivation under partial dehydration (Lin and Thomashow, 1992; Goyal et al., 2005; Grelet et al., 2005; Reyes et al., 2005). These results showed that a gradual decrease in water availability, to similar levels as those detected in plant tissues subjected to drought, leads to conformational changes in the enzymes that are associated with inactivation. These inhibitory conformational changes do not occur when hydrophilins are present before the dehydration treatment. However, when severe water limitation (greater than -50 bars) is imposed and protein aggregation is evident, hydrophilins have no protective effects, at least in target:hydrophilin ratios in which molecular chaperones are active (1:1–1:5; Reyes et al., 2005). Despite the in vitro nature of these assays, they attempt to mimic some of the characteristics of the water-loss process in plant tissues, such as the gradual decrease in water availability as well as the avoidance of total dehydration. This is considering that these proteins accumulate in response to mild water limitation. However, the possibility that at least a subset of these proteins play a protective role under fast and severe dehydration cannot be discounted. Evidence suggesting this comes

from in vitro experiments in which a group 1 LEA protein from wheat or a protein from an anhydrobiotic nematode (*A. avenae*), similar to group 3 LEA proteins, apparently prevented protein aggregation induced by these extreme dehydration conditions when they were used in a target:LEA ratio of 1:10 up to 1:100 (Goyal et al., 2005; Chakrabortee et al., 2007).

Although the conditions established in these in vitro experiments may be far from those prevalent in the cell, it is evident that hydrophilins possess a protective activity that mitigates the effects that water limitation conditions exert on protein conformation and function. That they carry out their protective activity in the absence of an energy source discounts the possibility that hydrophilins act as typical molecular chaperones (Goyal et al., 2005; Reyes et al., 2005). Indeed, hydrophilins are unable to protect proteins from heat shock, and they cannot recover the activity of proteins once this is lost during the dehydration process. On the other hand, there are data indicating that molecular chaperones are unable to prevent the inactivation of enzymes due to dehydration, which suggests that hydrophilins alone may be necessary to maintain protein function during this specific type of abiotic stress (Reyes et al., 2005). It is even possible that some hydrophilins may target molecular chaperones, and in combination, they could contribute to protect proteins under conditions in which dehydration is severe enough to produce protein denaturation. Indirect evidence to support such a hypothesis shows that the transcripts of different molecular chaperones are, like those of hydrophilins, accumulated in response to water limitation in different organisms (Ingram and Bartels, 1996; Bray, 1997; Bartels and Souer, 2003; Wang et al., 2004).

If we consider the high hydrophilicity and the unordered structure of hydrophilins and the fact that they can be grouped by the presence of specific conserved motifs, it is likely that their function is closely related to the high avidity for water of their amino acid residues and to the recognition of different macromolecular targets. They provide a hydrophilic surrounding to substitute for the decrease in water molecules within the microenvironment of particular macromolecules or cellular structures during water-limiting conditions, consequently preserving their integrity and function. The conserved motifs that characterize each group might be responsible for the recognition of a particular set of target molecules. Because of the unstructured nature of hydrophilins in aqueous solution and their presumed ability to attain an ordered structure specifically under conditions of water limitation (Wolkers et al., 2001; Shih et al., 2004; Goyal et al., 2005; Tolleter et al., 2007), it is plausible that hydrophilins recognize their target molecules mostly under stress situations. An additional possibility could be that some hydrophilins provide a regulatory function directed toward particular enzymes or protein complexes under low water availability. One example of this is Rmf, an *E. coli* hydrophilin proposed to be

involved in the modulation of the translation process during stress conditions. Specifically, Rmf was identified as a ribosome modulation factor, which associates with 100S ribosome dimers (Yamagishi et al., 1993) and accumulates upon hyperosmotic stress (Garay-Arroyo et al., 2000). Similarly, STF2, a yeast hydrophilin, seems to participate in the stabilization of the complex formed between F_1F_0 -ATPase and a protein that inhibits the activity of this enzyme upon the cessation of phosphorylation (Yoshida et al., 1990). The fact that hydrophilins show a protective effect under in vitro partial dehydration even at a target:hydrophilin ratio of 1:1 is compatible with previous ideas considering intrinsically unstructured proteins as specialized molecules to function through protein-protein interactions (Mészáros et al., 2007; Hegyi and Tompa, 2008). Although other LEA proteins have been tested for protection of enzyme activity upon heat stress (Goyal et al., 2005; Reyes et al., 2005; J.M. Colmenero-Flores, unpublished data), recent results from in vitro experiments indicate that two group 2 LEA proteins from *Arabidopsis* (ERD10 and ERD14) are able to prevent the heat-induced aggregation and/or inactivation of various substrates (Kovacs et al., 2008).

The intrinsic flexible nature of hydrophilins that allows them to adjust their conformation to a particular microenvironment leads to the hypothesis that different water availability levels induce different conformations in the same protein, which results in the exposure of particular motifs important for the recognition of and/or interaction with specific target molecules to preserve their function and/or promote their assembly with partners. This metamorphosis, while an appealing property, imposes new challenges in the design of experiments to identify biological targets of hydrophilins and to elucidate the mechanism of their function, particularly when most existing methodologies have been developed for structured proteins. For now, a considerable amount of work, persistence, and imagination are required to enable a complete understanding of the function, or functions, of LEA proteins and other hydrophilins.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Table S1. Group 1 LEA proteins.

Supplemental Table S2. Group 2 LEA proteins.

Supplemental Table S3. Group 3 LEA proteins.

Supplemental Table S4. Group 4 LEA proteins.

Supplemental Table S5. Group 6 LEA proteins.

Supplemental Table S6. Group 7 LEA proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to B.J. Barkla and J.L. Reyes for critical reading of the manuscript and stimulating discussions and to Dr. Leon Dure III for the discovery of these proteins and his visionary work.

Received April 8, 2008; accepted July 8, 2008; published September 8, 2008.

LITERATURE CITED

- Abba S, Ghignone S, Bonfante P** (2006) A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics* **7**: 39–53
- Ali-Benali MA, Alary R, Joudrier P, Gautier MF** (2005) Comparative expression of five *LEA* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* **1730**: 56–65
- Alpert P** (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* **45**: 685–695
- Alpert P, Oliver MJ** (2002) Drying without dying. *In* M Black, HW Prichard, eds, *Desiccation and Survival in Plants*. CAB International, Wallingford, UK, pp 3–43
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK** (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem* **278**: 40882–40889
- Alsheikh MK, Svensson JT, Randall SK** (2005) Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ* **28**: 1114–1122
- Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (1994) Genomic nucleotide sequence of tomato *Asr2*, a second member of the stress/ripening-induced *Asr1* gene family. *Plant Physiol* **106**: 1699–1700
- Arora R, Rowland LJ, Panta GR** (1997) Chill-responsive dehydrins in blueberry: are they associated with cold hardiness or dormancy transitions? *Physiol Plant* **101**: 8–16
- Baker EH, Bradford KJ, Bryant JA, Rost TL** (1995) A comparison of desiccation-related proteins (dehydrin and QP47) in pea (*Pisum sativum*). *Seed Sci Res* **5**: 185–193
- Baker J, Steele C, Dure L** (1988) Sequence and characterization of 6 *LEA* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* **11**: 277–291
- Bartels D, Souer E** (2003) Molecular response of higher plants to dehydration. *Top Curr Genet* **4**: 9–38
- Battista JR, Park MJ, McLemore AE** (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans R1* to desiccation. *Cryobiology* **43**: 133–139
- 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 Mol Biol* **67**: 107–124
- Bokor M, Csizmok V, Kovacs D, Banki P, Friedrich P, Tompa P, Tompa K** (2005) NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins. *Biophys J* **88**: 2030–2037
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Downs CA, Voinikov VK** (2000) Accumulation of dehydrin-like-proteins in the mitochondria of cold-treated plants. *J Plant Physiol* **156**: 797–800
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK** (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol* **2**: 5
- Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martinez J, Alberdi M, Close TJ, Corcuera LJ** (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol Plant* **118**: 262–269
- Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* **2**: 48–54
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pagès M, Masmoudi K** (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **26**: 2017–2026
- Browne JA, Dolan KM, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell AM** (2004) Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot Cell* **3**: 966–975
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165–2180
- Campbell SA, Close TJ** (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol* **137**: 61–74
- Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML** (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol* **108**: 1323–1324
- Carrari F, Fernie AR, Iusem ND** (2004) Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends Plant Sci* **9**: 57–59
- Cattivelli L, Bartels D** (1990) Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Physiol* **93**: 1504–1510
- Chakrabortee S, Boschetti C, Walton LJ, Sarkar S, Rubinsztein DC, Tunnacliffe A** (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18073–18078
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **45**: 113–141
- Chandra Babu R, Zhang JS, Blum A, Ho T, Wu R, Nguyen HT** (2004) *HVA1*, a *LEA* gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci* **166**: 855–862
- Close TJ** (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* **97**: 795–803
- Close TJ, Fenton RD, Yang A, Asghar R, DeMason DA, Crione D, Meyer NC, Moonan F** (1993) Dehydrin: the protein. *In* TJ Close, EA Bray, eds, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 104–118
- Close TJ, Kortt AA, Chandler PM** (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol* **13**: 95–108
- Cohen A, Plant AL, Moses MS, Bray EA** (1991) Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato: nucleotide sequence and analysis of the corresponding cDNAs. *Plant Physiol* **97**: 1367–1374
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* **35**: 393–405
- Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith C, Covarrubias AA** (1999) PvLEA-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* **120**: 93–103
- Cuming AC** (1999) *LEA* proteins. *In* R Casey, PR Shewry, eds, *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 753–780
- Curry J, Morris CF, Walker-Simmons MK** (1991) Sequence analysis of a cDNA encoding a group 3 *LEA* mRNA inducible by ABA or dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol* **16**: 1073–1076
- Curry J, Walker-Simmons MK** (1993) Unusual sequence of group 3 *LEA* (II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol* **21**: 907–912
- Danyluk J, Houde M, Rassart E, Sarhan F** (1994) Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species. *FEBS Lett* **344**: 20–24
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F** (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* **10**: 623–638
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM** (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* **273**: 9443–9449
- Dehaye L, Duval M, Viguier D, Yaxley J, Job D** (1997) Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed-specific biotinylated protein. *Plant Mol Biol* **35**: 605–621
- Delseny M, Bies-Ethève N, Carles C, Hull G, Vicent C, Raynal M, Grellet F, Aspart L** (2001) Late Embryogenesis Abundant (*LEA*) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J Plant Physiol* **158**: 419–427
- Doczi R, Kondrak M, Kovacs G, Beczner F, Banfalvi Z** (2005) Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in solanaceous species. *Plant Physiol Biochem* **43**: 269–276
- Dong JZ, Dunstan DI** (1997) Characterization of cDNAs representing five abscisic acid-responsive genes associated with somatic embryogenesis in *Picea glauca*, and their responses to abscisic acid stereostructure. *Planta* **203**: 448–453
- Dosztányi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I** (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* **347**: 827–839
- Dure L** (1993a) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* **3**: 363–369
- Dure L** (1993b) Structural motifs in *LEA* proteins. *In* TJ Close, EA Bray, eds,

- Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91–103
- Dure L** (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Protein Pept Lett* **8**: 115–122
- Dure L, Chlan C** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XII. Purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiol* **68**: 180–186
- Dure L, Crouch M, Harada JJ, Ho T, Mundy J, Quatrano RS, Thomas TL, Sung ZR** (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* **12**: 475–486
- Dure L, Galau GA** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins. *Plant Physiol* **68**: 187–194
- Dure L, Greenway SC, Galau GA** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162–4168
- Dyson HJ, Wright PE** (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 197–208
- Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ** (1997) Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiol Plant* **101**: 545–555
- Eom J, Baker W, Kintanar A, Wurtele ES** (1996) The embryo-specific EMB-1 protein of *Daucus carota* is flexible and unstructured. *Plant Sci* **115**: 17–24
- Espelund M, Saeboe-Larssen S, Hughes DW, Galau GA, Larsen F, Jakobsen KS** (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J* **2**: 241–252
- Frankel N, Carrari F, Hasson E, Iusem ND** (2006) Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene* **378**: 74–83
- Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F** (2007) *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Mol Biol* **63**: 719–730
- Fu D, Huang B, Xiao Y, Muthukrishnan S, Liang GH** (2007) Overexpression of barley *HVA1* gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. *Plant Cell Rep* **26**: 467–477
- Gal TZ, Glazer I, Koltai H** (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett* **577**: 21–26
- Galau GA, Hughes DW** (1987) Coordinate accumulation of homologous transcripts of seven cotton *LEA* gene families during embryogenesis and germination. *Dev Biol* **123**: 213–221
- Galau GA, Wang HY, Hughes DW** (1992) Cotton *Lea4* (D19) and *LeaA2* (D132) group 1 *Lea* genes encoding water stress-related proteins containing a 20-amino acid motif. *Plant Physiol* **99**: 783–788
- Galau GA, Wang HY, Hughes DW** (1993) Cotton *Lea5* and *Lea74* encode atypical Late Embryogenesis-Abundant proteins. *Plant Physiol* **101**: 695–696
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* **275**: 5668–5674
- Gaubier P, Raynal M, Hull G, Huestis G, Gellet F, Arenas C, Pages M, Delseny M** (1993) Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol Gen Genet* **238**: 409–418
- Gilles GJ, Hines KM, Manfre AJ, Marcotte WR Jr** (2007) A predicted N-terminal helical domain of a group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiol Biochem* **45**: 389–399
- Gilmour SJ, Artus NN, Thomashow MF** (1992) cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **18**: 13–21
- Giordani T, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, Cavallini A** (1999) Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Mol Biol* **39**: 739–748
- Goday A, Jensen A, Culiñán-Macia F, Albà M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pagès M** (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**: 351–360
- Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D** (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiol* **143**: 617–628
- Goyal K, Tisi L, Baran A, Browne J, Burnell A, Zurdo J, Tunnacliffe A** (2003) Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J Biol Chem* **278**: 12977–12984
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A** (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* **388**: 151–157
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D** (2005) Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* **137**: 157–167
- Guo W, Ward RW, Thomashow MF** (1992) Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis* Cor47. *Plant Physiol* **100**: 915–922
- Guy CL, Niemi KJ, Fenell A, Carter JV** (1986) Survival of *Cornus sericea* L. stem cortical cells following immersion in liquid helium. *Plant Cell Environ* **9**: 447–450
- Hand SC, Jones D, Menze MA, Witt TL** (2007) Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* **307**: 62–66
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T** (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol Biochem* **42**: 657–662
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T** (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J Exp Bot* **56**: 2695–2703
- Hara M, Terashima S, Kuboi T** (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol* **58**: 1333–1339
- Harada JJ, DeLisle A, Baden C, Crouch M** (1989) Unusual sequence of an abscisic acid inducible mRNA which accumulates late in *Brassica napus* seed development. *Plant Mol Biol* **12**: 395–401
- Hegyi H, Tompa P** (2008) Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding *in vivo*. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000017
- Hellwege EM, Dietz KJ, Hartung W** (1996) Abscisic acid causes changes in gene expression involved in the induction of the landform of the liverwort *Riccia fluitans* L. *Planta* **198**: 423–432
- Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK** (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol* **130**: 675–687
- Hoekstra FA, Golovina EA, Tetteroo FA, Wolkers WF** (2001) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiology* **43**: 140–150
- Hollung K, Espelund M, Jakobsen KS** (1994) Another *Lea B19* gene (group 1 *Lea*) from barley containing a single 20 amino acid hydrophilic motif. *Plant Mol Biol* **25**: 559–564
- Hong SH, Kim IJ, Yang DC, Chung WI** (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J Exp Bot* **53**: 2271–2272
- Honjoh K, Matsumoto H, Shimizu H, Ooyama K, Tanaka K, Oda Y, Takata R, Joh T, Suga K, Miyamoto T, et al** (2000) Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**: 1656–1663
- Honjoh K, Yoshimoto M, Joh T, Kajiwara T, Miyamoto T, Hatano S** (1995) Isolation and characterization of hardening-induced proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: identification of late embryogenesis abundant proteins. *Plant Cell Physiol* **36**: 1421–1430
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F** (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J* **8**: 583–593
- Houde M, Danyluk J, Laliberte JF, Rassart E, Dhindsa RS, Sarhan F** (1992) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol* **99**: 1381–1387
- Hsing YC, Chen ZY, Shih MD, Hsieh JS, Chow TY** (1995) Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Mol Biol* **29**: 863–868
- Hughes DW, Galau GA** (1989) Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes Dev* **3**: 358–369
- Hundertmark M, Hinch DK** (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**: 118–139

- Imai R, Chang L, Ohta A, Bray EA, Takagi M (1996) A Lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243–248
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol* **47**: 377–403
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999a) Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13566–13570
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999b) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol* **120**: 237–244
- Iturriaga G, Cushman MAE, Cushman JC (2006) An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. *Plant Sci* **170**: 1173–1184
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol* **102**: 1353–1354
- Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* **84**: 1127–1135
- Jiang X, Wang Y (2004) β -Elimination coupled with tandem mass spectrometry for the identification of in vivo and in vitro phosphorylation sites in maize dehydrin DHN1 protein. *Biochemistry* **43**: 15567–15576
- Joh T, Honjoh K, Yoshimoto M, Funabashi J, Miyamoto T, Hatano S (1995) Molecular-cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella-vulgaris* C-27: the most abundant clone encodes a late embryogenesis abundant protein. *Plant Cell Physiol* **36**: 85–93
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccai M, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004a) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J* **381**: 373–378
- Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004b) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ* **27**: 1459–1468
- Karlson DT, Fujino T, Kimura S, Baba K, Itoh T, Ashworth EN (2003a) Novel plasmodesmata association of dehydrin-like proteins in cold-acclimated red-osier dogwood (*Cornus sericea*). *Tree Physiol* **23**: 759–767
- Karlson DT, Zeng Y, Stirm VE, Joly RJ, Ashworth EN (2003b) Photoperiodic regulation of a 24-kD dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freeze-tolerance. *Plant Cell Physiol* **44**: 25–34
- Kikawada T, Nakahara Y, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, McGee B, Tunnacliffe A, Okuda T (2006) Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 56–61
- Kim HS, Lee JH, Kim JJ, Kim CH, Jun SS, Hong YN (2005) Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene* **344**: 115–123
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Higashi K, Satoh S, Kamada H, Harada H (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Mol Biol* **19**: 239–249
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol* **131**: 309–316
- Kovacs D, Kalmár E, Torok Z, Tompa P (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol* **147**: 381–390
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105–132
- Lal S, Gulyani V, Khurana P (2008) Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Res* **17**: 651–663
- Levi A, Panta GR, Parmentier CM, Muthalif MM, Arora R, Shanker S, Rowland LJ (1999) Complementary DNA cloning, sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Physiol Plant* **107**: 98–109
- Lin C, Guo WW, Everson E, Thomashow MF (1990) Cold acclimation in *Arabidopsis* and wheat: a response associated with expression of related genes encoding 'boiling-stable' polypeptides. *Plant Physiol* **94**: 1078–1083
- Lin C, Thomashow MF (1992) A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem Biophys Res Commun* **183**: 1103–1108
- Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R (1996) The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biol Chem* **377**: 555–561
- Luo K, Zhang G, Deng W, Luo F, Qiu K, Pei Y (2008) Functional characterization of a cotton late embryogenesis-abundant D113 gene promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **27**: 707–717
- Macrae TH (2005) Diapause: diverse states of developmental and metabolic arrest. *J Biol Res* **3**: 3–14
- Maitra N, Cushman JC (1994) Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein. *Plant Physiol* **106**: 805–806
- Manfre AJ, Lanni LM, Marcotte WR Jr (2006) The Arabidopsis group 1 late embryogenesis abundant protein ATEM6 is required for normal seed development. *Plant Physiol* **140**: 140–149
- Marttila S, Tenhola T, Mikkonen A (1996) A barley (*Hordeum vulgare* L) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. *Planta* **199**: 602–611
- Maskin L, Maldonado S, Iusem ND (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Mol Biol Rep* (in press)
- Mbenguie-A-Mbenguie D, Gomez RM, Fils-Lycaon B (1997) Molecular cloning and nucleotide sequence of a protein from apricot fruit (accession no. U82760) homologous to LEC14B protein isolated from *Lithospermum* gene expression during fruit ripening (PGR 97-161). *Plant Physiol* **115**: 1287–1289
- McCubbin WD, Kay CM, Lane B (1985) Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ Em protein. *Can J Biochem Cell Biol* **63**: 803–811
- Mészáros B, Tompa P, Simon I, Dosztányi Z (2007) Molecular principles of the interactions of disordered proteins. *J Mol Biol* **372**: 549–561
- Moons A, Bauw G, Prinsen E, Van Montagu M, Van der Straeten D (1995) Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant *indica* rice varieties. *Plant Physiol* **107**: 177–186
- Moreno-Fonseca LP, Covarrubias AA (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate *Ptoea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Mol Biol* **45**: 501–515
- Mouillon JM, Gustafsson P, Harryson P (2006) Structural investigation of disordered stress proteins: comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol* **141**: 638–650
- Mtwisha L, Brandt W, McCready S, Lindsey GG (1998) HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* **37**: 513–521
- Mundy J, Chua NH (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J* **7**: 2279–2286
- Muthalif MM, Rowland LJ (1994) Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry (*Vaccinium*, section *cyanoococcus*). *Plant Physiol* **104**: 1439–1447
- Nakayama K, Okawa K, Kakizaki T, Honma T, Itoh H, Inaba T (2007) Arabidopsis Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol* **144**: 513–523
- NDong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NP, Sarhan F (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol* **129**: 1368–1381
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **45**: 263–279
- Oliveira E, Amara I, Bellido D, Odena MA, Domínguez E, Pagès M, Goday A (2007) LC-MS/MS identification of *Arabidopsis thaliana* heat-stable seed proteins: enriching for LEA-type proteins by acid treatment. *J Mass Spectrom* **42**: 1485–1495
- Oliver MJ, Dowd SE, Zaragoza J, Mauget SA, Payton PR (2004) The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics* **5**: 89–107
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecol* **151**: 85–100
- Padmanabhan V, Dias DM, Newton RJ (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Mol Biol* **35**: 801–807
- Park JA, Cho SK, Kim JE, Chung HS, Hong JP, Hwang B, Hong CB, Kim

