



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA LEA 4 DE MAÍZ EN RESPUESTA A
ESTRÉS HÍDRICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBT Jesús Alejandro Zamora Briseño

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Estela Sánchez Quintanar
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Jorge Nieto Sotelo
Instituto de Biología, UNAM

MÉXICO, D. F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo a mi madre y a mi padre, Socorro y Mario, porque han hecho posible el hombre quien soy: el hijo más orgulloso de sus padres. A mi madre le debo el interés y amor por las plantas, el cual me fue enseñado desde cada rincón de su jardín (nuestro jardín) y a mi padre, el ingenio y el sentido crítico con el que disfruté instruirme durante las largas y apasionantes jornadas en el mejor laboratorio en el que he trabajado: su carpintería. Gracias infinitamente por su apoyo incondicional, comprensión y amor. Los amo.

Debo afirmar con ahínco que debo el inicio y la conclusión de este trabajo a los motivos más grandes que tengo en la vida: mi esposa Sandi y mi hijo, Alejandro. A tí mi San, por ser incomparablemente paciente con mis sueños largos y delirantes que sólo tú has podido tolerar gracias a tu amor incuantificable. Gracias por ser el pilar de mi vida y creer en mí siempre, tanto como yo creo en tí. Te adoro por todo eso y porque sin tí, mi mejor clonación no hubiera podido ser posible: nuestro hijo. Gracias hijo porque a tus 3 años supiste entender que papá tenía que ir a su kínder al que le llamaste potollo (laboratorio). Los amo.

Exclusivo reconocimiento te debo Marito. Porque me has sabido dar el cariño más cercano de entre todos mis hermanos y por ser tú el que mejor comprende mis anhelos. Gracias por la confianza depositada en mí, todos estos años y por tolerar mis malos comportamientos como tu hermano menor. Y aunque no me creas, gracias por enseñarme más de lo que imaginas. También gracias por darme una cuñada tan cercana como Iulia. Gracias Iulia por ser una verdadera familia y por apoyarme tanto.

Especial agradecimiento le debo a mi suegra doña Cheli, por su cariño de madre y por su instintivo deseo de hacer de su hija la mejor de las mujeres, sin lo cual esta historia no hubiera sido la misma. Por apoyarme incondicionalmente, gracias.

Les doy gracias a mis sobrinos, por enseñarme que debo esforzarme para ser el mejor ejemplo para ustedes. Gracias por mostrarme de fuente directa ese sentido intrínseco que nos hace ser científicos por naturaleza: la curiosidad.

Gracias a José y a Juan, por acordarse de mí y desearme buenos deseos.

Agradezco a todos mis amigos, mis muy queridos amigos del laboratorio 103 y del conjunto E, cuyos nombres no doy para que no me reclamen por el orden de aparición (cual si fuera esto un artículo), pero que sé que todos ellos saben quiénes son. Les agradezco por compartir conmigo las intensas jornadas llenas de aprendizajes, pláticas, conflictos, alegrías, felicidad... pero sobre todo, por enseñarme que aunque raros de encontrar, existen todavía personas buenas dispuestas a crear ambientes llenos de amistad verdadera, de esa amistad que sólo la entiendes cuando la vives. Gracias por mostrarme un mundo pensado desde nuevas perspectivas. Gracias infinitamente por ser mis amigos.

Este trabajo se lo dedico también a la Dra. Estela, en reconocimiento a su paciencia ante la necesidad de un joven escéptico. Gracias por darme geniales muestras de sutil liderazgo. Gracias por permitirme ser parte de su historia y usted de la mía.

A la UNAM, por ser el espacio más brillante que he conocido.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Estela, por su valiosa dirección en este proyecto.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Alejandra y el Dr. Jorge Nieto que con sus críticas severas y acertivas hicieron cambios profundos y positivos en la estructura de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca (No. 512028419) y a los recursos otorgados para el desarrollo de este proyecto.

Dra. Alejandra por la donación del plásmido pTrc99a.

Al Conjunto E, por servir de soporte en infraestructura y material humano en el que se llevó a cabo este trabajo.

A los miembros del comité jurado asignado por revisar y aportar sugerencias al presente trabajo, el cual quedó constituido por:

Presidente	Dra. Rosario Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Rosario Vera Estrella	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Claudia Díaz Camino	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Norma Adriana Valdez Cruz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

A mi bello y contrastante país.

RESUMEN

Las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA), constituyen una familia de proteínas asociadas con la tolerancia a la desecación y se acumulan abundantemente en las últimas etapas del desarrollo de las semillas. En el presente trabajo, se analizó una proteína de maíz que es hidrofílica e intrínsecamente desordenada según las predicciones bioinformáticas y que pertenece al grupo de las proteínas LEA 4 de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Además, su región amino terminal se predijo que tiende a formar estructuras hélices alfa. Se encontró una correlación positiva entre la acumulación de esta proteína y las dehidrinas durante la desecación del grano. Por otra parte, esta proteína se induce por la aplicación exógena de ABA en embriones inmaduros de maíz, no así en embriones somáticos. También se encontró que desaparece después de unas horas post-imbibición, de manera similar a como ocurre con las dehidrinas y durante este periodo, es regulada positivamente por ácido abscísico y negativamente por giberelinas. Por último, la LEA 4 se acumula únicamente en raíz en respuesta a estrés osmótico, lo cual sugiere una función asociada a la tolerancia a estrés por sequía.

ABSTRACT

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins, constitute a family of proteins associated with desiccation tolerance, abundantly accumulated in seeds during the late stages of development. In the present work we analyzed a maize protein predicted to be highly hydrophilic and intrinsically disordered, that seems to belong to the LEA group 4 proteins based on their amino acid sequence. Moreover, its amino-terminal region was predicted to be highly hydrophilic and with tend to form amphiphilic alpha helix structures. Positive correlation was found between the accumulation of this protein and dehydrins during the desiccation process that takes place through the maize seed development. Indeed, this putative LEA 4 protein was induced by exogenous abscisic acid in immature embryos, but not in somatic embryos. Further, this protein disappears after some post imbibition hours, likewise to dehydrins and it is positively modulated by abscisic acid and negatively by gibberellins during imbibition. Furthermore, this protein was found just to be accumulated in osmotic maize stressed roots, strongly suggesting a role associated with abiotic stress tolerance.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abcísico
APS	Persulfato de amonio
BAP	Bencil amino purina
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CDS	Casete de expresión
DAP	Días posteriores a la polinización
DC	Dicroísmo circular
DRE	Elemento de respuesta a la deshidratación (Dehydration responsive element)
DREB	Factor transcripcional de unión a DRE (DRE binding transcription factor)
DTT	Ditioeritrol
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformación de Fourier
GA₃	Ácido giberélico
GRAVY	Promedio de hidropaticidad
GST	Glutation S-transferasa
IDR	Región intrínsecamente desordenada
IPTG	Isopropil tiogalactósido
LEA	Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (Late embryogenesis abundant protein)
MYB	Factor transcripcional de la familia MYB. Derivan de los factores clásicos c-MYB
MYC	Factor transcripcional con similitud a los factores oncogénicos tipo Myc
N₂	Nitrógeno molecular
NAC	Factor de transcripción de la familia NAC
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFAM	Familia de proteínas (Protein family)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
RAB	De respuesta a ABA (Responsive to ABA)
RWC	Contenido relativo de agua
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida con SDS
SMP	Proteína de la maduración de la semilla (Seed maturation protein)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TFE	Trifluoroetanol
WB	Western blot

LISTA DE ABREVIATURAS

AMINOÁCIDO	CÓDIGO DE UNA LETRA
Alanina	A
Cisteína	C
Ácido aspártico	D
Ácido glutámico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Lisina	K
Leucina	L
Metionina	M
Asparagina	N
Prolina	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Triptofano	W

UNIDADES

SÍMBOLO	UNIDAD
A_{215} , A_{225} , $A_{280\text{nm}}$	Absorbancia a 215, 225 ó 280 nanómetros
°C	grado Celsius
$DO_{600\text{nm}}$	Densidad óptica a 600 nanómetros
g	gravedad
g	gramos
h	hora
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
L	litro
M	molar
min	minuto
mM	milimolar
ng	nanogramo
μL	microlitro
μM	micromolar
pb	pares de base
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
V	volt

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La sequía y su impacto en la agricultura	1
1.2. Estrategias para combatir la sequía en la agricultura	2
1.3. La respuesta de las plantas a la falta de agua	2
1.4. Semillas ortodoxas y la resistencia a la desecación	2
1.5. Desarrollo y maduración de semillas de maíz	2
2. Antecedentes	4
2.1. Características generales de las proteínas LEA	4
2.2. Proteínas intrínsecamente inestructuradas (IUPs).....	4
2.3. Proteínas LEA en otras formas de vida	5
2.4. Papel bioquímico de las proteínas LEA	5
2.5. Clasificación de proteínas LEA	6
2.6. Proteínas LEA del grupo 1	7
2.7. Proteínas LEA del grupo 2	7
2.8. Proteínas LEA del grupo 3	8
2.9. Proteínas LEA del grupo 4	8
2.10. Proteínas LEA del grupo 5	9
2.11. Proteínas LEA del grupo 6	9
2.12. Proteínas LEA del grupo 7.....	9
2.13. Proteínas LEA del grupo 4 y su relación con el estrés	9
3. Hipótesis	10
4. Objetivos	10
4.1. General	10
4.2. Específicos	10
5. Materiales y métodos.....	11
5.1. Esquema general de la estrategia experimental	11
5.2. Análisis bioinformático	11
5.3. Obtención de anticuerpos policlonales anti-LEA 4	12
5.3.1. Optimización de codones y síntesis de la secuencia	12
5.3.2. Preparación de células Ca ⁺⁺ competentes	12
5.3.3. Transformación de células Ca ⁺⁺ competentes por choque térmico.....	13
5.3.4. Transformación de células electrocompetentes	13
5.3.5. Minipreparaciones de plásmido por lisis alcalina	13
5.3.6. Clonación del marco abierto de lectura de la LEA 4 en pGEX 4T2	14
5.3.7. Inducción de la proteína recombinante con IPTG	16
5.3.8. Resolución de proteínas en geles de SDS-PAGE	16
5.3.9. Purificación de la proteína recombinante GST-LEA 4	17
5.3.10. Protocolo de inmunización de los conejos con la LEA 4 .	
5.3.11. Inmunodetección de la proteína LEA	17
5.3.12. Eliminación de GST de la proteína recombinante	19
5.3.13. Evaluación del título, inmunoselectividad e inmunoespecificidad	
5.3.14. de los anticuerpos	20
5.3.15. Clonación del gen <i>lea 4</i> en pTrc99a	20
5.3.16. Transformación y escrutinio de <i>E. coli</i> BL21 codón plus con pTrc99a- <i>lea 4 e</i> inducción de LEA 4 recombinante	21
5.3.17. Purificación de la LEA 4 recombinante con calor y TCA	22
5.4. Caracterización de la proteína LEA 4 en diferentes etapas de desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales.....	22