- WT (2003) Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the *Ca-LEAL1* gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Plant Sci* **165**: 471–481
- Peters J, Baumeister W, Lupas A (1996) Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaeobacterium *Staphylothermus marinus*: evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure. *J Mol Biol* **257**: 1031–1041
- Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1990) Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Cratogeomys plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiol* **94**: 1682–1688
- Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Pages M, Martinez MC (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J Biol Chem* **266**: 22510–22514
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249–17255
- Prieto-Dapena P, Almoguera C, Rojas A, Jordano J (1999) Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis-abundant gene in sunflower. *Plant Mol Biol* **39**: 615–627
- Proctor MCE, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *Bryologist* **110**: 595–621
- Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004a) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **54**: 743–753
- Puhakainen T, Li C, Boije-Malm M, Kangasjarvi J, Heino P, Palva ET (2004b) Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiol* **136**: 4299–4307
- Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ* **28**: 709–718
- Reynolds TL, Bewley JD (1993) Characterization of protein synthetic changes in a desiccation-tolerant fern, *Polypodium virginianum*: comparison of the effects of drying, rehydration and abscisic acid. *J Exp Bot* **44**: 921–928
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol* **117**: 1253–1263
- Riccardi F, Gazeau P, Jacquemot MP, Vincent D, Zivy M (2004) Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol Biochem* **42**: 1003–1011
- Ried JL, Walker-Simmons MK (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* **102**: 125–131
- Riera M, Figueras M, Lopez C, Goday A, Pages M (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9879–9884
- Rinne P, Welling A, Kaikuranta P (1998) Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant Cell Environ* **21**: 601–611
- Rinne PLH, Kaikuranta PLM, van der Plas LHW, van der Schoot C (1999) Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta* **209**: 377–388
- Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure L III (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* **5**: 769–780
- Robertson M, Chandler PM (1994) A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression. *Plant Mol Biol* **26**: 805–816
- Romo S, Labrador E, Dopico B (2001) Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiol Biochem* **39**: 1017–1026
- Rorat T, Grygorowicz WJ, Irzykowski W, Rey P (2004) Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta* **218**: 878–885
- Rorat T, Szabala BM, Grygorowicz WJ, Wojtowicz B, Yin Z, Rey P (2006) Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta* **224**: 205–221
- Rossi M, Lijavetzky D, Bernacchi D, Hopp HE, Iusem N (1996) *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato. *Mol Gen Genet* **252**: 489–492
- Russouw PS, Farrant J, Brandt W, Lindsey GG (1997) The most prevalent protein in a heat-treated extract of pea (*Pisum sativum*) embryos is an LEA group I protein: Its conformation is not affected by exposure to high temperature. *Seed Sci Res* **7**: 117–123
- Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S (2006) A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J* **45**: 237–249
- Salmi ML, Bushart TJ, Stout SC, Roux SJ (2005) Profile and analysis of gene expression changes during early development in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* **138**: 1734–1745
- Sánchez-Ballesta MT, Rodrigo MJ, Lafuente MT, Granell A, Zacarias L (2004) Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J Agric Food Chem* **52**: 1950–1957
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM (1992) The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* **33**: 141–166
- Senthil-Kumar M, Udayakumar M (2006) High-throughput virus-induced gene-silencing approach to assess the functional relevance of a moisture stress-induced cDNA homologous to Lea4. *J Exp Bot* **57**: 2291–2302
- Shen G, Pang Y, Wu W, Deng Z, Liu X, Lin J, Zhao L, Sun X, Tang K (2005) Molecular cloning, characterization and expression of a novel *Asr* gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Physiol Biochem* **43**: 836–843
- Shih MD, Lin SD, Hsieh JS, Tsou CH, Chow TY, Lin TP, Hsing YIC (2004) Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Mol Biol* **56**: 689–703
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 161–167
- Siddiqui NU, Chung HJ, Thomas TL, Drew MC (1998) Abscisic acid-dependent and -independent expression of the carrot late-embryogenesis-abundant-class gene *Dc3* in transgenic tobacco seedlings. *Plant Physiol* **118**: 1181–1190
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z (1995) Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol* **27**: 587–595
- Singh S, Cornilescu CC, Tyler RC, Cornilescu G, Tonelli M, Lee MS, Markley JL (2005) Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Sci* **14**: 2601–2609
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho TD, Qu R (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Sci* **155**: 1–9
- Solomon A, Salomon R, Paperna I, Glazer I (2000) Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology* **121**: 409–416
- Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC (2003) Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean: evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol* **131**: 963–975
- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC (2002) Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol* **128**: 822–832
- Stacy RAP, Aalen RB (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* **206**: 476–478
- Stacy RAP, Nordeng TW, Culiñez-Macia FA, Aalen RB (1999) The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J* **19**: 1–8
- Stanca AM, Crosatti C, Grossi M, Lacerenza NG, Rizza F, Cattivelli L (1996) Molecular adaptation of barley to cold and drought conditions. *Euphytica* **92**: 215–219
- Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer RA (2000) Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol* **7**: 772–776

- Svensson J, Palva ET, Welin B (2000) Purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* dehydrins by metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 20: 169–178
- Swire-Clark GA, Marcotte WR Jr (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 39: 117–128
- Tai HH, Tai GC, Beardmore T (2005) Dynamic histone acetylation of late embryonic genes during seed germination. *Plant Mol Biol* 59: 909–925
- Tanaka S, Ikeda K, Miyasaka H (2004) Isolation of a new member of group 3 late embryogenesis abundant protein gene from a halotolerant green alga by a functional expression screening with cyanobacterial cells. *FEMS Microbiol Lett* 236: 41–45
- Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 118: 1–8
- Tolter 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* 19: 1580–1589
- Tomba P (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* 579: 3346–3354
- Tunnacliffe A, Lapinski J, McGee B (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 546: 315–321
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S (2001) Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins. *Plant Physiol* 126: 1588–1597
- Ulrich TU, Wurtele ES, Nikolau BJ (1990) Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot. *Nucleic Acids Res* 18: 2826
- Vaidyanathan R, Kuruville S, Thomas G (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Sci* 140: 21–30
- Vicent CM, Gruber V, Delseny M (2001) The *Arabidopsis AtEm1* promoter is active in *Brassica napus* L. and is temporally and spatially regulated. *J Exp Bot* 52: 1587–1591
- Vicent CM, Hull G, Guillemot J, Devic M, Delseny M (2000) Differential expression of the *Arabidopsis* genes coding for Em-like proteins. *J Exp Bot* 51: 1211–1220
- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martinez MC, Torné JM, Pagès M (1990) Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Mol Biol* 14: 423–432
- Wang CS, Liao YE, Huang JC, Wu TD, Su CC, Lin CH (1998) Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant Cell Physiol* 39: 1307–1314
- Wang HJ, Hsu CM, Guang YJ, Wang CS (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiol Plant* 123: 314–320
- Wang HJ, Jauh GY, Hsu YH, Wang CS (2003) The nuclear localization signal of a pollen-specific, desiccation-associated protein of lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. *Bot Bull Acad Sin* 44: 123–128
- Wang W, Meng B, Chen W, Ge X, Liu S, Yu J (2007) A proteomic study on postdiapaused embryonic development of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Proteomics* 7: 3580–3591
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9: 244–252
- Welling A, Rinne P, Vihera-Aarnio A, Kontunen-Soppela S, Heino P, Palva ET (2004) Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J Exp Bot* 55: 507–516
- Williams BA, Tsang A (1994) Analysis of multiple classes of abscisic acid responsive genes during embryogenesis in *Zea mays*. *Dev Genet* 15: 415–424
- Wise MJ (2002) The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics (Suppl 1)* 18: S38–S45
- Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci* 9: 13–17
- Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1544: 196–206
- Woods WS, Boettcher JM, Zhou DH, Kloepper KD, Hartman KL, Ladrer DT, Qi Z, Rienstra CM, George JM (2007) Conformation-specific binding of alpha-synuclein to novel protein partners detected by phage display and NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 282: 34555–34567
- Wurtele ES, Wang H, Durgerian S, Nikolau BJ, Ulrich TH (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol* 102: 303–312
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110: 249–257
- Yale J, Bohnert HJ (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem* 276: 15996–16007
- Yamagishi M, Matsushima H, Wada A, Sakagami M, Fujita N, Ishihama A (1993) Regulation of the *Escherichia coli rnf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J* 12: 625–630
- Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 836–846
- Yang L, Zheng B, Mao C, Qi X, Liu F, Wu P (2004) Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. *Mol Genet Genomics* 272: 433–442
- Yoshida Y, Sato T, Hashimoto T, Ichikawa N, Nakai S, Yoshikawa H, Imamoto F, Tagawa K (1990) Isolation of a gene for a regulatory 15-kDa subunit of mitochondrial F₁F₀-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. *Eur J Biochem* 192: 49–53
- Yu JN, Zhang JS, Shan L, Chen SY (2005) Two new group 3 LEA genes of wheat and their functional analysis in yeast. *J Integr Plant Biol* 47: 1372–1381
- Zegzouti H, Jones B, Marty C, Lelievre JM, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (1997) ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol Biol* 35: 847–854
- Zhang L, Ohta A, Takagi M, Imai R (2000) Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J Biochem (Tokyo)* 127: 611–616
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621–2632

Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings

Marina Battaglia · Rosa M. Solórzano · Magdalena Hernández ·
Sonia Cuéllar-Ortiz · Blanca García-Gómez · Judith Márquez ·
Alejandra A. Covarrubias

Received: 20 July 2006 / Accepted: 10 October 2006 / Published online: 16 November 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Plant cell walls undergo dynamic changes in response to different environmental stress conditions. In response to water deficit, two related proline-rich glycoproteins, called p33 and p36, accumulate in the soluble fraction of the cell walls in *Phaseolus vulgaris* (Covarrubias et al. in *Plant Physiol* 107:1119–1128, 1995). In this work, we show that p33 and p36 are able to form a 240 kDa oligomer, which is found in the cell wall soluble fraction. We present evidence indicating that the highest accumulation of these proteins in response to water deficit occurs in the growing regions of common bean seedlings, particularly in the phloem tissues. These proteins were detected in *P. vulgaris* cell suspension cultures, where the p33/p36 ratio was higher under hyperosmotic conditions than in bean seedlings subjected to the same treatment. The results support a role for these proteins during the plant cell

response to changes in its water status, and suggest that cell wall modifications are induced in active growing cells of common bean in response to water limitation.

Keywords Cell wall · Oligomeric proteins · *Phaseolus* · Proline-rich proteins · Water deficit

Abbreviations

AP Alkaline phosphatase
dpa Days post-anthesis
PRP Proline-rich protein

Introduction

Water limitation interferes with normal patterns of plant growth and development and induces adaptive responses at different levels (Bray 1997). At the cellular level, water deficit could result in alterations in cell volume and shape and loss of turgor. In addition, physical and biochemical alterations of the cell wall in response to water stress have been described (Iraki et al. 1989; Wu et al. 1996; Wakabayashi et al. 1997). It has been reported that the accumulation of some cell wall proteins (Bozarth et al. 1987; Covarrubias et al. 1995) and of several cell wall protein transcripts is affected by water deficit. The concentration of some proline-rich protein (PRP) mRNAs increases in response to water scarcity. That is the case of the soybean PRP1 mRNA (Creelman and Mullet 1991), two different common bean PRP transcripts, one of which showed high homology with soybean PRP2 (Colmenero-Flores et al. 1997), and an alfalfa transcript encoding a chimeric PRP2 protein (Deutch and Winicov 1995). Also, the tomato class III glycine-rich protein

Marina Battaglia and Rosa M. Solórzano contributed equally to this work.