5.4.1.	Extracción de proteínas totales de ejes de maíz	22
5.4.2.	Solubilidad de la proteína LEA 4 de maíz con calor y TCA	22
5.4.3.	Evaluación de la proteína LEA 4 en la embriogénesis zigótica	23
5.4.4.	Expresión e inducción de la LEA 4 en la post-imbibición	23
5.4.5.	Inducción de la LEA 4 en la post-imbibición en respuesta a AG ₃ y ABA	25
5.4.6.	Inducción de la LEA 4 en la embriogénesis en respuesta a ABA	25
5.4.7.	Localización de la proteína LEA 4 en los diferentes tejidos de la carióspside	26
5.4.8.	Análisis de la proteína LEA 4 en tejidos vegetativos	26
5.4.9.	Evaluación de la presencia de la LEA 4 en la embriogénesis somática	27
6.	Resultados.....	29
6.1.	Análisis <i>in silico</i>	29
6.2.	Producción de la proteína recombinante GST-LEA 4 y obtención de anticuerpos policlonales anti-LEA 4.....	33
6.3.	Determinación de la termoacidolubilidad de la LEA 4 en ejes de maíz quiescentes	39
6.4.	Obtención de la LEA 4 recombinante	39
6.5.	Perfil de la expresión de la LEA 4 durante la embriogénesis zigótica y la imbibición.....	41
6.6.	Efecto del GA ₃ y ABA sobre la expresión de la LEA 4 durante la imbibición	43
6.7.	Inducción de la LEA 4 por ABA en embriones inmaduros	44
6.8.	Localización de la LEA 4 en diferentes tejidos de la carióspside quiescente	45
6.9.	Evaluación de la proteína LEA 4 en la embriogénesis somática.....	47
6.10.	Análisis de la proteína LEA 4 en tejidos vegetativos en respuesta a estrés hídrico	48
7.	Discusión	51
7.1.	La LEA 4 es aparentemente intrínsecamente desordenada	51
7.2.	La LEA 4 presenta un patrón de acumulación canónico y responde a sequía.....	56
8.	Conclusión	61
9.	Perspectivas	61
10.	Bibliografía	62

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Diferentes nomenclaturas creadas para los grupos de proteínas LEA	6
Cuadro 2. Predicción con New PLACE de los elementos de unión a factores de transcripción en la región promotora putativa del gen que codifica para la LEA 4 en maíz	31
Figura 1. Perfil de hidropatía y predicción del desorden de la proteína LEA 4 de maíz	29
Figura 2. Predicción de la estructura secundaria de la proteína LEA 4, localización del motivo pFam03760 y distribución de aminoácidos cargados	30
Figura 3. Mapeo de los genes que codifican para proteínas que contienen el Pfam No.: F03760 en el genoma del maíz B73	30
Figura 4. Árbol filogenético de las proteínas LEA 4	32
Figura 5. Construcción del vector pGEX 4T2- <i>lea 4</i>	33
Figura 6. Escrutinio de transformantes de <i>E. coli</i> BL21 codón plus con el pGEX 4T2- <i>lea 4</i>	34
Figura 7. Lisados de <i>E. coli</i> BL21 transformadas con pGEX 4T2, inducidas con IPTG 1 mM y resueltas en SDS-PAGE al 16%	34
Figura 8. Evaluación de las condiciones de inducción de la proteína de recombinante	35
Figura 9. Purificación de la proteína de fusión GST-LEA 4 resuelta por SDS-PAGE al 16 %.....	35
Figura 10. Reactividad de anticuerpos endógenos de conejo frente a proteína total de ejes quiescentes de maíz	36
Figura 11. Eliminación del tag de GST con trombina	37
Figura 12. Reactividad del anticuerpo frente a proteína recombinante purificada	37
Figura 13. Ensayo de inmunodetección de LEA 4 en un gradiente de proteínas de eje quiescente de maíz resueltas en SDS-PAGE al 16%	38
Figura 14. Ensayo de competencia con un gradiente de 5 a 20 µg de proteína total de eje quiescente de maíz	38
Figura 15. Termoacidosolubilidad de la LEA 4	39
Figura 16. Esquema general de la construcción pTrc99a- <i>lea 4</i>	40
Figura 17. Escrutinio de transformantes por PCR	40
Figura 18. Inducción de la proteína LEA 4 recombinante y su purificación mediante choque térmico y TCA al 3%	41
Figura 19. Perfil de la proteína LEA 4 en el desarrollo de la cariósida y la imbibición.....	42
Figura 20. Expresión del mRNA de la LEA 4 a diferentes horas post-imbibición en ejes de maíz de 12, 24, 36 y 48 h post-imbibición	42

Figura 21. Acumulación de la LEA 4 a diferentes horas post-imbibición y su relación con el contenido de agua de cariósides expuestas a dosis de AG ₃ y ABA	43 y 44
Figura 22. Inducción de la proteína LEA 4 en embriones de 21 dpp en respuesta a ABA	45
Figura 23. Acumulación de la LEA en diferentes secciones de la cariósides de maíz 15 horas posteriores a la imbibición.....	46
Figura 24. LEA 4 en callos embriogénicos de maíz	47
Figura 25. Análisis de la LEA en tejidos vegetativos de plantas de maíz en estrés hídrico	48 y 49

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA SEQUÍA Y SU IMPACTO EN LA AGRICULTURA.

La sequía es una característica recurrente del clima, aunque a veces sea considerado un acontecimiento raro o azaroso. Ocurre virtualmente en todas las zonas climáticas, pero sus características varían perceptiblemente de una región a otra; por tanto, la sequía, como tal, es un fenómeno temporal, a diferencia de la aridez que se restringe a las regiones con escasa precipitación y que constituye una característica permanente del clima, como es el caso de las regiones desérticas (Contreras-Servín, 2005).

Hay dos formas de definir el término sequía: conceptual y operacionalmente. Conceptualmente, la sequía es un déficit significativo en la disponibilidad de agua debido a lluvias menores de lo normal (Bravo y Salinas, 2006), sin referir nada acerca de la realidad climática del área afectada. Las definiciones operacionales, en cambio, precisan el momento de inicio, finalización e intensidad de la misma. Dependiendo de la perspectiva desde la que se considere, la sequía se define en 4 categorías diferentes: meteorológica, hidrológica, agrícola y socioeconómica (Marcos-Valiente, 2001; Contreras-Servín, 2005). La sequía meteorológica se caracteriza por la ausencia prolongada de lluvias en periodos que normalmente serían lluviosos (Núñez *et al.*, 2007). Hidrológicamente, la sequía se define en función del abatimiento de los escurrimientos superficiales, los embalses y los acuíferos (Marcos-Valiente, 2001). En cambio, es agropecuaria, cuando todo lo anterior afecta el desarrollo fenológico de los cultivos (Bravo-Peña, *et al.*, 2009). Finalmente se hace referencia a la sequía socioeconómica cuando la sequía se relaciona con la demanda de algún bien económico en respuesta a elementos de meteorológicos, hidrológicos y agrícolas (Contreras-Servín, 2005). En este trabajo, se empleará el término sequía para referirse a la sequía agrícola.

La sequía como factor individual, es el agente que más reduce la producción global de los cultivos (Castiglioni, *et al.*, 2008), favoreciendo la desertificación y la salinización de los suelos, con la subsecuente pérdida de su uso agrícola. Se estima que cerca del 20% de las tierras irrigadas del mundo están afectadas por los altos niveles de sal y se espera que esta cifra aumente hasta el 50% para el año 2050 (FAO, 2004; Vinocur y Altman, 2005). Esto mismo se estima que sucederá en la mayor parte de la zona central y sur de México

(CEPAL, 2007). De hecho, hoy en día para México la sequía representa el mayor problema agrícola y afecta a más de la mitad del territorio (Rojas-Garcidueñas, 2003).

1.2. ESTRATEGIAS PARA COMBATIR LA SEQUÍA EN LA AGRICULTURA

Las estrategias para contender con la falta de agua en los cultivos agrícolas pueden ser de diversa índole y van desde mejorar la capacidad de uso y retención del agua en el sistema agrícola, aumentar la absorción de agua mediante sustratos determinados, adaptar la densidad de siembra, usar biofertilizantes, emplear policultivos hasta mejorarlos genéticamente. Aunque todas estas estrategias se complementan, sin duda alguna, la última es una de las alternativas más usadas para adaptar los cultivos bajo condiciones de sequía (Frahm *et al.*, 2003). De ahí la relevancia de entender los mecanismos que les permiten a las plantas soportar estos desafíos.

1.3. LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LA FALTA DE AGUA

Las plantas, como organismos sésiles, están permanentemente expuestas a enfrentar problemas de disponibilidad de agua. Por ello, poseen adaptaciones que les permiten sobrevivir a esas condiciones de estrés, el cual a su vez es entendido como cualquier cambio en la condición o condiciones que afectan la homeostasis y que requieren ajustes morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, mediante aclimatación (Andjelkovic y Thompson, 2004; Shulaev, *et al.*, 2008). Por ejemplo, cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación con efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Además, ocurren cambios moleculares y celulares, como la inducción de genes de respuesta a estrés. En general, los productos de los genes inducibles por estrés pueden agruparse en dos categorías: los que regulan la expresión de genes y la transducción de señales y los que directamente protegen contra el estrés (Hasegawa *et al.*, 2000). Siguiendo esta clasificación, en el primer grupo se incluyen los productos de genes: los que codifican para factores de transcripción, tales como los factores de respuesta a deshidratación (DREB) y los factores de unión a C repetidas (CBF) (Wang *et al.*, 2003), mientras que en el segundo, se encuentran los genes implicados en la biosíntesis de azúcares solubles y otros solutos compatibles (Hayashi *et al.*, 1997; Garg *et al.*, 2002; Abebe *et al.*, 2003; Yue, *et al.*, 2012), así como los genes que codifican para proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés, *LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT*), que aunque aún se desconocen sus blancos y el

mecanismo exacto a través del cual operan, se piensa que actúan protegiendo biomoléculas y componentes celulares.

1.4. SEMILLAS ORTODOXAS Y LA RESISTENCIA A LA DESECACIÓN

Las plantas con semillas o espermatofitas se caracterizan por la formación de la semilla, una estructura originada del óvulo fertilizado que incluye al embrión y a otros tejidos maternos derivados (Carbajosa y Carbonero, 2005). El desarrollo de la semilla es un proceso intrincado que implica a la embriogénesis (división celular y morfogénesis), seguida de una fase de maduración que incluye la acumulación de productos de reserva, la supresión de la germinación precoz, la adquisición de la tolerancia a sequía, pérdida de agua y, frecuentemente, la inducción de la dormancia y el estado quiescente (Harada, 1997). A las semillas que adquieren tolerancia a la desecación durante el desarrollo y que pueden ser almacenadas en el estado seco por periodos y condiciones definidas de tiempo, se les llama semillas ortodoxas, como las cariósides de maíz, mientras que las que no pasan por este estado se les denomina semillas recalcitrantes (Roberts, 1973). Quizá una de las habilidades más llamativas de las semillas ortodoxas es su capacidad para disminuir el contenido de agua hasta niveles de desecación severa (Ming-der, *et al.*, 2008), que pueden alcanzar 5 a 10% y frecuentemente, más allá del 1 al 5% de contenido de agua, con poca o ninguna pérdida de viabilidad (Manfre, *et al.*, 2008). Cuando esto ocurre, el citoplasma se condensa y los componentes intracelulares llegan a estar más aglomerados. Estas condiciones propician interacciones indeseables que pueden generar la agregación y la desnaturalización de proteínas y la fusión de organelos y membranas celulares (Hoekstra *et al.*, 2001). Curiosamente, los mecanismos de resistencia a la desecación en semilla incluyen algunos de los mecanismos de resistencia a estrés hídrico de tejidos vegetativos (Dickie y Pritchard, 2002), más otros sofisticados sistemas de protección.

1.5. DESARROLLO Y MADURACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ

En maíz se distinguen 6 etapas de desarrollo reproductivo: R1, R2, R3, R4, R5 y R6. La R1 inicia cuando los pelos (pistilos) son visibles fuera de la hoja envolvente, en cuya etapa se lleva a cabo la fertilización. En R2, los pelos se oscurecen, la radícula, el coleóptilo y la primera hoja embrionaria ya están formadas. Esta etapa abarca desde la primera semana después de la polinización (dap), hasta los primeros 18. De los 18 a 22 ocurre R3, caracterizada por la acumulación de almidón en el endospermo y el rápido crecimiento. El embrión se distingue y los materiales de la cubierta de la mazorca comienzan a desecarse.

La siguiente etapa abarca de los días 24 al 28 y en ella continúa la acumulación de almidón hasta llegar a una consistencia pastosa, hay 4 hojas embrionarias y el embrión aumenta considerablemente de tamaño. Justo al finalizar esta etapa, la parte superior de la cariósida comienza a desecarse y se forma la última hoja embrionaria. Del día 35 al 42 dap, ocurre la etapa R5 y en ella, las semillas comienzan a desecarse desde la parte superior hacia el embrión, sin alcanzarlo. También aparece una línea de almidón a lo largo de la semilla. Finalmente, la madurez fisiológica llega con la R6 (55-65 dap). Aquí se alcanza la mayor desecación de la semilla y se forma una capa café (Ritchie *et al.*, 1993).

La etapa de maduración temprana y media es dominada por la acción del ácido abscísico (ABA), el cual es inicialmente sintetizado por los tejidos maternos y posteriormente (aunque en menor medida) en el embrión y en endospermo (Nambara *et al.*, 2003). La transcripción de los genes de las proteínas de almacenamiento de las semillas ocurre principalmente durante este periodo. Luego, los niveles de ABA disminuyen y durante la maduración tardía se sintetizan las proteínas Abundantes de la Embriogénesis Tardía (LEA) que están asociadas al proceso de deshidratación y la adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas, así como en polen, plantas anhidrobióticas y tejidos vegetativos durante déficit hídrico (Carbajosa y Carbonero, 2005; Wise y Tunnacliffe, 2004; Battaglia, *et al.*, 2008; Olvera-Carrillo, *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PROTEÍNAS LEA

Las LEA son una familia de proteínas hidrofílicas, generalmente citosólicas (aunque también se las ha encontrado en diversos compartimentos subcelulares), tienen estabilidad térmica, alto contenido de G, A y S, carga positiva neta e inestructuración intrínseca en solución (Wise y Tunnacliffe 2004; Battaglia *et al.*, 2008). Generalmente son proteínas pequeñas de 10 a 30 KDa, que se acumulan abundantemente en las últimas etapas de la maduración de la semilla, pudiendo representar más del 4% de la proteína total, y luego desaparecen en la germinación (Galau, *et al.*, 1986; Roberts *et al.*, 1993; He *et al.*, 1996).

2.2. PROTEÍNAS INTRÍNSECAMENTE INESTRUCTURADAS (IUPs)

El plegamiento de una proteína es el proceso por el que una cadena polipeptídica hace la transición entre un estado desplegado o desnaturalizado hacia su plegamiento nativo

(Anfinsen, 1973). Lo anterior, junto con el paradigma pre-establecido de que la función de las proteínas está determinada por su estructura tridimensional (Campos *et al.*, 2011), hacen pensar que cualquier proteína que no esté plegada carece de función. Sin embargo, en años recientes, se han identificado numerosas proteínas que no forman estructuras globulares o bien, estructuras tridimensionales definidas en solución acuosa que, no obstante, poseen funciones biológicas críticas (Cortese, *et al.*, 2005), por ejemplo, señalización, marcaje y unión a DNA (Wright, 1999; Tompa, 2002; Uversky, 2002). Estas proteínas son denominadas proteínas intrínsecamente inestructuradas o proteínas desordenadas (IUPs o IDPs). Por análisis genómicos, se estima que más del 8% de las proteínas de los proteomas procariontes son al menos parcialmente desordenadas, mientras que esta cifra aumenta por encima del 31% en los eucariontes. Lo anterior, en respuesta a que la proporción de IUPs, incrementa con la complejidad de los organismos y son más frecuente los productos de genes que no son constitutivos (Fink, 2005). La sensibilidad a la proteólisis enzimática, la migración aberrante en electroforesis SDS-PAGE o la insensibilidad a condiciones desnaturizantes, son algunas pautas para asignar la falta de estructura de una IUP (Alves *et al.*, 2005; Iakoucheva *et al.*, 2001). La caracterización definitiva de desorden incluye métodos como la espectropolarimetría DC, la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), difracción de rayos X de ángulos cortos, mediciones hidrodinámicas y espectroscopía infrarroja. En términos generales, las proteínas LEA son proteínas intrínsecamente inestructuradas (IUPs).

2.3. PROTEÍNAS LEA EN OTRAS FORMAS DE VIDA

Aunque la mayor parte de proteínas tipo LEA se han encontrado en plantas, existen genes y proteínas tipo LEA en otros tipos de organismos. Por ejemplo, en el nemátodo anidrobiótico *Aphelenchus avenae*, el gen *Aav-lea-1*, que codifica a una proteína tipo LEA 3, es regulada positivamente por desecación estrés osmótico, pero no por frío, calor o estrés oxidante (Browne *et al.*, 2002, 2004). A diferencia del anterior, el nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* que es sólo parcialmente tolerante, expresa el gen *Sf-LEA 1-like* en respuesta a deshidratación (Gal *et al.*, 2003), el cual posee ortólogos en otros organismos, tales como bacterias (*Deinococcus radiodurans* y *Bacillus subtilis*), el quironómido *Polypedilum vanderplanki*, el camarón de mar *Artemia*, diferentes especies de nematodos, rotíferos y cianobacterias (Hundertmark e Hinch, 2008).

2.4. PAPEL BIOQUÍMICO DE LAS PROTEÍNAS LEA

Aunque se asume que las proteínas LEA juegan un papel crucial en la tolerancia a la deshidratación celular, sus funciones bioquímicas son desconocidas (Hincha y Thalhammer, 2012). Por estudios espectroscópicos basados en Espectroscopía Infrarroja con Transformación de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) se ha propuesto que las regiones ricas en α hélices son capaces de interactuar con las membranas lipídicas en condiciones de deshidratación (Koag *et al.*, 2003; Popova, *et al.*, 2011; Thalhammer, *et al.*, 2010). Mediante ensayos *in vitro* empleando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmobilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), se demostró que las proteínas PM1 y PM9 (LEAs 4) de *Glycine max*, tienen capacidad de atrapar Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} . Además, tanto PM1 como PM9 unidas a Fe^{3+} capturan radicales hidroxilo, lo cual puede ser relevante para disminuir el daño por estrés oxidante (Guobao, *et al.*, 2011). Mediante ensayos de pérdida de actividad enzimática de enzimas sensibles a ciclos de congelamiento-descongelamiento (como la citrato sintasa) se ha podido estimar la capacidad proteo-protectora de ciertas proteínas LEA. Lo anterior ha permitido proponer que las proteínas LEA actúan de manera diferente a las chaperonas y a los agentes químicos osmoprotectores como la glicina betaína y en cambio, razón por la que se propone que se consideren escudos moleculares (Goyal, *et al.*, 2005; Chakrabortee, *et al.*, 2012). Quizá lo que más apoya la idea de su participación como moléculas de respuesta a estrés, son las conclusiones de los numerosos trabajos de genética funcional en los que han sobre-expresado o silenciado genes LEA, logrando de esta forma incrementar o disminuir la resistencia a la sequía y salinidad, tal como en los trabajos de Xu *et al.*, 1996, Xiong, *et al.*, 2007 y Olvera *et al.*, 2010. En *A. thaliana* también se han sobre-expresado otras proteínas LEA como la RAB 17 y la RAB 18 ambas de maíz, la COR47 (pTP9), LTI29, LTI30 (pTP10) de *A. thaliana* o la WsS19 (LEA 3) de trigo y en todos los casos han aumentado la tolerancia a déficit hídrico, salino o frío (Ndong *et al.*, 2002). En un trabajo reciente, se sobre-expresó el gen OsLEA3-2 y se encontró que generó tolerancia a estrés osmótico en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *O. sativa* (Duan, *et al.*, 2012). No obstante, estos trabajos, fuera de asociar su innegable participación en la respuesta a estrés abiótico, no han aportado más detalles sobre su función molecular.

2.5. CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS LEA

Por diversas razones, la tarea de clasificar estas proteínas no ha sido sencilla, en principio, debido a la falta de conocimiento sobre su función exacta. El nombre asignado de proteínas LEA refleja el hecho de que originalmente se describieron proteínas acumuladas en altos

niveles durante las últimas etapas del desarrollo embrionario (post-abscisión) en semillas. Como en esta etapa de desarrollo las semillas ortodoxas adquieren tolerancia a la desecación, estas proteínas se asociaron con esta característica (Tunnacliffe y Wise, 2007). Como resultado de los estudios llevados a cabo en organismos diferentes a las plantas, el concepto de qué constituye una proteína LEA ha llegado a ser incierto y ha generado que la clasificación de las proteínas solamente con base al perfil de expresión sea arriesgada y refutada cada vez que se descubre una excepción. Tan sólo en plantas, muchas proteínas LEA se inducen no sólo en tejidos embrionarios o en respuesta a estrés hídrico; inclusive algunos genes que codifican proteínas LEA son expresados constitutivamente (Wise, 2003). Mientras que la nomenclatura es insatisfactoria en plantas, su categorización es incluso más problemática cuando se trata de proteínas semejantes a LEA en organismos no vegetales. Claramente, la idea de definir una proteína de nemátodo, por ejemplo, en referencia a la expresión de proteínas de semillas de plantas, es absurda (Tunnacliffe y Wise, 2007). Otra dificultad radica en la heterogeneidad de las secuencias de las proteínas catalogadas como LEA (Battaglia *et al.*, 2008), lo que ha provocado la creación de diferentes clasificaciones con base a diferentes estrategias (Cuadro 1).

Cuadro 1. Nomenclaturas creadas para los grupos de proteínas LEA (tomado de He, *et al.*, 2012).

Pfam no.	Pfam	Dure	Battaglia	Bray	Bies-Ethève	Proteína representativa
PF00477	LEA_5	D-19	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	<i>TaEm</i> de trigo
PF00257	Dehidrina	D-11	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	<i>Dhn1</i> de trigo, <i>PMI2</i> de soya
PF02987	LEA_4	D-7 o D-29	Grupo 3	Grupo 3 o 5	Grupo 3	<i>EcP63</i> de zanahoria, <i>HvAl</i> de cebada
PF03760	LEA_1	D-113	Grupo 4	Grupo 4	Grupo 4	<i>Le25</i> de tomate
PF04927	SMP	D-34	Grupo 5A	Grupo 6	Grupo 5	<i>EcP31</i> de zanahoria
PF03242	LEA_3	D-73	Grupo 5B	-	Grupo 6	<i>AtDI21</i> Arabidopsis
PF03168	LEA_2	D-95	Grupo 5C	-	Grupo 7	LEA 14-A de algodón
PF10714	LEA_6	-	Grupo 6	-	Grupo 8	<i>PvLEA18</i> de frijol
PF02496	ABA_WDS	-	Grupo 7	-	-	<i>Asr1</i> de tomate, <i>Lp3-3</i> de pino

En el presente trabajo, la descripción de las características generales de estas proteínas se hizo con base a la clasificación de Battaglia *et al.*, 2008, por considerarla la más completa con respecto a las previamente propuestas.

2.6. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 1

Estas proteínas (también conocidas como proteínas Em) contienen una gran proporción de residuos cargados que, junto con su alto contenido de residuos de glicina (aproximadamente 18%), contribuye a su alta hidrofiliia. Además, se caracterizan por poseer gran similitud de secuencia, especialmente en el motivo 20-mer (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]), el cual puede estar en varias copias en tándem (de una a cuatro en especies vegetales, hasta más de ocho en otros organismos) (Battaglia *et al.*, 2008). Se han caracterizado más de 100 proteínas de este grupo en plantas, bacterias y animales (Ming-Der *et al.*, 2010).