M. Battaglia · R. M. Solórzano · M. Hernández · S. Cuéllar-Ortiz · B. García-Gómez · A. A. Covarrubias (✉)
Departamento de Biología Molecular de Plantas,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma
de México, Apdo. Postal 510-3, 62250 Cuernavaca,
Morelos, Mexico
e-mail: crobles@ibt.unam.mx

J. Márquez
Laboratorio del Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias,
Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de
México, 04510 Mexico D.F., Mexico

Present Address:
M. Hernández
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM,
Apdo. Postal 565-A, 62100 Cuernavaca, Morelos, Mexico

transcript accumulates in response to drought stress (Showalter et al. 1993).

Proline-rich proteins represent one of the classes of the so-called cell wall structural proteins. At least three sub-classes of PRPs have been distinguished to date. The PRPs in one of these subclasses contain several copies of the POVEKPOVXX motif (Averyhart-Fullard et al. 1988; Hong et al. 1990), whereas those in the other two subclasses show a hybrid structure. Those termed HyPRPs contain two distinct regions, one rich in proline and the other, at the carboxyl-end, rich in hydrophobic and cystein residues (Subramaniam et al. 1994; Deutch and Winicov 1995). The third sub-class, named NHyPRPs, exhibits a C-terminal region with a high percentage of proline residues organized in distinct repetitive sequence motifs, whereas its extended amino-terminus is essentially devoid of proline residues (Castonguay et al. 1994; Menke et al. 2000).

A wealth of information exists regarding the expression patterns of some of the PRP genes in response to wounding, fungal elicitors, infection and during legume nodule formation (Shong et al. 1991; Showalter 1993; Cassab 1998; Bernhardt and Tierney 2000). Their accumulation during these processes has been associated with a possible role as structural proteins within the extracellular matrix to add mechanical strength to the wall and assist in proper wall assembly. It is proposed that these kinds of proteins are secreted into the wall, where eventually they become insolubilized in response to a hydroxide peroxide burst elicited by environmental or developmental signals (Bradley et al. 1992; Brisson et al. 1994; Wojtaszek et al. 1995; Marshall et al. 1999; Somerville et al. 2004). Although these proteins may also participate in several developmental processes, little information exists in this regard. The most studied feature has been the expression patterns for PRP genes in many plant species. That is the case of the soybean *PRP* gene family, whose three members (*PRP1*, *PRP2* and *PRP3*) show distinct patterns of expression in different organs (leaf, stem, root, and seed) and at different developmental stages (Hong et al. 1989; Kleis-San Francisco and Tierney 1990; Wyatt et al. 1992). Also the expression of some of these genes during seedling growth (Hong et al. 1989), during the early stages of legume root nodule formation (Scheres et al. 1990; van de Wiel et al. 1990; Wilson et al. 1994), in immature maize-embryos (Jose-Estanyol et al. 1992), in cell types associated with lignification (Ye et al. 1991; Wojtaszek and Bolwell 1995; Vignols et al. 1999), and in young tomato fruits (Salts et al. 1991) has been characterized. In contrast, limited information is available on the expression of these proteins in response to abiotic stress (Bozarth et al. 1987;

Creelman and Mullet 1991; Covarrubias et al. 1995; Marshall et al. 1999; Verdoy et al. 2004).

In an effort to understand the role of the cell wall in response to water deficit, we have characterized two proline-rich glycoproteins of 33 and 36 kDa (p33 and p36), immunologically related and similar to soybean PRP2, which localized to the cell wall. As expected for a proline-rich glycoprotein, we have shown that these proteins contain various repeats of the decapeptide POVEKPOVYK and that the amino acid sequence of their amino terminal ends is the same, except for the fourth residue (García-Gómez et al. 2000). These proteins show a high accumulation in response to water deficit and ABA treatments in the cell walls of bean plants (Covarrubias et al. 1995; García-Gómez et al. 2000). We have shown that, in response to water deficit, both proteins accumulate in the soluble fraction of the cell wall, and specifically bind to plasma membrane vesicles, in a divalent cation-dependent manner (García-Gómez et al. 2000). In this work, we report a biochemical characterization of these proteins as well as their histological localization in common bean plants subjected to water deficit. We examined whether soluble p33/p36 proteins exist in different molecular forms in the cell wall and whether they show a particular distribution in the growing regions of common bean seedlings in response to water limitation. The existence of soluble and insoluble forms of these proteins with distinctive roles in the plant extracellular matrix is suggested.

Materials and methods

Plant material, growth conditions and growth rate determination

Bean seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa were kindly provided by J. Acosta (INIFAP, Texcoco, Mexico).

Common bean seeds were surface sterilized in 10% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min, rinsed in running tap water for 2 h, sown on water saturated paper towels and germinated in the dark at $29 \pm 1^\circ\text{C}$ and 100% relative humidity. After 72 h, seedlings were selected for uniform size and transplanted to vermiculite containing different amounts of water. The control growth condition contained 5 ml of water per gram of vermiculite ($\Psi_w = -0.074$ MPa). The water limitation conditions used in this work corresponded to $\Psi_w = -0.35$ MPa in the vermiculite. Water potential in the vermiculite was maintained constant throughout the experiment. After transplanting, seedlings were grown

in the dark at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ during 72 h (Covarrubias et al. 1995). To evaluate the water status of bean seedlings along the experiments, the water potential (Ψ_w) was determined following the dew point method using the C-52 sample chamber, as described in the instruction manual for the HR-33T Dew Point Microvoltmeter (Wescor, Inc., Logan, UT, USA). Additionally, the effect of water deficit conditions was recorded by determining elongation of bean seedlings hypocotyls (Covarrubias et al. 1995).

Growing regions were determined as described by Nonami and Boyer (1993) for bean seedlings grown under well-watered or under water deficit conditions. Briefly, the hypocotyls were marked at 5-mm intervals with India ink, once transferred to the different growth conditions, and the distance between marks was determined along the time of the experiment. The rate of elongation was calculated for each interval from the length gained during the growth period.

Phaseolus vulgaris cell-suspension culture

The cell suspension culture of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa was obtained according to Leon et al. (1991) from 12 to 15 dpa immature cotyledons. Induction and maintenance of callus cultures were carried out by placing immature cotyledons on Shenk and Hildebrandt (SH) medium supplemented with 2 mg/l *p*-chlorophenoxyacetic acid, 0.4 mg/l 2,4-D and 1 mg/l kinetin. Pieces of the most friable calli were transferred to SH medium to establish a cell suspension culture. A homogeneous cell population was selected by filtration through a 500 μm mesh screen before subculturing for various times. Once established, the suspension was then subcultured every 5 days. This culture was maintained under dark grown conditions with shaking at 24°C . Hyperosmotic treatment was imposed, when the suspension was subcultured, by adding NaCl, to a final concentration of 150 mM. Cells were harvested by centrifugation after different times of exposure to the stress treatment.

Protein purification

Protein extracts were obtained from water stressed bean seedlings by acidic extraction according to Covarrubias et al. (1995). After acetone precipitation, proteins were resuspended in 100 mM ammonium acetate pH 4.5. p33/p36 were enriched by a precipitation with ammonium sulfate (20–40% saturation) (after this purification step, the major bands were p33, p36 and a 68 kDa protein); proteins in the pellet were resuspended in 100 mM ammonium acetate pH 4.5 and dialyzed against the same solution. Further purification

was attained by filtration chromatography using a FPLC system (ÄKTA-FPLC, Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA) with a Superdex-200 column equilibrated in 100 mM NaCl, 100 mM ammonium acetate, pH 4.5. In a typical experiment, 1–4 mg of the enriched p33/p36 protein extract were loaded in a total volume of 1.5–3.0 ml (approx. 0.7–1.5 mg/ml). Fractions of approximately 1.5 ml containing p33 and p36 were selected and dialyzed against 100 mM ammonium acetate pH 4.5. After concentration, proteins were quantified and their purity was assessed by SDS-PAGE. Even though different non-denaturing purification procedures were tested, p33 and p36 were always co-purified. The separation of p33 and p36 was only possible through preparative SDS-PAGE and subsequent electroelution. After recovery, proteins were extensively dialyzed against 5 mM ammonium acetate, lyophilized, resuspended in water and precipitated with acetone.

Immunological procedures

Antibodies against p33/p36 proteins were produced as described by Covarrubias et al. (1995). When indicated, antibodies were affinity purified using the procedure described by Lillie and Brown (1987), in which 100–200 μg of antigen were immobilized in nitrocellulose membranes. Partially purified IgGs (1–2 mg), in TBS, were incubated with the immobilized antigen for 1–2 h at room temperature. The nitrocellulose stripe was rinsed three times with TBS and the purified antibody was eluted by a 15-min treatment with 0.2 M glycine pH 2.7, followed by neutralization with 2 M Tris-base. The eluted antibody was kept in 50% glycerol at -20°C .

Gel electroblotting was done according to the method of Towbin et al. (1979). Immunostaining of electroblots by chemiluminescence was done using SuperSignal West Pico Stable Solution (Pierce, Rockford, IL, USA). Typically, we used 1:2,000 dilution of anti-p33 antibody and a 1:5,000 dilution of goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP; Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Alternatively, electroblots were reacted with 1:2,000 dilution of anti-p33 antibody and a 1:2,000 dilution of goat anti-rabbit IgG conjugated to AP (Zymed Laboratories). AP activity was developed using a BCIP/NBT substrate kit from Zymed Laboratories, according to manufacturers' instructions.

Immunocytochemistry

The fixation, dehydration and embedding procedure was carried out according to Baskin et al. (1992) with

some modifications. For embedding in methacrylate resin, pieces of bean hypocotyls and roots were fixed for 3 h at room temperature in PEM buffer [4% (w/v) paraformaldehyde and 0.2% (v/v) glutaraldehyde in 50 mM Pipes, 5 mM EGTA, 2 mM MgSO₄, pH 6.9]. Then, plant material was rinsed in three 10-min changes of PEM buffer. Following dehydration in a graded series of ethanol, the tissue was treated twice during 60-min with a solution containing 5 mM DTT in 100% (v/v) ethanol. Samples were passed through 60-min ethanol-methacrylate-5 mM DTT series, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 (v/v) ethanol:methacrylate mixture [*n*-butyl-methacrylate, methyl-methacrylate in a 4:1 ratio (v/v), to which 0.5% (w/v) benzoin ethyl ether and 5 mM DTT were added] and then incubated overnight in the dark in 100% methacrylate mixture. Thereafter, samples were treated with three 60-min changes of 100% methacrylate mixture, and left in the final change for at least 24 h. For sample embedding, plant material was transferred to gelatin capsules containing 100% methacrylate mixture, and exposed to long-wave ultraviolet (UV) lights placed 5 cm above capsule height. Embedding was done with temperature held at approx. 0°C. Polymerization usually took 4–6 h, although overnight irradiation was occasionally needed.

Sections were cut dry at 5 µm and placed on small drops of water. The embedding medium was removed from sections by a 5- to 15-min incubation in acetone followed by rehydration by serial 10-min treatments with an acetone/water solution, decreasing acetone concentration from 100 to 10%. Sections were rinsed with three 10-min changes of TBST and then were incubated for 2 h at room temperature, or 1 h at 4°C, in blocking solution (5% powder non-fat milk in TBST or prepared by Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). For immunodetection, samples were incubated with immunopurified primary antibody (1:20 dilution), in blocking solution, for 2 h at room temperature; and, after rinsing in TBST, the secondary antibody (1:100), coupled to a fluorophore (Alexa Fluor 594, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added for a minimum of 4 h at 4°C. Alternatively, a biotin/avidin system (Vectastain ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), in which a biotinylated, affinity-purified secondary antibody is detected using a preformed macromolecular complex between avidin and biotinylated peroxidase, retaining biotin binding sites, was used. Sections were then rinsed with three changes of TBST and mounted by the addition of a small drop of Citifluor Glycerol (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA). Samples were examined on a E-600 Nikon microscope, equipped with a 100 W high-pressure mercury arc

lamp, epifluorescence optics and standard filters for observing fluorescence from Alexa Fluor 594.

Tissue prints

Tissue-print Western blots were carried out following the procedure described by Cassab (1993) and using fresh hypocotyl sections (0.3–3 mm thick) from bean seedlings grown under well-watered or under water deficit conditions, as described in the text. We obtained sections from the different regions of growing hypocotyls, the elongating region represented by E1 (5 mm below the cotyledons) and E2 (the section with the highest elongation rate), and the mature region (M) corresponding to the most basal hypocotyl section. Immunodetection was done using anti-p33 antibody (1:2,000 dilution) and goat anti-rabbit IgG conjugated to AP (1: 5,000 dilution; Boehringer-Mannheim). AP activity was developed using a BCIP/NBT substrate (Boehringer-Mannheim).

Gel electrophoresis

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was done in the presence of SDS (SDS-PAGE), according to the method of Laemmli (1970) using 15% polyacrylamide.

Native gel electrophoresis was used as a complementing method to determine the molecular size of p33/p36 protein under non-denaturing conditions. Because of the expected high molecular mass of the protein, a 5–20% linear concentration gradient polyacrylamide gel was used following the protocol described by Shi and Jackowski (1998). Afterwards, gels were transferred to Hybond-C extra membranes (Amersham Bioscience) following the procedure recommended by Towbin et al. (1979) for high molecular weight proteins.

Sucrose density gradient centrifugation

Sucrose-density gradient runs were carried out with linear 30–5% (w/v) gradients. Sucrose solutions were prepared in 0.05M Tris, pH 7.0. The 4.5 ml gradients were layered with 0.1 ml of the p33/p36 sample prepared in sodium acetate, pH 4.5. Samples were centrifuged in swinging bucket SW50.1 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) for 24 h at 4°C and 243,000 g (Freifelder 1976; Martin and Ames 1961). Fractions of 0.1 ml (40 in total) were collected from top to bottom using the Autodensi-flow fraction recovery system (Labconco Corporation, Kansas City, MI, USA) and aliquots of each fraction were mixed with

Laemmli sample buffer and analyzed by 12% PAGE and Western blot. Three different oligomeric forms (monomer, dimer and trimer) of BSA (High purity quality, Research Organics, Cleveland, OH, USA) and urease I monomer (High purity quality, Sigma-Aldrich, St. Louis MI, USA) were used as molecular mass markers. Sedimentation conditions for these compounds were identical as those described above. In these cases, aliquots of the corresponding fractions were analyzed by 12% non-denaturing poly-acrylamide gel electrophoresis.

Protein-protein cross-linking

Cross-linking experiments were carried out using Tris-bipyridylruthenium(II) di-cation (Ru(II)bpy_3^{2+}) (TdClRu, Sigma-Aldrich; Grabarek and Gergely 1990) following the method described by Fancy and Kodadek (1999) with minor modifications. Briefly, purified p33/p36 was diluted to a concentration of 1 mg/ml in cross-linking buffer (CLB: 150 mM NaCl, 15 mM Na_2HPO_4 , pH6.5), the protein mixture was brought to 10 μl containing 1.25 mM Ru(II)bpy_3^{2+} , 2.5 mM ammonium persulfate and it was flashed for 5 s through a 3 cm water-filter using a white light bulb as source (75 W). Samples were subsequently quenched with an equal volume of 2 \times Laemmli sample buffer containing 4% SDS and 10% β -mercaptoethanol, and resolved by SDS-PAGE. Protein bands were visualized by chemiluminescence from Western blots using anti-p33 antibody and anti-rabbit IgG-peroxidase.

Results

p33/p36 proteins show a higher accumulation in elongating than in mature regions of bean seedlings hypocotyls under water deficit

Previously, we showed that the accumulation of p33/p36 proteins is highly sensitive to water deficit in etiolated common bean seedlings (Covarrubias et al. 1995). This accumulation is quite conspicuous in roots and hypocotyls but not in the epicotyl region (including the embryonic leaves; Covarrubias et al. 1995). In this work, we determined the accumulation pattern for p33/p36 proteins along the growing regions of hypocotyls obtained from bean seedlings grown in a water-limiting environment as indicated in [Materials and methods](#). The decrease in the water potential in the different growth regions of bean seedlings grown under water deficit was indicative of the effect of the stress treatment on plant tissues. The water potential values

obtained for the different regions of well-irrigated seedlings were as follows: E1: -0.7 , E2: -0.62 and M: -0.55 MPa, whereas for stressed seedlings: E1: -0.91 , E2: -0.90 and M: -0.83 MPa. Similar results have been reported for common bean and soybean (Nonami and Boyer 1989; Colmenero-Flores et al. 1999). The stress treatments also showed an impact on hypocotyl growth, which was reduced by approximately 30%. Both polypeptides are detectable in all growing regions (E1, E2 and M; Fig. 1) and they accumulate to higher levels in the hypocotyl region with the highest elongation rate (E2) of water-deprived seedlings (marked WD in Fig. 1). The same result was obtained when the different regions of bean hypocotyls were analyzed by immunohistochemistry either in tissue printings or by light microscopy (see below).

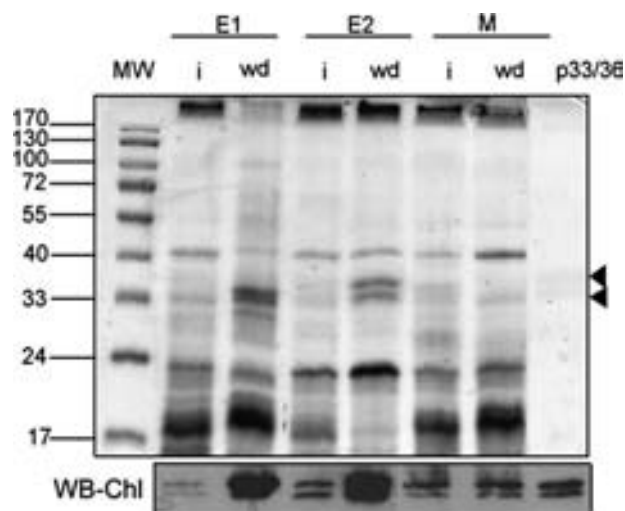


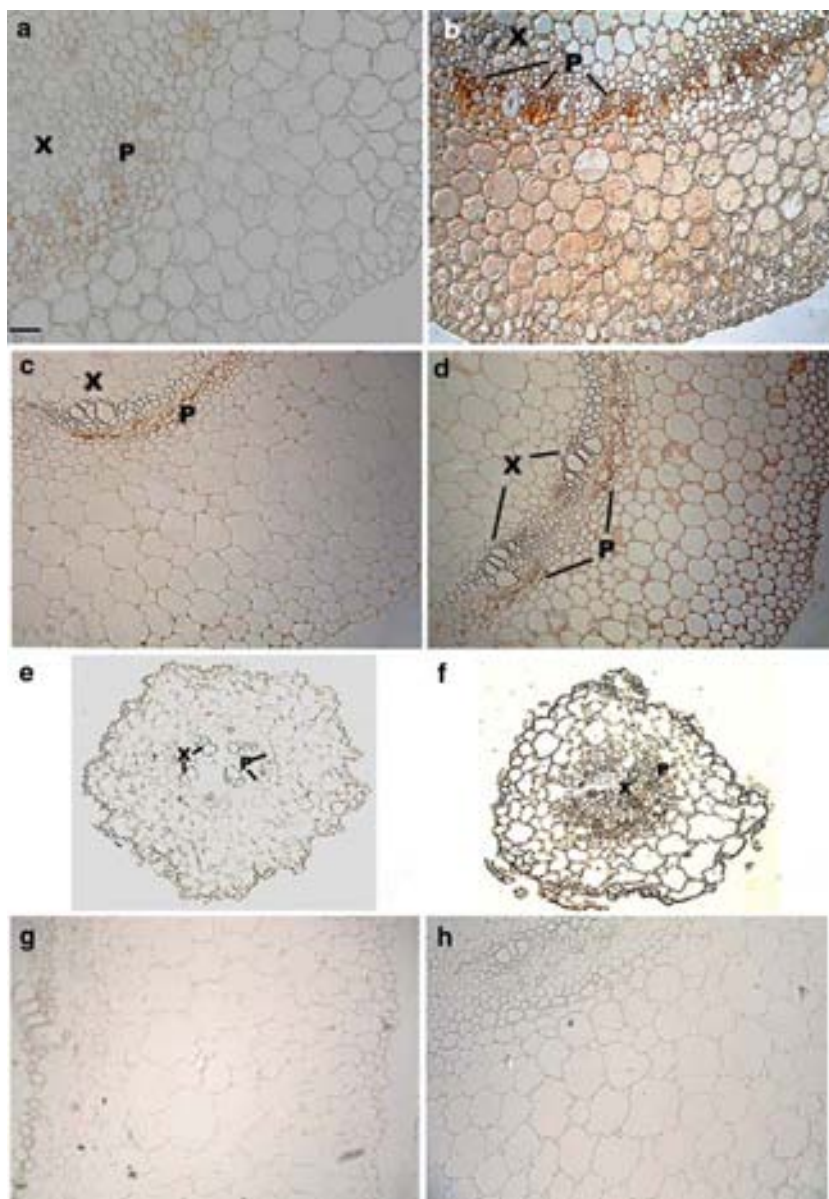
Fig. 1 Protein patterns of acidic extracts from the growing regions of hypocotyls obtained from *Phaseolus vulgaris* seedlings grown under well watered and water deficit conditions. Seventy-two hours after germination seedlings were transplanted to well irrigated (i) ($\Psi_w = -0.074$ MPa) or to low water potential (wd) ($\Psi_w = -0.32$ MPa) vermiculite. Seedlings were grown under these conditions for 72 h. After this time, well watered or water stressed seedlings were harvested, hypocotyls were sectioned into discrete regions: E1 and E2 corresponding to the elongating regions (E2 was the section with the highest elongation rate) and M, the most basal or mature region, and protein acidic extracts were obtained (see [Materials and methods](#) for details). Proteins were separated by SDS-PAGE (in all cases 15 μg protein/lane) and the gel was stained with Coomassie Blue. As molecular mass markers (MM) we used the pre-stained protein ladder supplied by Fermentas, Inc. (Hanover, MD, USA). Molecular masses are expressed in kDa. *Arrowheads* indicate the position of p36 and p33 proteins. This is a representative result of, at least, five independent experiments. The bottom panel represents the results from two Western blots using anti-p33/p36 antibody. The protein extracts used correspond to two independent experiments. In both cases, 10 ng of the protein extract were loaded in each lane. The panel labeled *WB-Chl* was developed by chemiluminescence as indicated in [Materials and methods](#)