2.7. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 2

Debido a que estas proteínas se inducen en respuesta a deshidratación, también se les conocen con el nombre de dehidrinas (DHNs, dehydration-induced proteins; Close *et al.*, 1989). Sin embargo, este término es arbitrario, en tanto que puede ser aplicado a cualquier otro grupo de proteínas LEA (Tunnacliffe y Wise, 2007). Las LEA 2 poseen un dominio Pfam PF00257 y son las proteínas LEA más ampliamente estudiadas. La característica distintiva de todas las DHNs es la presencia de un dominio conservado, rico en lisinas, de 15 aminoácidos (EKKGIMDKIKEKLPG) llamado segmento K, el cual está usualmente cerca del C-terminal. Otras de las características típicas de las DHNs, pero que no están presentes en todas, son: un conjunto de residuos de serina, el segmento S (el cual actúa como sitio de fosforilación), el motivo consenso T/VDEYGNP, llamado segmento Y, localizado cerca del N-terminal y finalmente una región menos conservada denominada segmento Phi, usualmente rica en aminoácidos polares. El número y orden de los segmentos Y-, S- y K-, se emplean para definir las diferentes subclases de DHNs: Y(n)SK(n), Y(n)Kn, SK(n), K(n) y K(n)S. Las dehidrinas se distribuyen en un amplio rango de organismos incluyendo plantas superiores, algas, levaduras y cianobacterias. En plantas, se acumulan en la embriogénesis tardía y en casi todos los tejidos vegetativos en condiciones normales y en respuesta a estreses que conlleva a la deshidratación, tales como sequía, bajas temperaturas y salinidad (Villardert *et al.*, 1990; Rorat, 2006).

2.8. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 3

La estructura primaria de las proteínas de este grupo se compone principalmente de unidades repetidas de un motivo 11-mer pobremente conservado, el cual está constituido en general, de residuos polares, tales como K, D o E. Estas proteínas son altamente hidrofílicas participan en la respuesta a desecación y se han encontrado en diversos organismos como en *Pisivum sativum*, *Thypha latifolia* y *Polypedilum vanderplanki* (Shimizu, *et al.*, 2010; Furuki *et al.*, 2012).

2.9. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 4

Las proteínas tipo D113, son un grupo de proteínas LEA con peso molecular pequeño, que corresponden al grupo 4 en las clasificaciones de Battaglia, Bray y Bies-Ethéve (Battaglia *et al.*, 2008). Las proteínas LEA del grupo 4 (PFAM 03760) comparten con las demás proteínas LEA, las características de ser hidrofílicas, permanecer solubles con el calor y tener una elevada proporción de aminoácidos pequeños, tales como glicina o alanina y aminoácidos cargados como D, E, K o R (Dure, 1993; Wise, 2003). Existe escasa información respecto a la distribución de las proteínas pertenecientes a este grupo en diferentes tejidos de plantas (Battaglia *et al.*, 2008).

2.10. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 5

Las proteínas LEA del grupo 5 (PFAM 04927) son distintas de las demás debido a que contienen una mayor proporción de residuos hidrofóbicos y poseen por ello una estructura más bien anfipática (Shih *et al.*, 2008; Tunnacliffe y Wise, 2007). Como grupo, el grupo 5 carece de motivos o secuencias consenso, y comparado con el resto de los grupos categóricos, este es un grupo más vago y laxo, ya que no posee proteínas homólogas. Este grupo puede ser dividido en los subgrupos 5A (SMP), 5B (LEA_3) y 5C (LEA_2). Algunos ejemplos son D34 de algodón, GmPM25 de soya, EMB11 de *Picea glauca* y ER5 de tomate. Además, éstas proteínas no permanecen solubles después de hervir, pues no son termoestables (He *et al.*, 2012). Como hecho sobresaliente, las proteínas LEA 5 son nativamente plegadas (Hundertmark e Hinch, 2008). La FTIR muestra que estas proteínas presentan más láminas β -plegadas que estructuras α hélices (Boudet *et al.*, 2006). De hecho, la proteína AtLEA14-A es la única proteína LEA en la que se ha observado estructura secundaria y terciaria en solución (Singh *et al.*, 2005). Todas estas diferencias indican que probablemente son funcionalmente diferentes a las proteínas LEA típicas. De ahí la pregunta si merecen o no ser consideradas proteínas LEA (Boucher *et al.*, 2010).

2.11. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 6

Las proteínas de este grupo se caracterizan por su pequeño tamaño (7–14 kD) y su gran conservación en secuencia. Se pueden distinguir 4 motivos conservados. En general, estas proteínas carecen de residuos de C y W y al igual que el resto de los grupos (sin incluir al grupo 5), no coagulan en condiciones de temperatura elevada. Además, poseen migración aberrante en geles de SDS-PAGE (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

2.12. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 7

Las proteínas ASR son consideradas miembros de las hidrofílicas, son proteínas termoestables e intrínsecamente inestructuradas (Frankel *et al.*, 2006; Goldgur *et al.*, 2007). Comparten características fisicoquímicas con los otros grupos y se acumulan en las etapas tardías de la embriogénesis en semillas y en respuesta a condiciones de falta de agua (Maskin *et al.*, 2008).

2.13. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 4 Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS

Las proteínas LEA del grupo 4 juegan un papel relevante en la adquisición de tolerancia a diferentes tipos de insultos ambientales. Por ejemplo, existen reportes en los que la sobreexpresión de las proteínas LEA de este grupo, incrementa la tolerancia a estrés por sequía en *A. thaliana* (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Por otra parte, dos genes LEA 4 de *Boea hygrometrica* (*BhLEA1* y *BhLEA2*) fueron capaces de inducir resistencia a la desecación en tabacos transgénicos, reducir la pérdida general de agua y el decremento en la actividad del fotosistema II, elevar el contenido de enzimas desintoxicadoras de ROS y estabilizar membranas y proteínas (Liu *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de estas proteínas, además, parece ser muy general, tal como lo indica la adquisición de tolerancia a diversos insultos ambientales (tales como temperaturas, sal, radiación UV, etc.) en bacterias y levaduras como resultado de la expresión heteróloga de proteínas LEA 4 de plantas. Por ejemplo, expresión de la proteína *BnLEA4-1* de *Brassica napus* en *E. coli* incrementa su tolerancia a la temperatura y a estrés salino (Dalal *et al.*, 2009).

A pesar de todo lo anterior, las proteínas LEA 4, hasta la fecha no han sido estudiadas en especies de importancia agronómica como el maíz, el trigo y el sorgo. Por ello, se decidió analizar un nuevo miembro del grupo 4 de las proteínas LEA de maíz.

3. HIPÓTESIS

Hay al menos una proteína LEA 4 de maíz asociada a la tolerancia a estrés hídrico

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- Caracterizar a una proteína LEA del grupo 4 de maíz para evaluar su papel en la tolerancia a estrés hídrico.

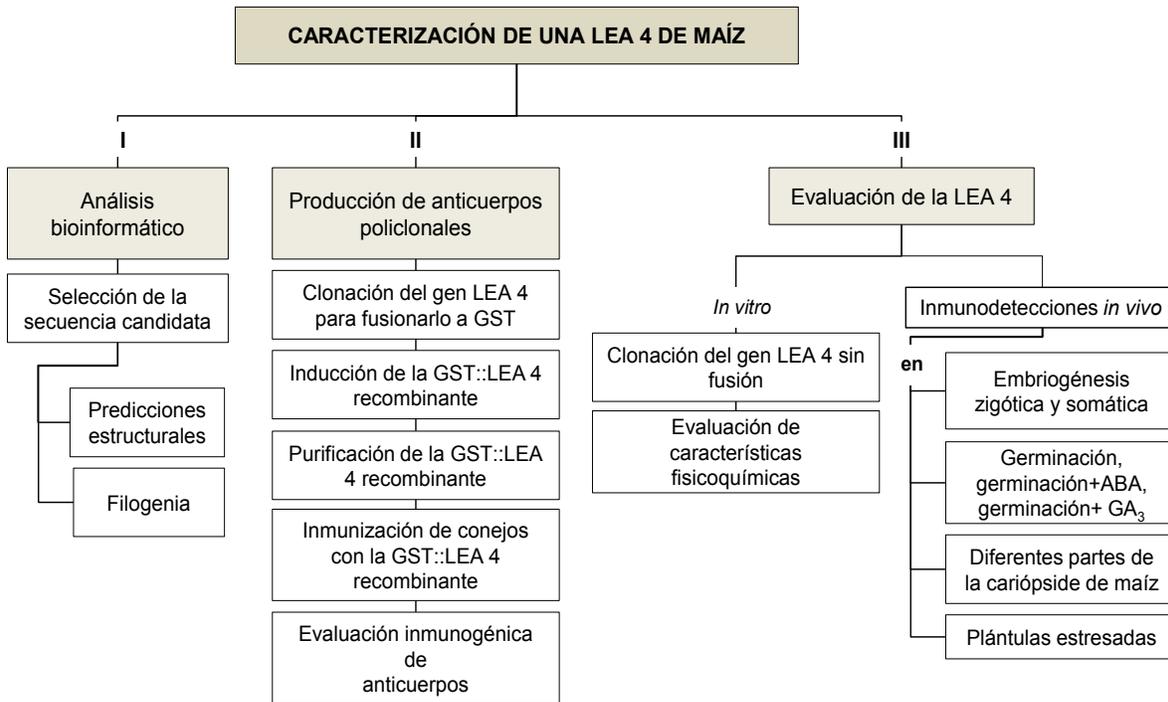
4.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in silico* las propiedades de la proteína LEA 4 de maíz.
- Generar anticuerpos policlonales contra la proteína LEA 4 recombinante.
- Analizar la presencia de la proteína LEA 4 en tejidos de maíz bajo estrés hídrico y en diferentes estados de desarrollo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. ESQUEMA GENERAL DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental del trabajo realizado se describe a continuación:



5.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con BLASTp se buscaron las proteínas de maíz presuntamente ortólogas a la LEA 4-5 de *A. thaliana* (accesión: NP_196294.1). A la secuencia ortóloga más probable, se le predijeron propiedades fisicoquímicas consideradas relevantes para proteínas desordenadas. La globularidad, se estimó con GLOBE (Rost, 1998), el pI y el PM se analizaron con Compute pI/Mw (Bjellqvist *et al.*, 1993; Bjellqvist *et al.*, 1994; Gasteiger, *et al.*, 2005) y la presencia de puentes disulfuro con DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2004). La composición de aminoácidos, hidropatía, estructura secundaria y dominio Pfam se analizaron con PROFphd (Rost, 1996), ProtScale (Gasteiger *et al.*, 2005), PELE y HMMPFAM (Bateman *et al.*, 2004), respectivamente. Con ProtParam se calculó el promedio de hidropaticidad (GRAVY) (Stothard, 2000), la distribución de residuos cargados se investigó con Colorseq (Combet *et al.*, 2000), mientras que la inestructura se predijo con PONDR-FIT (Xue, *et al.*, 2010). Para asignar un nombre a la proteína (Olvera *et al.*, 2010), se buscó en Ensemble Plants la ubicación cromosómica del gen que codifica para la proteína. MEGA 5.2 (Tamura *et al.*,

2011) se usó para construir un árbol filogenético con secuencias no redundantes obtenidas por BLASTp en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), EnsemblePlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) y UniPro, junto con las secuencias con motivo Pfam 03760 del Instituto Sanger (<https://www.sanger.ac.uk/>) y con motivo PR005513 de InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), además de algunas secuencias encontradas por Battaglia *et al.*, 2008 que no se encontraron en los análisis anteriores. El criterio de discriminación de las secuencias empleado fue uno tal en el que las secuencias incluidas cumplieron con los siguientes requisitos: un valor de E menor a 1×10^{-6} en las búsquedas BLASTp, con un motivo Pfam 03760 significativo y no poseer regiones con una probabilidad menor a 0.5 en la predicción de inestructura de PONDR-FIT. Para la construcción del árbol, las secuencias se alinearon con Muscle (Edgar, 2004) y se hizo una matriz de identidad (PIM), para escoger todas las secuencias con <25% de similitud respecto a la LEA D113 de *Gossypium hirsutum* y la LEA 4-2 de *A. thaliana*. Para construir el árbol filogenético, se estimó el mejor modelo de sustitución con base al menor valor de criterio de información bayesiano (BIC) obtenido para estas secuencias. De este análisis, se escogió la matriz de sustitución de Jones-Taylor-Thornton con cinco distribuciones discretas gamma y con 500 Boostraps como prueba estadística. Para analizar la región probable del promotor, se seleccionó en Ensemble Plants la región de 2 Kb río arriba (10: 70 646 218- 70 648 218) del 5'UTR de la LEA 4, la cual se tomó como región promotora probable. Esta se analizó con New PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) para predecir elementos de unión a factores de transcripción de respuesta a estrés predichos.