Immuno-histochemical localization of p33/p36 proteins in bean seedlings grown under water limitation

To determine the histological localization of p33/p36 proteins along bean hypocotyls during water deficit, we analyzed cross sections of the different bean hypocotyl growing regions (E1, E2 and M) reacted with anti-p33/p36 specific antibodies by optical microscopy. Representative results are shown in Figs. 2 and 3. When complete sections from stressed bean seedlings were examined, p33/p36 were detected in all the growing regions of bean hypocotyls; however, it was evident that the highest accumulation of these proteins occurs in the region with the highest growing rate (E2; Fig. 2b), whereas in the mature region (M), p33/p36 presented low accumulation levels (Fig. 2d). The

immunodetection reaction localized these proteins to the cell wall of all cell types except mature xylem vessels. The zones with the highest p33/p36 accumulation showed a patchy distribution, which could be mapped to the wall and intercellular space in the corner regions of the epidermal, cortical and pith cells, and within the vascular tissue (Fig. 2 and 3). This analysis showed that the highest accumulation of these proteins occurs in the primary phloem, particularly in the metaphloem sector, of those hypocotyl regions in active elongation (E; Fig. 3b, c). A similar distribution was observed in hypocotyl sections from non-stressed seedlings, however their accumulation levels were considerably lower than those obtained from bean seedlings grown under water deficit (Fig. 2a, c). In this case, p33/p36 is only detected in the corner regions of

Fig. 2 Immunolocalization of p33/p36 on cross sections of different regions of hypocotyls and roots obtained from *P. vulgaris* seedlings grown under well-watered (a, c and e) or water deficit conditions (b, d and f). a, b Localization of p33/p36 in cross sections of hypocotyl E2 growing regions. c, d Immunodetection in cross sections of hypocotyl mature regions. e, f Immunolocalization of p33/p36 in cross sections of the primary root. g, h Results using the preimmune serum in cross sections of elongating and mature regions, respectively. X primary xylem, P phloem. The black bar represents 50 μ m



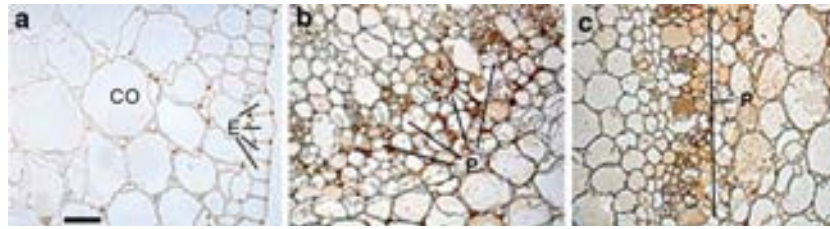


Fig. 3 Immunolocalization of p33/p36 on cross sections of bean hypocotyls obtained from irrigated and water deficit growth conditions. **a**, **b** and **c** Higher magnifications of p33/p36 localization in cross sections of hypocotyl elongating regions. **a** Magnified view of the cortex (*CO*) and epidermal (*E*) tissues. **b**, **c** p33/p36 distri-

bution in vascular tissues of hypocotyl growing regions from bean seedlings grown under well-watered and water limitation conditions, respectively. *P* phloem vascular bundles. The *black bar* represents 50 μm

the vascular tissue cells, particularly in the primary phloem.

The high accumulation of these proteins in the primary phloem of the hypocotyl growing regions was also evident from immunodetection experiments as those shown in Fig. 4, where tissue prints of cross sections from the elongating (E1 and E2, Fig. 4a–d) and mature regions (M, Fig. 4e, f) of bean hypocotyls were incubated with anti p33/p36 antibodies. Also, the highest accumulation p33/p36 in hypocotyl growing regions is confirmed by comparing p33/p36 protein levels detected in these regions (E1 in Fig. 4b, and E2 in Fig. 4d) with those found in the mature section (Fig. 4f). Cross sections of bean hypocotyls were stained with aniline blue, which specifically stains the carbohydrate callose that is selectively deposited in sieve-elements' cell walls, as a reference to localize the phloem tissue (Fig. 4h; Esau 1965). A comparable histological localization of p33/p36 proteins to that obtained for hypocotyls was found in the primary root of bean seedlings grown in well watered or water limited vermiculite (Fig. 2e, f). p33/p36 was detected in all root tissues with higher accumulation in epidermal and vascular tissues. The higher accumulation in roots from plants grown under water deficit is noticeable when Fig. 2e and f are compared.

p33/p36 accumulate in response to hyperosmotic treatments in suspension-cultured bean cells

Suspension-cultured plant cells have primary cell walls that are similar to those found in meristematic cells (Robertson et al. 1999). This allows us to address whether p33/p36 accumulate in the primary cell wall of young cells in response to hyperosmotic treatment. As shown in Fig. 5, both proteins accumulate in the suspension-cultured cells. Under non-stress conditions, p36 is detected in cells transferred to a fresh medium; after 30 min, the levels of this protein increased and the accumulation of p33 is evident followed by a subsequent

progressive decrease (Fig. 5a). In contrast, when cells are subjected to hyperosmotic treatment, p36 showed a gradual accumulation after 60 min of NaCl treatment, whereas p33 maintained constant low levels. The p36 accumulation in response to hyperosmotic stress was reinforced by the high levels of this protein detected in the medium under this condition (Fig. 5b). In contrast, p33 was never detected in the culture media under the conditions tested suggesting that the cells in this suspension culture only secreted p36. These results indicate that the p33/p36 ratio is lower in the cultured cells under hyperosmotic conditions than that observed in bean seedlings subjected to water deficit imposed either by restricted irrigation or by NaCl treatment (Fig. 5c). This is in agreement with the ratio determined for these proteins in immature cotyledons of the same developmental stage as those used to initiate the suspension culture (Fig. 5c).

Oligomerization properties of p33/p36 cell wall proteins

Little is known about the biochemical characteristics of the plant PRPs family. It has been considered that the proteins in this family are relatively simple proteins, composed of essentially one repetitive motif (POV-YKPOVEK), lacking serines and lightly glycosylated. Circumstantial evidence indicates that these proteins cross-link in response to a peroxide burst, particularly in response to pathogen attack (Bradley et al. 1992; Brisson et al. 1994; Marshall et al. 1999; Somerville et al. 2004). Here, we show that p33 and p36 proteins are able to form oligomeric complexes of approximately 240 kDa, containing 6–7 monomers of p33 and/or p36. This property was apparent after the fractions, obtained from the filtration chromatography applied to p33/p36 enriched extracts, were separated under denaturing conditions by SDS-PAGE. This analysis demonstrated that the only fractions that showed the expected molecular mass for the p33 and p36 monomers (33 and

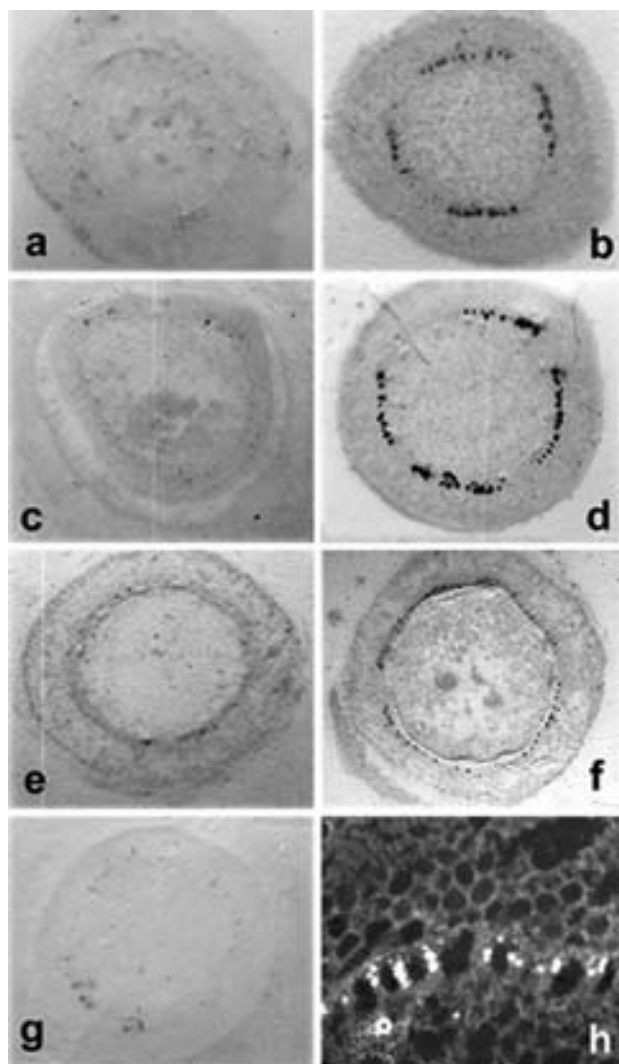


Fig. 4 Immunolocalization of p33/p36 on prints of cross sections of different regions of hypocotyls obtained from *P. vulgaris* seedlings grown under well-watered (**a**, **c** and **e**) or water deficit (**b**, **d** and **f**) conditions. **a**, **b** Localization of p33/p36 on prints of cross sections of hypocotyl E1 growing regions. **c**, **d** Immunodetection results on prints of cross sections of hypocotyl E2 growing regions. **e**, **f** Immunolocalization of p33/p36 on prints of cross sections of hypocotyl M regions (the basal region). Immunodetection was carried out using immunopurified anti-p33 antibody. Immunodetection using pre-immune anti-serum was included as control (**g**). **h** Hypocotyl cross section stained with aniline blue to detect callose, highly accumulated in the sieve plates of phloem tissue. Aniline blue fluorescence was detected with an excitation light of 365 nm. The result in each panel is representative of more than 20 independent samples

36 kDa, respectively) eluted as a discrete peak with the same retention factor as the 240 kDa molecular mass marker (Fig. 6). Additional evidence supporting these results was obtained by zonal centrifugation in sucrose density gradients (see [Materials and methods](#) for details). This separation procedure allowed us to detect different forms of p33/p36 proteins that showed