5.3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-LEA 4

5.3.1. OPTIMIZACIÓN DE CODONES Y SÍNTESIS DE LA SECUENCIA

Los codones de la secuencia LEA 4 se optimizaron con *Optimum Gene*TM para eliminar sitios de restricción frecuentes, reducir el contenido de GC y optimizar la traducción en *E. coli*, aumentando el número de codones frecuentes. Posteriormente, la secuencia se sintetizó en la compañía *GenScript*®, quienes la clonaron en el vector pUC57. Con esta construcción se transformaron por choque térmico células de *E. coli* cepa DH5 α .

5.3.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS Ca⁺⁺ COMPETENTES

Se inocularon 10 mL de medio Luria-Bertani (LB, 10 g·L⁻¹ de bactotripton, 5 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 10 g·L⁻¹ NaCl) con células de *E. coli* cepas DH5 α o BL21 y se cultivaron a 200 rpm, 37°C y con 5 volúmenes de aire por volumen de cultivo (condiciones

estándar de crecimiento) hasta 0.6-0.7 de DO_{600nm} (aproximadamente 12-16 h). Después, los cultivos se incubaron por 20 min en hielo y se centrifugaron 7 min a 8 000 g a 4°C. La pastilla se resuspendió en 5 mL de $CaCl_2$ 0.1 M frío y se mantuvo 10 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 2 500 g. La pastilla se resuspendió en 1 mL de $CaCl_2$ 0.1 M frío y se separó en alícuotas de 100 μ L (80 μ L de células en $CaCl_2$ 0.1 M y 20 μ L de glicerol, mezcladas por agitación vigorosa). Para conservarlas, se ultracongelaron en N_2 líquido y se guardaron a -72°C (cepario).

5.3.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS Ca^{++} COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO

Las células Ca^{++} competentes se descongelaron en hielo por 30 min en presencia de 100-300 ng del plásmido. Se les aplicó un choque térmico de 1 min a 42°C, seguido de 5 min de incubación en hielo. Se agregó medio LB hasta 1/5 del vial y se incubó 1 h a 37°C y 200 rpm. Se inocularon 50-100 μ L de este cultivo en placas con medio LB semi-sólido con 1 μ g·mL⁻¹ de ampicilina. Las placas se incubaron 12-16 h a 37°C.

5.3.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

Para la electrotransformación se usaron 50 μ L de células electrocompetentes *OneShot Top ten*® de *Invitrogen*™. Las células se descongelaron 10 min en hielo y se pasaron a celdas de electroporación de 100 μ L enfriadas a 4°C. Se agregó 100-300 ng del plásmido deseado. Se transformaron con un electroporador *Eppendorf 2510*® a 1 800 V. Luego, se adicionó 0.5 mL de medio SOC (peptona de caseína 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM y glucosa 1 M) y la mezcla se trasvasó a un vial de 1.5 mL y se incubó 1 h a 37°C y 200 rpm. Finalmente, con 10 μ L del cultivo se inocularon placas con medio LB más ampicilina y se incubaron 17 h a 37°C.

5.3.5. MINIPREPARACIONES DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA

El aislamiento de plásmido a pequeña escala se hizo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Se cultivaron células de *E. coli* en 3 mL en medio LB más el antibiótico adecuado, por 13-16 h en condiciones estándar. Este cultivo se centrifugó en viales de 2 mL y la pastilla se resuspendió con agitación vigorosa en 100 μ L de solución de lisis I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM de EDTA pH 8.0). Luego, se agregó 200 μ L de solución de lisis II recién preparada (0.2 N de NaOH y 1% de SDS w/v), mezclando por inversión 5 veces. Se mantuvo 3-5 min en hielo. Se agregó 150 μ L

de solución de lisis alcalina III (5 M de acetato de potasio y 11.5 % de ácido acético glacial) y se mezcló nuevamente. Se centrifugó 5 min a 21 000 g y 4°C y el sobrenadante se transvasó, añadiendo 1 volumen de fenol-cloroformo 1:1 (fenol pH 8.0). Se agitó 30 s y se centrifugó 2 min a 21 000 g y 4°C. La fase acuosa se trasvasó, se le agregó 2.5 volúmenes de isopropanol absoluto frío, se mezcló y se dejó precipitar 30 min a -72°C. Se centrifugó 10 min a 21 000 g y 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó y se dejó secar al ambiente. Se resuspendió en 20 µL de H₂O estéril, se agregó 0.1 U de RNAsa A y se incubó 30 min a 37°C y se almacenó a -20°C.

5.3.6. CLONACIÓN DEL MARCO ABIERTO DE LECTURA DE LA LEA 4

Para producir la proteína GST::LEA 4, se hizo la construcción lac:*gst::lea 4::term*. El ORF de *lea 4* se insertó en el pGEX 4T2. Para ello, se inocularon 2 cultivos de 3 mL de medio LB+Amp, uno con *E. coli* DH5α pGEX 4T2 y otro con *E. coli* cepa DH5α pUC57-*lea 4*. Ambos se cultivaron por 13-17h en condiciones estándar y los plásmidos se extrajeron por lisis alcalina. Con el pUC57-*lea 4* se amplificó el ORF de la *lea 4* con los oligonucleótidos PGL4F BamHI F 5'-ATAATTGGATCCATGCAGGCGGGCAAGACAGC-3' y PGL4R EcoRI 5'-GAATGTGAATTCCTTACTGATACTGGCCGCCCGT-3' con la reacción:

COMPONENTE	µL
Oligonucleótidos PGL4F y PGL4R (10 µM)	1
dNTPs 10 mM	1
Solución amortiguadora HF 5x	10
Templado de DNA (450 µg/µL)	0.8
<i>Phusion® High Fidelity DNA polymerase*</i>	0.4
H ₂ O	36.8

* de *Fermentas®*

Para la PCR se usó una temperatura desnaturalización inicial de 30 s a 98°C y 30 ciclos de 98°C y 10s de desnaturalización, 63°C y 30 s de alineamiento y 72°C y 30s de amplificación y 10 min a 72°C de extensión final. Se corrieron 20 µL del producto en un gel de agarosa al 1 %. Se purificó con el paquete *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de *GE Healthcare™*. El fragmento se eluyó con 13 µL de dH₂O estéril y se digirió con BamHI y EcoRI, de la siguiente forma:

COMPONENTE	μL
BamHI (10 u/μL)*	2
EcoRI (10 u/μL)*	1
Solución amortiguadora Tango 10 x*	4
Eluato	13

* de *Fermentas*®

Lo mismo se hizo con el pGEX 4T2:

COMPONENTE	μL
BamHI (10 u/μL) *	2
EcoRI (10 u/μL)*	1
Solución amortiguadora Tango* 10x	4
pGEX 4T2	3
H ₂ O	10

* de *Fermentas*®

Ambas reacciones se incubaron 1 h a 37 °C, se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos se mezclaron y purificaron con el paquete *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de *GE Healthcare™*. El DNA total se eluyó con 17 μL H₂O y se ligó de la siguiente forma:

COMPONENTE	μL
Solución amortiguadora de T4 DNA ligasa 10x *	2
T4 DNA ligasa 400 u/μL*	1
Eluato (DNA)	17

* de *New England Biolabs*®

La reacción se incubó por 16 h a 16 °C y con ella se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes *One shot Top ten*® de *Invitrogen™*. Las células transformadas se cultivaron por 13-17 h en placas con medio LB semi-sólido a 37°C y se seleccionaron con ampicilina (1 μg·mL de medio). Posteriormente, se tomaron 2 colonias al azar, con las que se iniciaron cultivos en 3 mL de medio LB+amp (1 μg·mL⁻¹). Cada colonia se respaldó en una placa con medio LB+Amp semisólido, mientras que con los cultivos líquidos se obtuvieron los plásmidos por lisis alcalina. Se analizaron por PCR, mediante los oligonucleótidos PGL4F y PGL4R. Se localizó la colonia recombinante. El cultivo de esa colonia se preservó en cepario. Para esto, se mezcló vigorosamente 800 μL del cultivo con 200 μL de glicerol estéril, se ultracongeló con N₂ líquido y almacenó a -72°C. Finalmente,

se transformaron células de *E. coli* cepa BL21 *codón plus* Ca⁺⁺ competentes con el pGEX 4T2-*lea 4*. Se sembraron en medio LB semisólido + ampicilina (1 µg·mL⁻¹) y se incubaron 13-17h a 37°C. Las cepas transformadas se confirmaron por PCR y se incluyeron en el cepario.

5.3.7. INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON IPTG

Las condiciones de inducción se estandarizaron con el vector pGEX 4T2 vacío. Dos matraces, cada uno con 100 mL de medio TB+Amp (24.0 g·L⁻¹ de extracto de levadura, 12.0 g·L⁻¹ de peptona de caseína, K₂HPO₄ 54.0 mM, KH₂PO₄ 16.2 mM, glicerol 8.0 mL·L⁻¹, pH 7.2 ± 0.2 y 1 µg·mL⁻¹ ampicilina), se inocularon con 3 mL de pre-cultivo de células *E. coli* cepa BL21 *codón plus* transformadas con el vector pGEX 4T2 y se cultivaron en condiciones estándar hasta una DO_{600nm} de 0.5-0.8. A uno de ellos se le agregó IPTG hasta 1 mM de concentración final y el otro se usó como control negativo. De cada cultivo se tomaron muestras de 2 mL a 0, 1 y 3 h post-inducción, las cuales se centrifugaron 30 s a 12 000 g y las pastillas bacterianas se lisaron con 200 µL de SDS al 2%. Para resolver las proteínas de los lisados por SDS-PAGE al 16%, se tomó 20 µL de cada uno, se les agregó 15 µL de solución amortiguadora de carga de proteínas 6x, se calentaron 7 min a 95 °C y se prosiguió de acuerdo a la sección 5.3.8.

5.3.8. RESOLUCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-PAGE

El análisis de todas las proteínas por SDS-PAGE al 16% se hizo de acuerdo a Laemmli, 1970. El gel separador se preparó con una mezcla de 58% de solución I (30% de acrilamida y 0.8% de Bis-acrilamida), con 42% de solución II (0.75 M de Tris-HCl, 0.2% de SDS y pH final de 8.8). Para la polimerización, se usaron 7.5 µL de Temed y 75 µL de APS al 20 % por cada 10 mL de la mezcla. Para el gel separador, se hizo una mezcla de 16.5% de solución I, 50% de solución III (0.25 M de Tris-HCl, 0.2% de SDS y pH final de 6.8) y 33.5% de H₂O. Para la polimerización se utilizaron 3.5 µL de Temed y 35 µL de APS al 20% por cada 10 mL de la mezcla. Previo a la electroforesis, las muestras se mezclaron con solución amortiguadora de carga 2X (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 125 mM de Tris-HCl) y se hirvieron a 96°C por 5 min. Todas las corridas se hicieron con solución amortiguadora de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 3.47 mM), por 2.5 h a 115 V constantes. Para teñir los geles, se incubaron con solución de azul de Coomassie CBB (200 mL·L⁻¹ de etanol al 96%, 0.8 g·L⁻¹ azul brillante

G-250, 16 mL·L⁻¹ de ácido fosfórico, 80 g·L⁻¹ de sulfato de amonio) por 14 h. Para desteñirlos, se pusieron 1 h en etanol al 40 %.

5.3.9. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-LEA 4

Se inocularon 150 mL de medio TB+Amp con 3 mL de cultivo de células *E. coli* BL21 codón plus transformadas con pGEX 4T2-*lea 4* crecidas en condiciones estándar por 13-17 h, hasta una OD_{600nm} de 0.5. Se agregó 150 µL de ampicilina (1 µg·mL⁻¹) e IPTG hasta un 1 mM. Se crecieron por 3 h más en condiciones estándar. Luego, el cultivo se centrifugó por 15 min a 5 000 g y 4°C. La pastilla se resuspendió en 15 mL de solución amortiguadora de extracción (120 mM Tris-HCl pH 8.1, 400 mM de NaCl, 5 mM de EDTA y 1 mM de DTT). Se agregó 1 mg de lisozima, 2 µL de PMSF 100 mM y *Cocktail complete 20 de Roche*®. Se incubó 1 h a 4°C con rotación ligera y, tras la adición de 0.3% de sarcosina, se mezcló por inversión. Luego, se agregó 1% de Tritón X-100 y 10 mM de CHAPS, se incubó 15 min a 4°C con rotación ligera. Se centrifugó 10 min a 15 000 g y 4°C. El sobrenadante se filtró al vacío con papel *Whatman*® # 12. La proteína de fusión se purificó mediante el paquete de *Pierce GST Spin Purification de ThermoScientific*®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El eluato se liofilizó hasta ≈400 µL. La concentración total de proteína contenida en esta fracción se cuantificó por Bradford y se analizó en geles de SDS-PAGE al 16%. Luego se tiñeron con solución Coomassie CBB, se cortaron las bandas de interés, se extruyeron haciendo pasar las bandas de poliacrilamida por un tubo de 0.6 mL con una perforación muy fina en el fondo, dispuesto en un tubo de 2 mL a 16 000 g por 15 min. La proteína se liberó de la matriz, por difusión pasiva en solución amortiguadora de Tris 100 mM, SDS 0.4%, DTT 50 mM y *cocktail complete*® 1X por 12 h. La proteína se precipitó con acetona al 80% y se resuspendió en 100 µL de solución amortiguadora E (tricina 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, *cocktail complete de Roche*® 1X), se cuantificó por Bradford y la pureza se evaluó en geles SDS-PAGE al 16% teñidos con Coomassie CBB.

5.3.10. PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS CON LA LEA 4

Las manipulaciones de los conejos usados para producir los anticuerpos se hicieron según las recomendaciones del Consejo Interno para el Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM. Para la inmunización se usaron 2 conejas neozelandesas paridas de 8 meses de edad. Al día 0 se realizó una sangría de prueba en la arteria central del pabellón auricular. Para obtener el suero, la sangre se dejó coagular a 4°C por 5 h, se centrifugó a 5 000 g, por 10 min a 4°C. La reactividad del suero pre-inmune,

se analizó por *WB* frente un gradiente de proteína total de ejes embrionarios quiescente de maíz. Para obtener esta proteína, se extrajeron manualmente 100 mg de ejes quiescentes de maíz var. Tuxpeño. Este material se pulverizó con mortero y N₂ líquido. El polvo se transfirió a un vial de 2 mL y se agregó 700 µL de solución amortiguadora E (tricina 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, *cocktail complete de Roche*® 1X). La mezcla se agitó vigorosamente por 30 s, se centrifugó 10 min a 21,000 *g* y se recuperó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se corrieron 3 geles de SDS-PAGE con un gradiente de proteínas totales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg. Uno de estos geles fue usado para corroborar el patrón de integridad de las proteínas, mientras que los otros se transfirieron a membranas de PVDF para hacer el *WB* (de acuerdo a la sección 3.3.11), con una dilución de suero pre-inmune de 1: 500. Luego de constatar que no existiese inmunoreactividad entre las proteínas de eje quiescente de maíz con los anticuerpos basales de conejo, se prosiguió con el protocolo de inmunización. Primero, los conejos se inmunizaron con 0.5 mg de proteína recombinante en 1.4 mL de solución inyectable de *PISA*® más 1.4 mL de adyuvante completo de Freud vía subcutánea, colocados en un sitio único en el lomo. Después de 7 d se les aplicó 0.5 mg de proteína recombinante en 0.4 ml de suero *PISA*® en la glándula poplítea. A los 21 d se inmunizaron con 0.5 mg de proteína recombinante en 0.5 mL de solución inyectable de *PISA*® vía intramuscular y a los 27 d se hizo una sangría de prueba de 5 mL a cada conejo para obtener el suero. Al día 34, se inyectó intraperitonealmente 1 mg de proteína recombinante a cada conejo y a los 7 d, los animales se anestesiaron con ketamina vía intramuscular (35 mg·Kg⁻¹), para luego realizar la punción cardiaca de sacrificio y extraer la sangre total. El suero obtenido de los dos animales se mezcló y se empleó para hacer un *dot-blot* contra 200, 100, 50, 20 y 5 ng de proteína recombinante, con diluciones de 1: 2000, 1: 4000 y 1: 6000 (ver sección 5.3.13). Este suero se separó en alícuotas de 50 µL, se ultracongeló en N₂ líquido y se guardó a -70°C.

5.3.11. INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA LEA

Los análisis de inmuno-detección tipo *Western-blot* llevados a cabo con el anticuerpo anti-LEA4, en este estudio, se realizaron como se describen a continuación. Las proteínas resueltas en geles SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF. Para ello, las membranas se reactivaron con metanol por 30 s y se equilibraron con solución amortiguadora de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 3.47 mM, metanol al

20%) por 5 min. Las proteínas se transfirieron por transferencia húmeda por 1 h a 100 V. Las membranas de PVDF con las proteínas transferidas, se reactivaron 30 s con metanol y se rehidrataron en H₂O por 1-2 min. Los sitios libres de esta superficie se bloquearon 1 h con 40 mL de solución de bloqueo (TBS-T 0.15 M: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM, NaCl y 0.1% Tween 20) y 5% de leche semidescremada *Svelty*® en agitación constante a temperatura ambiente. Después, el primer anticuerpo se incubó con 5 mL de solución de bloqueo a una dilución de 1: 6 000 por 2 h. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T 0.15 M. Se incubó 1 h con el segundo anticuerpo (de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa, *Santa Cruz*®) a una dilución de 1: 10 000. La membrana se lavó 3 veces más y se reveló con el sustrato de *Inmobilon Western* de *Millipore*®. La reacción se fotodocumentó con el equipo *ChemiDoc*® de *Biorad*™.

5.3.12. ELIMINACIÓN DE GST DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para analizar las características fisicoquímicas de la proteína recombinante, se hizo una escisión proteolítica de la GST::LEA 4 con trombina. Primero con Peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) se corroboró la ausencia de sitios de corte para trombina en la LEA 4, para luego iniciar la purificación y remoción de la etiqueta de glutatión S-transferasa (GST) de LEA 4. La inducción y purificación de la proteína de fusión se hizo con la estrategia mencionada en la sección 5.3.9., pero en vez de eluirlo de la matriz de glutatión-sefarosa, ésta se lavó exhaustivamente con la solución amortiguadora del fabricante, se depositó en un vial de 2 mL y se agregaron 4 volúmenes de solución amortiguadora PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, pH a 7.4) por volumen de glutatión sefarosa, se adicionaron 8 U de trombina (*Sigma*®) por cada 2 mL de la mezcla y se incubó en agitación a 25°C por 16 h. La fase móvil se separó de la sefarosa por centrifugación a 1 500 g, se recuperó y se consideró como proteína LEA 4 digerida (tratamiento 1). Adicionalmente, la LEA 4 digerida, se calentó 10 min a 96°C y se centrifugó 15 min a 21 000 g. El sobrenadante se denominó proteína LEA 4 digerida y tratada térmicamente (tratamiento 2). La proteína total resultante de los tratamientos 1 y 2, debido a su composición, no se pudieron cuantificar por Bradford o por A_{280nm}, por lo que se cuantificó con la ecuación: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 144 (A_{215} - A_{225})$. Como control de la digestión, se analizaron los patrones electroforéticos en geles de acrilamida al 16% de la GST digerida y de GST inducida a partir del vector pGEX 4T2 y purificada por cromatografía de afinidad. Para confirmar la naturaleza de las bandas observadas, se hizo un *WB* contra la LEA 4. Como control positivo, se usó proteína total de ejes quiescentes de maíz

cuantificada por Bradford. Tanto para los geles de SDS-PAGE como para el *WB* se corrieron 350 ng de proteína de los tratamientos 1 y 2, 200 ng de la GST y 1 µg de eje quiescente de maíz.

5.3.13. EVALUACIÓN DEL TÍTULO, INMUNOSELECTIVIDAD E INMUNOESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Para analizar el título de los anticuerpos, se hizo un dot blot con la proteína recombinante. Las cantidades de proteína del ensayo fueron 200, 100, 50, 20 y 5 ng de proteína pura, contra 3 diluciones de suero de conejo (1: 2 000, 1: 4 000 y 1: 6 000), mientras que la selectividad de la interacción de los anticuerpos anti-LEA 4 se evaluó empleando estos anticuerpos en un *WB* contra un gradiente de proteína total de ejes quiescentes de maíz (1, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg). Por otra parte, la inmunoespecificidad del anticuerpo, se estableció mediante un ensayo de competencia de péptido. Primero, se corrieron y transfirieron en paralelo 2 gradientes de proteína total de ejes quiescentes de maíz de 5, 10 y 20 µg. Con esta membrana se realizaron sendos *WB*. Sin embargo, en una de ellas se titularon los anticuerpos anti-LEA 4 con la LEA 4 recombinante generada en el tratamiento 2 de la sección 3.3.12 (competidor). La competencia se hizo poniendo a competir 5 partes de la LEA 4 pura por cada parte de proteína total de suero. La cantidad de la recombinante se calculó con la ecuación $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 144 (A_{215}-A_{225})$, en tanto, la proteína total del suero se cuantificó por Bradford. La otra membrana se usó como control positivo. En todos los casos, la inmunodetección de la LEA 4 se hizo de acuerdo a la sección 5.3.11.

5.3.14. CLONACIÓN DEL GEN *lea 4* EN pTrc99a

Para obtener la proteína recombinante sin etiqueta, se clonó el ORF del gen *lea 4* en el vector pTrc99a. Para esta clonación, se aislaron los plásmidos pTrc99a y pUC57-*lea 4* y se digirió con las enzimas BamHI y EcoRI, con las siguientes condiciones:

COMPONENTE	µL
BamHI (10 u/µL)*	2
EcoRI (10 u/µL)*	1
Solución amortiguadora Tango 10x*	2.0
Plásmido (pTrc99a y/o pUC57- <i>lea 4</i> (50 ng/µL)	9.0
H ₂ O estéril	9.5

* de *Thermo Scientific*®

Las reacciones se incubaron 1 h a 37°C y se corrieron en un gel de agarosa 1%. Los amplicones de ambas reacciones se cortaron y mezclaron y su purificación se hizo con el

paquete *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de *GE Healthcare™*. El DNA se eluyó con 17 µL dH₂O estéril y se ligaron como se ligó el inserto con el pGEX 4T2 (sección 5.3.6.). Con esta ligación se transformaron por choque térmico células DH5α Ca⁺⁺ competentes. El escrutinio de transformantes se hizo igual que para el pGEX 4T2-*lea 4*.

5.3.15. TRANSFORMACIÓN Y ESCRUTINIO DE *E. coli* BL21 CODÓN PLUS CON pTrc99a-*lea 4* E INDUCCIÓN DE LEA 4 RECOMBINANTE

La transformación y escrutinio por PCR de cepas de *E. coli* BL21 codón plus se realizó de la misma forma que para el plásmido pGEX 4T2. De la misma manera se procedió para la inducción de la recombinante LEA 4, para la cual se puso un pre-cultivo de 5 mL de *E. coli* BL21 transformadas con pTrc99a-*lea 4* en medio Terrific-Broth+amp crecidas por 12-16h en condiciones estándar. Con este pre-cultivo se inocularon 3 tubos con 5 mL de medio Terrific-Broth+amp hasta una OD_{600 nm} de 0.1. Se dejaron crecer hasta una OD_{600 nm} de 0.6 y en este punto, dos de los cultivos se indujeron por 3 h con IPTG hasta una concentración 1 mM, mientras que el otro sirvió como control negativo.