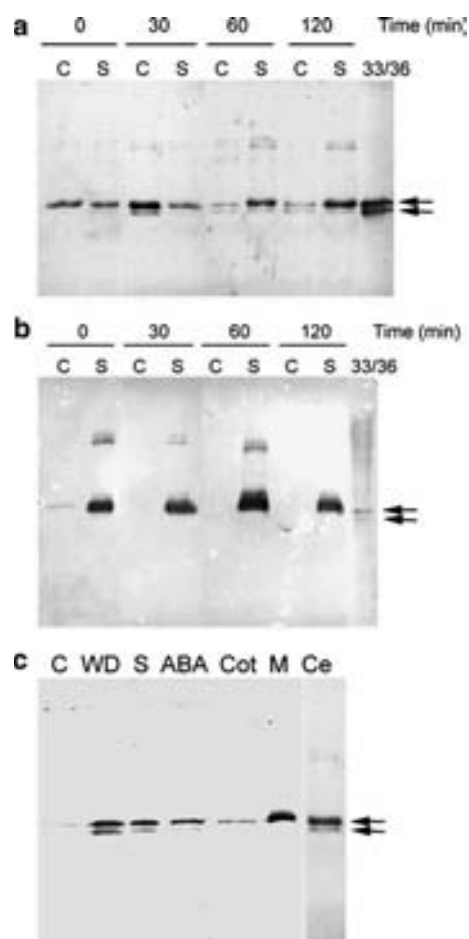


Fig. 5 Immunodetection of p33 and p36 in bean cells suspension culture grown under standard (C) and hyperosmotic conditions (S). **a** Accumulation of p33/p36 in bean cell-suspension culture was followed after hyperosmotic treatment imposed by subculturing cells in fresh medium containing NaCl (150 mM) as described in [Materials and methods](#). Cells were harvested by centrifugation after different times of exposure to the stress treatment and protein acidic extracts were obtained from cell walls. Proteins were separated by SDS-PAGE and p33/p36 were immunodetected using anti-p33 antibody. The same amount of protein was loaded on each lane, except in lane labeled as 33/36, where a p33/p36 enriched fraction was used as reference. **b** To detect p33/p36 proteins secreted to the culture media, total protein from the same volume of culture media in the supernatant of the different grown conditions indicated above were separated by SDS-PAGE. **c** p33 and p36 were detected from protein extracts of bean seedlings grown under well-watered conditions (C), subjected to water deficit (WD) or to NaCl treatments (S). In addition, protein extracts from bean suspension culture treated with abscisic acid (ABA) or NaCl (Ce), or from the protein recovered from NaCl culture media (M) are shown. The p33/p36 pattern from control conditions for these treatments are not shown since they are similar to those presented in (**a**) and (**b**). Because the cell suspension culture used was originated from immature bean cotyledons, the detection of p33/p36 in this organ is used as reference (Cot). The results represent the data from, at least, three independent experiments

distinctive sedimentation behaviors (Fig. 7), which correspond to molecular masses of approximately 21–44 kDa, 80 kDa and 190 kDa. Even though, the

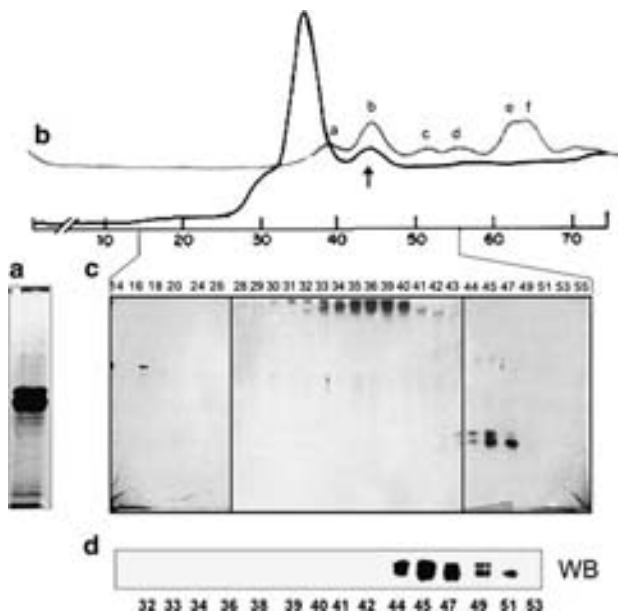


Fig. 6 A typical chromatogram obtained from FPLC chromatography in Superdex 200 of p33/p36 enriched protein extracts from ammonium sulfate fractionation (a). **b** The black line indicates the elution profile obtained by the absorbance at 280 nm of the collected fractions, after elution with 0.1 M NaCl, 0.1 M sodium acetate, pH 4.5. The arrow shows the peak corresponding to those fractions containing purified p33/p36 proteins. The elution profile for the molecular weight markers is shown by the gray line (a) 450 kDa, (b) 240 kDa, (c) 158 kDa, (d) 68 kDa, (e) 25 kDa, and (f) 12.5 kDa. **c** Below the chromatogram, a Coomassie Blue stained gel from an SDS-PAGE shows the pattern of protein content of some of the obtained fractions. Highly purified p33/p36 proteins were detected from fractions 44 to 47. **d** Western-blot experiment confirmed that p33/p36 were only present in those fractions, which correspond to a discrete peak that shows the same retention factor as the 240 kDa molecular mass marker. These results were reproducible in at least four independent experiments

molecular sizes of these oligomeric forms are just an approximation in the separation procedure, what is evident from these results is that the conditions during this process (pH 7.0 and concentration 0.95 mg/ml) defined, at least, three oligomeric forms of p33/p36.

To further support the idea that p33/p36 assemble to form larger complexes, and to exclude the possibility that the migration of these proteins in the separation methods described above was due to an aberrant behavior because of the putative ‘intrinsic rigidity’ and loss of conformational entropy ascribed to PRPs (Williamson 1994; Tompa 2003), a protein–protein cross-linking experiment was carried out using a purified p33/p36 sample. The results in Fig. 8 indicate that the cross-linking treatment led to the identification of p33/p36 oligomer intermediates, products of their partial association, corresponding to dimers (~72 kDa), trimers (~108 kDa), tetramers (~150 kDa), pentamers

(~190 kDa) and up to hexamers (~226 kDa). This confirms the observations described above and show that p33/p36 proteins are able to associate between themselves to form higher order complexes.

Discussion

PRPs have been implicated in various aspects of plant development, in plant-microbe interactions and in the response to pathogen attack; however, their precise functions remain unknown. It has been suggested that PRPs play a role in structural strengthening or as an oxygen barrier since they are presumably insolubilized in the cell wall matrix (Cassab 1998). More recent data supports the idea that PRPs play an important role, either during plant development or in response to environmental stimuli, by recognition of specific plasma membrane proteins (García-Gómez et al. 2000; Murphy et al. 2002). The results in this work indicate that in response to water deficit, the PRPs p33/p36 are secreted to the cell surface and accumulate in the extracellular matrix without being entirely immobilized in the cell wall. This is evident since upon hyperosmotic treatments p33/p36 not only showed a progressive accumulation in the soluble fraction of the cell wall from bean plant tissues (Covarrubias et al. 1995) and from cell suspension cultures, but also a high proportion of p36 was secreted to the culture medium. This is in direct contrast with the peroxide-mediated mechanism described for the rapid insolubilization of PRPs in French bean and soybean walls after wounding or treatment with elicitors (Bradley et al. 1992; Wojtaszek et al. 1995).

Consistently, we detect very low amounts (or none) of p33/p36 in the cell wall soluble fraction from bean hypocotyls from plants grown under well-irrigated conditions; however, when hypocotyl sections from these plants were analyzed, these proteins were found in the cell corners of the cortex, epidermis, pith and vascular cells, in the phloem but not in mature xylem, suggesting that the proteins immunodetected in these tissues might be immobilized, probably associated in some cases with lignin-rich regions in protoxylem cell walls (Ryser et al. 1997). This localization pattern is lost in the non-elongating regions located towards the base of hypocotyls (M), where the proteins are less abundant and no p33/p36 were detected in the cell corners, rather their distribution appears all around the cells most prominently in the vascular tissue. The abundance of these proteins in the elongating and mature regions of bean hypocotyls correlates with the expression levels found for the PRP2 transcript in soybean

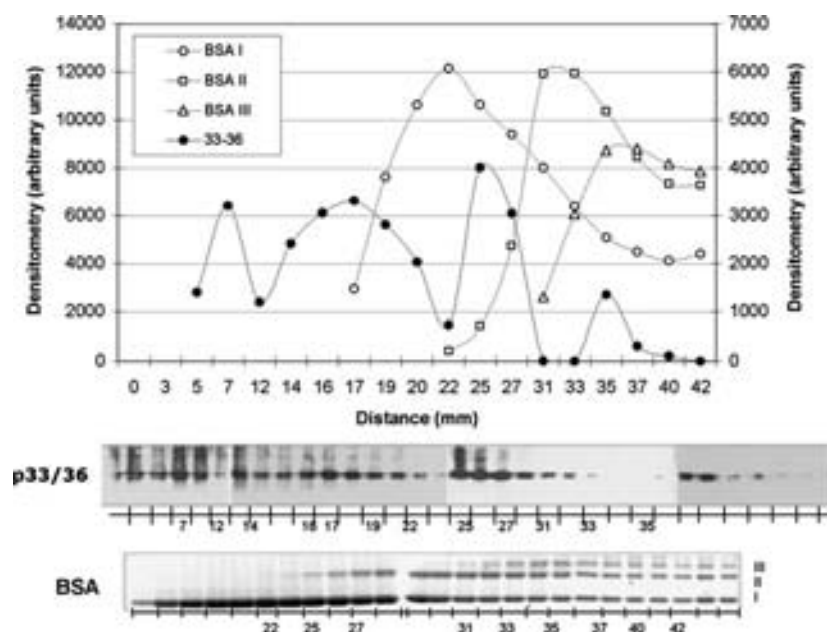


Fig. 7 Sedimentation profile from a sucrose density gradient (5–30%) of purified p33/p36 proteins. Sucrose solutions were prepared in 0.05 M Tris, pH 7.0. The 4.5 ml gradients were layered with 0.1 ml of purified p33/p36 proteins. Fractions of 0.1 ml were collected from top to bottom. Numbers in the *X*-axis correspond to the distance in mm from the top of the gradient, whereas those in the *Y*-axis refer to arbitrary units for the densitometry of p33/p36 Western blot (*left*) or to arbitrary units for the densitometry of molecular mass standards (*right*). The direction of sedimentation goes from left to right. Aliquots of each fraction were mixed with Laemmli sample buffer and analyzed by 12% SDS-PAGE and Western blot using anti-p33/p36 antibody (*middle panel*).

seedlings (Hong et al. 1989), in agreement with the similarity of p33/p36 with the protein deduced from the PRP2 cDNA sequence and their immunological relationship (García-Gómez et al. 2000). In response to water limitation, p33/p36 accumulate to higher levels, while their distribution pattern is conserved in the different hypocotyl regions when compared to that of non-stressed plants. This strong secretion and accumulation in the extracellular matrix of all cell types under low water availability denotes that these PRPs may be involved in the maintenance of cellular integrity (Millar et al. 1992; García-Gómez et al. 2000; Murphy et al. 2002). This role would be compatible with additional functions of the insolubilized proteins during cell wall modifications associated with a decrease in the growth rate, a phenomenon tightly linked to the plant response to water scarcity situations (Bozarth et al. 1987; Nonami and Boyer 1989; Creelman and Mullet 1991; Covarrubias et al. 1995; Marshall et al. 1999). These observations suggest that PRPs can be functionally classified as cross linking- and non-cross linking-PRPs. While the nature of the cross-linking products in these proteins most likely involves intramolecular

Three different oligomeric forms of BSA (high purity quality, Research Organics) were used as molecular mass markers. *Black circles* show the sedimentation profile for p33/p36 proteins, whereas the profiles for BSA monomers (66 kDa), dimmers (132 kDa) and trimmers (198 kDa) are indicated by the *white circles*, *squares* and *triangles*, respectively. Aliquots corresponding to the molecular mass standards were analyzed in a 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (*lower panel*). In both panels, the numbers below denote the distance in mm, from the top of the gradient, that corresponds to the samples in each lane and, from which the densitometry was determined

isodityrosine cross-links and the Val-Tyr-Lys motifs (Kieliszewski and Lamport 1994), the characteristics of the non-crosslinking-PRPs are unknown.

In this work, we present evidence indicating that p33/p36 proteins are able to associate between themselves, in a reversible fashion, to conform oligomers, which might be their functional form in the soluble fraction of the cell wall. Our results also suggest that the ability of these proteins to form oligomers is modulated by the pH of the solution, in which they are analyzed. The gel filtration assay, which was carried out at pH 4.5, showed only one oligomeric form of approximately 240 kDa representing the association of 5–6 monomers of p33/p36. A similar result was obtained when these proteins were subjected to an electrophoretic separation procedure under native conditions (data not shown). In contrast, the separation by sedimentation, performed at pH 7.0, allowed the detection of different oligomeric forms that show increasing molecular masses, consistent with the association between p33/p36 monomers. The different molecular forms resolved in this last procedure, which show apparent molecular masses from, approximately, 30 to

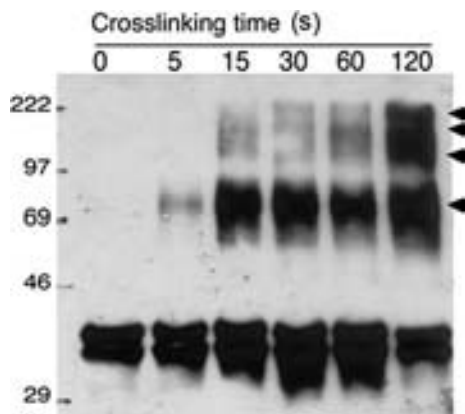


Fig. 8 Crosslinking induced with TdCIRu shows the formation of p33/p36 oligomers. p33/p36 samples in crosslinking buffer plus 1.25 mM TdCIRu and 0.025 mM ammonium persulfate were exposed to white light for different times as indicated (0, 5, 15, 30, 60 and 120 s; for details see [Materials and methods](#)). Samples were subsequently separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with anti-p33 antibody as described in [Materials and methods](#). The migration of the molecular mass markers is indicated to the left of the figure in kDa

200 kDa, might represent different associations between the 33 and/or 36 kDa monomers. While additional experiments are needed to define the precise molecular size and shape of native PRPs, the results in this work support the hypothesis that p33/p36 proteins exist in the plant extracellular matrix as soluble complexes, and these findings establish the basis for a more detailed study. Although at this point it is not possible to define a specific function for the p33/p36 oligomeric forms, their involvement in membrane binding activity is suggested by the results reported by García-Gómez et al. (2000), where a purified fraction corresponding to the p33/p36 oligomer was used for the experiments described.

A noteworthy observation from the immunohistochemical analysis was the high accumulation of these proteins in the phloem vascular tissue, which might be due to the constant osmotic changes the cells in this tissue are exposed to, given their role in the translocation of assimilates and other solutes, whose concentration may be higher when the plant is exposed to water limiting conditions. The possibility that these proteins could be traveling in the phloem sap was eliminated since they were not detected using p33/p36 antibody in phloem sap extracted from bean seedlings grown under hyperosmotic stress imposed by NaCl treatment (data not shown).

Altogether, these results indicate that PRPs, p33/p36, are present in the extracellular matrix in cross linked and non-cross linked forms, which allows them to participate in the dynamic modification of the cell wall throughout the cell elongation and maturation

processes during plant development, and in response to water deficit.

Acknowledgments We thank J. Vázquez (Facultad de Química-UNAM) for allowing the use of the FPLC equipment in his laboratory and E. García-Ramírez (Facultad de Química-UNAM) for technical assistance in p33 and p36 protein purification. We are also grateful to J. L. Reyes and G. Cassab (Instituto de Biotecnología-UNAM) for critical reading of the manuscript and stimulating discussions, to X. Alvarado and P. Rueda (Instituto de Biotecnología-UNAM) for technical support in microscopy techniques and in the obtainment of the *P. vulgaris* cell-suspension culture, respectively, and to E. Mata (Instituto de Biotecnología-UNAM) for animal care during the antibody production. S. Cuéllar and M. Battaglia were supported by a scholarship from DGEP-UNAM. This work was partially funded by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN204496 and CONACyT-México 40603-Q.

References

- Averyhart-Fullard V, Datta K, Marcus A (1988) A hydroxyproline-rich protein in the soybean cell wall. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1082–1085
- Baskin TI, Busby CH, Fowke LC, Sammut M, Gubler F (1992) Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta* 187:405–413
- Bernhardt C, Tierney ML (2000) Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation. *Plant Physiol* 122:705–714
- Bozarth CS, Mullet JE, Boyer JS (1987) Cell wall protens at low water potentials. *Plant Physiol* 85:261–267
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21–30
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48–54
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C (1994) Function of oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein. *Plant Cell* 6:1703–1712
- Cassab GI (1993) Localization of cell wall proteins using tissue-print western blot techniques. *Methods Enzymol* 218:682–688
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 49:281–309
- Castonguay Y, Laberge S, Nadeau P, Vézina L-P (1994) A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins. *Plant Mol Biol* 24:799–804
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Graciarribio A, Covarrubias AA (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* 35:393–405
- Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith C, Covarrubias AA (1999) PvLEA-18, a member of a new Late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* 120:93–103
- Covarrubias AA, Ayala JW, Reyes JL, Hernández M, Graciarribio A (1995) Cell-wall proteins induced by water deficit in

- bean (*Phaseolus vulgaris* L) seedlings. *Plant Physiol* 107:1119–1128
- Creelman RA, Mullet JE (1991) Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new β -tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol Biol* 17:591–608
- Deutch CE, Winicov I (1995) Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Mol Biol* 27:411–418
- Esau K (1965) *Plant anatomy*, 2nd edn. Wiley, New York
- Fancy DA, Kodadek T (1999) Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6020–6024
- Freifelder D (1976) *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology*, Chap. 11. Freeman, San Francisco
- García-Gomez BI, Campos F, Hernández M, Covarrubias AA (2000) Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant J* 22:277–288
- Grabarek Z, Gergely J (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 185:131–135
- Hong JC, Nagao RT, Key JL (1989) Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. *Plant Cell* 1:937–943
- Hong JC, Nagao RT, Key JL (1990) Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis. *J Biol Chem* 265:2470–2475
- Iraki NM, Singh N, Bressan RA, Carpita NC (1989) Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol* 91:48–53
- Jose-Estanyol M, Ruiz-Avila L, Puigdomenach P (1992) A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* 4:413–423
- Kieliszewski MJ, Lamport DTA (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J* 5:157–172
- Kleis-San Francisco SM, Tierney ML (1990) Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol* 94:1897–1902
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Leon P, Planckaert F, Walbot V (1991) Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant Physiol* 95:968–972
- Lillie H, Brown SS (1987) Artifactual immunofluorescent labeling in yeast, demonstrated by affinity purification of antibody. *Yeast* 3:63–70
- Marshall JG, Dumbroff EB, Thatcher BJ, Martin B, Rutledge RG, Blumwald E (1999) Synthesis and oxidative insolubilization of cell-wall proteins during osmotic stress. *Planta* 208:401–408
- Martin RG, Ames BN (1961) A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J Biol Chem* 236:1372–1379
- Menke U, Renault N, Mueller-Roeber B (2000) *StGCRP*, a potato gene strongly expressed in stomatal guard cells, defines a novel type of repetitive proline-rich proteins. *Plant Physiol* 122:677–686
- Millar DJ, Slabas AR, Sidebottom C, Smith CG, Allen AK (1992) A major stress-inducible M_r 42 000 wall glycoprotein of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 187:176–184
- Murphy AS, Hoogner KR, Peer WA, Taiz L (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 128:935–950
- Nonami H, Boyer JS (1989) Turgor and growth at low water potentials. *Plant Physiol* 89:798–804
- Nonami H, Boyer JS (1993) Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. *Plant Physiol* 102:13–19
- Robertson D, Wojtaszek P, Bolwell GP (1999) Stimulation of cell wall biosynthesis and structural changes in response to cytokinin- and elicitor-treatments of suspension-cultured *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol Biochem* 37:611–622
- Ryser U, Schorderet M, Zhao G-F, Studer D, Ruel K, Hauf G, Keller B (1997) Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for repair process mediated by glycine-rich protein. *Plant J* 12:97–111
- Salts Y, Wachs R, Gruissem W, Barg R (1991) Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruits. *Plant Mol Biol* 17:149–150
- Scheres B, Van De Wiel C, Zalensky A, Horvath B, Spaink H, Van Eck H, Zwartkruis F, Wolters AM, Gloudemans T, Van Kammen A, Bisseling T (1990) The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60:281–294
- Shi Q, Jackowski G (1998) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD (ed) *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*, 3rd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 1–50
- Shong J, D'Ovidio R, Mehdy MC (1991) Negative and positive regulation of novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant J* 1:345–354
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9–23
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paedez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306:2206–2210
- Subramaniam K, Ranie J, Srinivasa BR, Sinha AM, Mahadevan S (1994) Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* 14:207–210
- Tompa P (2003) Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *Bioessays* 25:847–855
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354
- Van De Wiel C, Scheres B, Franssen H, Van Lierop M-J, Van Lammeren A, Van Kammen A, Bisseling T (1990) The early nodulin transcript *ENOD2* is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J* 9:1–7
- Verdoy D, Lucas MM, Covarrubias AA, De Felipe MR, Pueyo JJ (2004) Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Cell Environ* 27:757–767
- Vignols F, José-Estanyol M, Caparrós-Ruiz D, Rigau J, Puigdomènec P (1999) Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localization. *Plant Mol Biol* 39:945–952
- Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S (1997) Changes in amounts and molecular mass distribution of cell-wall polysaccharides of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles under water stress. *J Plant Physiol* 151:33–40
- Williamson MP (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 297:249–260

- Wilson RC, Long F, Maruoka EM, Cooper JB (1994) A new proline-rich early nodulin from *Medicago trunculata* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* 6:1265–1275
- Wojtaszek P, Bolwell GP (1995) Secondary cell-wall-specific glycoprotein(s) from french bean hypocotyls. *Plant Physiol* 108:1001–1012
- Wojtaszek P, Trethowan J, Bolwell GP (1995) Specificity in the immobilisation of cell wall proteins in response to different elicitor molecules in suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* 28:1075–1087
- Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ (1996) Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol* 111:765–772
- Wyatt RE, Nagao RT, Key JL (1992) Patterns of soybean proline-rich protein gene expression. *Plant Cell* 4:99–110
- Ye Z-H, Song Y-R, Marcus A, Varner JE (1991) Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant J* 1:175–183