5.3.16. PURIFICACIÓN DE LA LEA 4 RECOMBINANTE CON CALOR Y TCA

La proteína LEA 4 recombinante se purificó por el método de Campos *et al.*, 2011. Brevemente, las células de uno de los cultivos de 5 mL (sección 5.3.15.) se centrifugaron 1 min a 10 000 g, se resuspendieron en 1 mL de solución amortiguadora A (Tris 20 mM y NaCl 10 mM), se hirvieron 10 min y se pasaron a hielo por 25 min. Los restos celulares se separaron de la fase acuosa por centrifugación a 12 000 g por 15 min. Se separó el sobrenadante al que se le agregó TCA lentamente hasta una concentración de 3% en agitación constante, se dejó 10 min en hielo, se centrifugó 15 min a 10 000 g. La pastilla se lavó con acetona fría al 100%, se centrifugó 15 min a 10 000 g. Lo anterior se repitió 3 veces más. Finalmente, la acetona se dejó evaporar, la pastilla se resuspendió en SDS al 2% y se consideró como proteína insoluble en TCA al 3% (I3%). Por su parte, el sobrenadante se trasvasó, se agregó TCA hasta 25%, se centrifugó 15 min a 15 000 g y 4°C. La pastilla se lavó con acetona al 100% y se repitió la centrifugación. Lo anterior se repitió 3 veces. Finalmente, la acetona se dejó evaporar y la pastilla se resuspendió en PBS 1x + *cocktail complete 20* (Roche®), lo cual se consideró como proteína soluble al 3% de TCA (S3%). Esta última, se cuantificó mediante la ecuación $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 144(A_{215} - A_{225})$. Para obtener las proteínas totales de los controles (+ y -), se tomó 1.5 mL del cultivo inducido y no inducido, respectivamente y se centrifugaron 1 min a 10 000 g. El sobrenadante de cada muestra se

desechó y las bacterias empastilladas se lisaron con 200 μ L de SDS al 2%. Para resolver las proteínas por SDS-PAGE, se cargaron 15 μ L cada lisado bacteriano, 20 μ L de I3% y 80 ng de la S3%. De ésta última, se tomó una cantidad equivalente, con la que se realizó un WB contra la LEA 4.

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO Y EN RESPUESTA A ESTÍMULOS AMBIENTALES

5.4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE EJES DE MAÍZ

Para extraer la proteína de cada muestra, primero se maceraron 100 mg de ejes de maíz disectados manualmente con N₂ líquido. El macerado se mezcló vigorosamente por 30 s con 700 μ L de solución amortiguadora E (tricina 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, *cocktail complete* de Roche® 1X). Se centrifugó 5 min a 10 000 *g* y se obtuvo el sobrenadante (proteínas solubles totales). Este sobrenadante se calentó 15 min a 95°C, se puso 30 min en hielo y se centrifugó en las mismas condiciones. La pastilla se desechó (proteínas totales termoinsolubles, PTI) y el sobrenadante se conservó (proteínas totales termosolubles, PTS) y se cuantificaron por el método de Bradford.

5.4.2. SOLUBILIDAD DE LA PROTEÍNA LEA 4 DE MAÍZ CON CALOR Y TCA

Se extrajeron proteínas solubles totales de ejes quiescentes de maíz (sección 5.4.1). Las PTI se solubilizaron con solución de solubilización (Tris 0.1 M, urea 8 M, SDS 0.1 % y β -mercaptoetanol 2%), se centrifugaron 5 min a 16 000 *g* y se conservó el sobrenadante. Las PTS se fraccionaron con TCA hasta una concentración de 3% de acuerdo con Campos *et al.*, 2011. La mezcla se incubó 15 min en hielo y se centrifugó 10 min a 16 000 *g*. Se separó el sobrenadante (proteínas solubles con TCA al 3%, S3%) de la pastilla proteica (proteínas insolubles con TCA al 3%, I3%). Para retirar el TCA, las fracciones se lavaron 3 veces con acetona al 100 % fría, se resuspendieron con solución de solubilización. Todas las fracciones (PT, PTI, PTS, I3% y S3%) se cuantificaron por Bradford. De cada fracción, se tomaron 3 μ g de proteínas y se resolvieron en geles de Tris-tricina al 15%. Para preparar el gel separador, se mezcló 36.2% de solución acrilamida/bisacrilamida 29:1, 33.3% de Tris-Cl/SDS (3M Tris-Cl, 0.3% SDS, pH 8.5), 19.9% de H₂O y 13.3% p/v de glicerol; para el gel apilador, se mezcló 9.68% de solución de acrilamida/bisacrilamida 29:1, 24.8% de Tris-Cl/SDS (3M Tris-Cl, 0.3% SDS, pH 8.5), 65.5% de H₂O. Ambas mezclas se degasificaron

15 min al vacío y para gelificarlas se usó 100 µL de persulfato de amonio al 10% y 30 µL de TEMED por cada 30 mL de solución, respectivamente. Para correr las proteínas, se empleó una solución amortiguadora anódica (0.2M Tris-Cl pH 8.9) y una catódica (0.1M Tris, 0.1M Tricina y 0.1% SDS, sin ajustar pH). A las muestras de se les agregó solución amortiguadora de carga y se resolvieron a 100 V hasta que el frente alcanzó el borde del gel. Se corrieron dos geles en paralelo, uno se tiñó con Coomassie y con el otro se inmunodectó la LEA 4 (ver sección 5.3.11.).

5.4.3. EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN LA EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA

Para probar que esta proteína se acumula en la embriogénesis zigótica como una LEA canónica, se obtuvieron embriones de maíz de mazorcas de 21, 28, 37, 47, 57 y 65 días post-polinización (dpp) de plantas del campo experimental del INIFAP de Zacatepec, Morelos. Estos embriones se disectaron, ultracongelaron con N₂ líquido y almacenaron a -72°C. De ellos se extrajo proteína total (sección 3.4.1.), se cuantificaron por Bradford y de estas muestras, se resolvieron 20 µg de proteína en geles de SDS-PAGE al 16%, se transfirieron a membranas de PVDF y se inmunodectó la LEA 4. Para comparar el perfil de acumulación de la LEA 4 con una LEA de referencia, a esta membrana se le retiraron los anticuerpos, para lo cual primero se reactivó en metanol por 30 s y luego se lavó por 15 min con solución desnudadora (glicina 100 mM y SDS 2%). Después, se inmunodetectaron las LEAs 2 con anticuerpos anti-segmento k (*Agrisera*®), con una dilución de 1:3 000. Para visualizar las proteínas en la membrana, ésta se tiñó con rojo de Ponceau. Para estimar el contenido porcentual de agua, se midió el peso fresco de 25 endospermos y su peso seco (obtenido al desecarlos a 60°C por 7 d) y se calculó como:

$$\text{Contenido porcentual de agua} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

5.4.4. EXPRESIÓN E INDUCCIÓN DE LA LEA 4 EN LA POST-IMBIBICIÓN

Se determinó la cinética de acumulación de la proteína LEA 4 en la semilla al salir de la quiescencia. Se germinaron semillas en tapetes de algodón humedecidos a capacidad de campo con H₂O y se incubaron en oscuridad a 28 ± 2°C. De estas semillas se extrajeron los ejes embrionarios a las 0, 12, 24, 36 y 48 h post-imbibición. Para extraer RNA total, se partió de 100 mg de ejes embrionarios, disectados manualmente y pulverizados con N₂ líquido. Se adicionó 200 µL de solución amortiguadora de extracción (50 mM de Tris -pH 8.0-, 150 mM de LiCl, 5 mM de EDTA pH 8.0 y 1% de SDS -filtrado con filtros de 0.22 µm-

). Se agitó 30 s y se agregó 200 µL de fenol:cloroformo 1:1, se agitó y se puso 5 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 10 000 g y 4°C. La fase acusa se trasvasó, se adicionó 200 µL de fenol:cloroformo 1:1, se mezcló y se centrifugó de igual forma. La fase acuosa se trasvasó y se agregó 200 µL de cloroformo, se puso 5 min en hielo y se centrifugó de igual forma. La fase acuosa se trasvasó, se agregó 1 mL de reactivo de *Trizol*® (*Invitrogen*™), se mezcló 15 s y se agregó 200 µL de cloroformo. La mezcla se agitó e incubó 3 min a 25°C. Se centrifugó 10 min a 10 000 g y 4°C. La fase acuosa se trasvasó y se le adicionó 0.5 mL de isopropanol frío, se incubó 10 min en hielo y se centrifugó de igual forma. La pastilla, se lavó con 1 mL de etanol al 70 % ultrafiltrado y se centrifugó en iguales condiciones. La pastilla se desecó y se resuspendió en 50 µL de agua inyectable estéril. La concentración de RNA se calculó con la ecuación: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RNA = 40 x Abs₂₆₀ x factor de dilución. La integridad se analizó en un gel de agarosa al 1%. Para retrotranscribirlo, se usó el paquete *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (*Applied Biosystem*™) según las instrucciones del fabricante:

COMPONENTE	µL
Solución amortiguadora RT 2.0 10x	2.0
Mezcla de dNTP (100 mM) 25x	0.8
<i>RT Random Primers</i> 10x	2.0
<i>MultiScribe</i> ™ <i>Reverse Transcriptase</i>	1.0
RNA total	2 µg
H ₂ O libre de RNAsas	Hasta 20 µL

El programa de reacción fue: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. El cDNA se almacenó a -20°C. Para la PCR se emplearon los oligonucleótidos RTL4F 5'-ATGCAGAAGACCCGTGCCGC-3' y RTL4R 5'-CTGGTACTGTCCGCCGGTGC-3', que amplifican el marco abierto de lectura del gen (480 pb).

COMPONENTE	µL
Oligonucleótidos RTL4F y RTL4R 10 µM	1
dNTPs 10 mM	1
Solución amortiguadora GC 5x*	10
cDNA	1
DMSO 100%	2.5
<i>Phusion</i> ® <i>High Fidelity DNA polymerase</i> *	0.4
H ₂ O	33.1

*de *Fermentas*®

Se usó una desnaturalización inicial de 1 min a 98°C y 30 ciclos de 98°C y 10 s de desnaturalización y 72°C y 25 s de alineamiento-amplificación, con 10 min a 72°C de extensión final. Como control positivo se amplificaron 240 pb del 18 S con los oligonucleótidos 18 SF 5'-GGAACTTACCAGGTCCAGACATAG-3' y 18 SR GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3'. Los componentes de la PCR fueron:

COMPONENTE	µL
Oligonucleótidos 18 S F y 18 S R 10 µM	1
dNTPs 10 mM	1
Solución amortiguadora GC 5X	10
cDNA	1
<i>Phusion® High Fidelity DNA polymerase*</i>	0.4
H ₂ O	35.6

*de Fermentas®

Se usó una desnaturalización inicial de 1 min a 98°C y 30 ciclos de 98°C y 10s de desnaturalización, 60°C y 15 s de alineamiento y 72°C de amplificación y 10 min a 72°C de extensión final. De cada reacción se corrieron 10 µL en un gel de agarosa al 1.5 %.

5.4.5. INDUCCIÓN DE LA LEA 4 EN LA POST-IMBIBICIÓN EN RESPUESTA A AG₃ Y ABA

Se evaluó el perfil de inducción de la proteína LEA 4 en respuesta a AG₃ y ABA en las primeras horas post-imbibición. Las semillas se establecieron sobre tapetes de algodón humedecidos a capacidad de campo con AG₃ a 577.4 µM o ABA 100 µM (según el tratamiento), se incubaron a 28 ± 2°C en oscuridad y se tomaron muestras de ejes (≈0.1 µg) a 0, 12, 24, 36 y 48 h post-imbibición y con los endospermos (3 grupos de 25 endospermos por punto de muestreo), se estimó el contenido porcentual de agua:

$$\text{Contenido porcentual de agua} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100\%$$

5.4.6. INDUCCIÓN DE LA LEA 4 EN LA EMBRIOGÉNESIS EN RESPUESTA A ÁCIDO ABSÍSICO (ABA)

Dado que muchos de los genes que participan en la respuesta a la falta de agua son regulados por ABA, es posible que la expresión del gen de la LEA 4 también lo esté. Para probarlo, se obtuvieron mazorcas de 21 dpp de las que se disectó la porción anatómica de la semilla que involucra al embrión, escutelo y cotiledón (lo que comúnmente se denomina

gérmen). Como control, se pusieron ≈ 45 gérmenes en placas Petri con H₂O a 28°C por 6 h, sin sumergirlos completamente. Como tratamiento, se sumergieron en una solución de ABA 0.25 μ M. De ambos grupos se extrajo proteína total (sección 5.4.1.) y se cuantificó por Bradford. Para inmunodetectar la LEA 4 (sección 5.3.11.), se empleó 35 μ g de proteína total de cada grupo y 2 μ g de proteína total de ejes secos de maíz (control positivo). Se tiñeron las proteínas en la membrana mediante la tinción de rojo de Ponceau.

5.4.7. LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN LOS DIFERENTES TEJIDOS DE LA CARIÓPSIDE

La localización de la proteína LEA 4 en las diferentes partes de la cariósida es relevante para conocer el lugar específico de la semilla donde desempeña su función. Además, este dato se desconoce para la mayor parte de las LEA 4 citadas en la literatura. Por ello, se disectaron las diferentes partes que componen la semilla (eje embrionario, cotiledón, endospermo y pericarpo), de cada estructura se extrajo la proteína total (sección 5.4.1.), la cual se cuantificó por Bradford. Para inmunodetectar la LEA 4 (sección 5.3.11.), se empleó 15 μ g de proteína de cada extracto.

5.4.8. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN TEJIDOS VEGETATIVOS

Se sembraron 20 plantas de maíz var. Tuxpeño cultivar costeño mejorado, crecidas en semilleros de unicel de 4 cm de diámetro x 12 cm profundidad, con mezcla 3 *Sunshine*® como sustrato, a temperatura de 24-28 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y mantenidas a capacidad de campo con solución de sales N6 al 50% (*Sigma*®). La sequía se inició con 12 plántulas con 2 hojas desplegadas (2do. estadio) y físicamente homogéneas. Las plántulas se transfirieron junto con su sustrato a un recipiente de polietileno de 10 cm de diámetro x 15 cm de profundidad y el espacio entre las paredes del recipiente y el sustrato se rellenó con PEG 8 000 granular. Para evaluar la respuesta al estrés se usaron plantas de 48 y 72 h posteriores a la aplicación del PEG y como control negativo se usaron tres plantas sin este tratamiento. Por cada punto se tomaron 3 plantas, se dividieron en dos secciones: aérea (porción foliar y el pseudotallo hasta la corona) y radicular (todas las raíces a partir de la corona), se ultracongelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -72°C. Se extrajo la proteína total (sección 5.4.1.), y se cuantificaron por Bradford. Para inmunodetectar la LEA 4 por WB (sección 5.3.11.), se usó 35 μ g de proteína total de cada muestra y 1 μ g de proteína de eje quiescente de maíz (control positivo). El

contenido relativo de agua (RWC) se estimó en las hojas desplegadas de cada planta mediante la ecuación de Schonfeld *et al.*, 1988:

$$RWC = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso turgente} - \text{peso seco}} \times 100$$

El peso fresco se midió 15 min después de remover la hoja; el peso turgente, después de rehidratarlas 12 h a 25°C, poniendo el envés de cada hoja sobre H₂O. El peso seco, se obtuvo después de haberlos llevado a peso constante (3 días a 60°C). Para el cálculo del RWC de cada tratamiento, se integraron los datos obtenidos para cada planta, se calcularon por separado y se promediaron. Los valores se graficaron con sus desviaciones estándar.

5.4.9. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA LEA 4 EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El callo embriogénico se obtuvo de ejes inmaduros de maíz de mazorcas de 15 días post-polinización. Estos embriones se desinfectaron por 30 min sumergiendo 10 elotes en 900 mL de solución de hipoclorito de sodio marca *Clorox*® al 2.6%, con 2 gotas de Tritón X-100 y 2 gotas de Tween 20. Luego, se pasaron a etanol al 70% por 15 min y finalmente se hicieron 3 lavados con agua estéril desionizada. Posteriormente, los embriones se disectaron manualmente y se establecieron en medio de inducción, sales N6 (Chu, *et al.*, 1975), 2,4-D 9 µM, inositol 5.5 µM, prolina 2 µM, niacina 0.8 µM, tiamina 0.06 µM, piridoxina 0.05 µM, caseína hidrolizada 0.200 g·L⁻¹, sacarosa 3%, pH 5.7 y 3.3 g·L⁻¹ de *Phytigel*®), poniendo el eje embrionario en contacto con la superficie del medio (con el escutelo hacia arriba). En este medio permanecieron en oscuridad por 21 d a 25 ±2°C. Luego, se pasaron a medio de proliferación (N6, 2,4-D 0.45 µM, BAP 0.45 µM, inositol 5.5 µM, prolina 2 µM, niacina 0.8 µM, tiamina 0.06 µM, piridoxina 0.05 µM, caseína hidrolizada 0.200 g·L⁻¹, sacarosa 3%, pH 5.7 y 3.3 g·L⁻¹ de *Phytigel*®) y permaneció en las mismas condiciones ambientales durante 3 meses con subcultivos constantes en el mismo medio cada dos semanas. En este estado, se tomó una muestra de 2 g de callo. Posteriormente, los callos se continuaron a subcultivar en medio de diferenciación (igual que el anterior, pero con 50% de 2,4-D) y se pusieron en fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad a 25 ±2°C por 9 d y en este estado se tomó una muestra de 2 g de callo. Así mismo, se seleccionaron grupos de 2 g de callos con los que se probaron los siguientes tratamientos de 8 h cada uno: a) sequía (los callos se pusieron en un desecador con CaCl₂), b) ABA (5 µM), c) NaCl (100 mM en el medio de cultivo,) d) frío (4°C). Las muestras se ultracongelaron en N₂ líquido, se

homogeneizaron y de ≈ 0.2 g se extrajo la proteína total (sección 5.4.1.), se cuantificó por Bradford. Para inmunodetectar la LEA 4 por *WB* (sección 5.3.11.), se cargaron 30 μg de proteína y 2 μg de proteína total de eje quiescente (control positivo).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS *in silico*

Para encontrar una proteína ortóloga putativa de maíz del grupo de las LEA 4, se realizó un análisis BLASTp contra la base de secuencias de *Zea mays* del NCBI empleando la LEA 4-5 de *Arabidopsis thaliana* (accesión: NP_196294.1) como secuencia de entrada. Se encontró la siguiente secuencia:

```
mqpamqagktaveatkeaaanvgasanagmqktraavqggqvekatarnasdkaaaeerqrvraa  
elqkqdvranaaakeratggaatyqhghpsqgagpgigagqghygggrvapagghveagvgetrpva  
rgtgtarpsaahnplvgdsfsqargtgqyq
```

La localización en el MGDB es 10:70645289-70646218. El valor E arrojado por el BLAST respecto a la secuencia LEA 4-5 de *Arabidopsis thaliana* es de 6×10^{-18} , con una identidad máxima del 36% y 98% de cobertura total. A la secuencia se le determinó el perfil de hidropatía para determinar zonas hidrofílicas e hidrofóbicas a lo largo de la secuencia, todo bajo el supuesto que las LEAs 4 son muy hidrofílicas y con PNDOR FIT (Xue *et al.*, 2010) se predijo el desorden intrínseco (Figura 1).

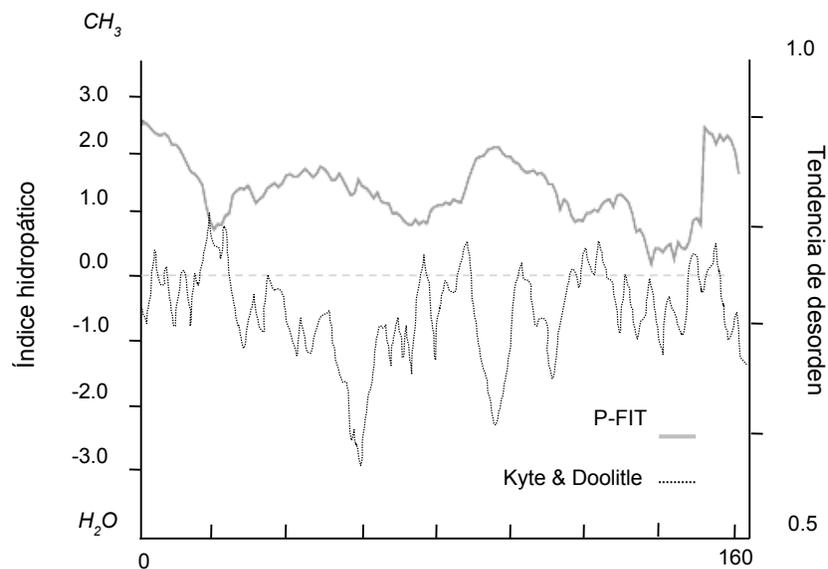


Figura 1. Perfil de hidropatía y predicción del desorden de la proteína LEA 4 de maíz. Prácticamente toda la proteína es hidrofílica e intrínsecamente desordenada. El desorden se estimó con PONDOR-FIT y el perfil de hidropatía mediante ProtScale, empleando el algoritmo de Kyte y Doolittle, 1982. En ambos casos se empleó un valor de ventana de 7 aa.

También se predijo que esta proteína no es globular, no tiene puentes disulfuro y en la región N-terminal, posee un motivo Pfam No.: F03760 (Pfam: LEA_1), estas características se predijeron con GLOBE (Rost, 1998), DISULFIND (Ceroni, *et al.*, 2004) y HMMPFAM (Bateman *et al.*, 2004), respectivamente. Por otra parte, el pI y peso molecular son de 10.38

también presentan este motivo. Además, un último que está en un scaffold (scaffold:AGPv3:scaffold_49).

Por otro lado, para averiguar la presencia de posibles elementos en *cis* regulatorios en el promotor del gen GRMZM2G448627, se seleccionó el promotor putativo (la región 2 Kb, localizada río arriba del ORF de la LEA 4) y a esta región se le predijeron elementos de unión a factores de transcripción, empleando para ello la base New PLACE.

Cuadro 2. Predicción con New PLACE de los elementos de unión a factores de transcripción en la región promotora putativa del gen que codifica para la LEA 4 en maíz. Hay diferentes sitios putativos de unión a factores de transcripción de respuesta a estrés abiótico (marcados en rojo); en negrita se resaltan el ROOTMOTIFTAPOX1 que es específico para raíz.

ELEMENTO	UBICACIÓN	SECUENCIA
DREHVCBF2	24 (+), 24 (-)	GTCGAC
ABREMOTIF	27 (-)	ACGTGKC
GADOWNAT	27 (-)	ACGTGTC
RHERPATEXPA7	40 (+),107 (-),1544 (-)	KCACGW
BFCORE	41(-), 52(+), 70(+), 745(-), 1005(+),1490(-)	ACACNNG
MYCCONSENSUS	41(+,-), 106(+,-), 145(+,-), 745(+,-), 1006(+,-), 1106 (+,-), 1447(+,-), 1490(+,-), 1549(+,-), 1685(+,-)	CANNTG, CACATG
GRAZMRAB28	76 (-)	CATGCCGCC
MYBCORE	132 (+)	CNGTTR
ROOTMOTIFTAPOX1	157 (+), 338 (-), 389 (+), 411 (+), 436 (-),458 (+), 815 (-), 1019 (+),1029 (-), 1203 (-),1204 (+),1464 (+), 1483 (+),1611 (-), 1669 (-), 1770 (-), 1876 (-)	ATATT
MYB1	658 (+)	WAACCA
PROXB	667 (+)	CAAACACC

Para encontrar el subgrupo al que pertenece la LEA 4 (NP_001150746.1) y asignar una nomenclatura más específica (de acuerdo a Battaglia, *et al.*, 2010), se construyó un árbol filogenético con secuencias LEA 4 de diferentes especies (Figura 4).

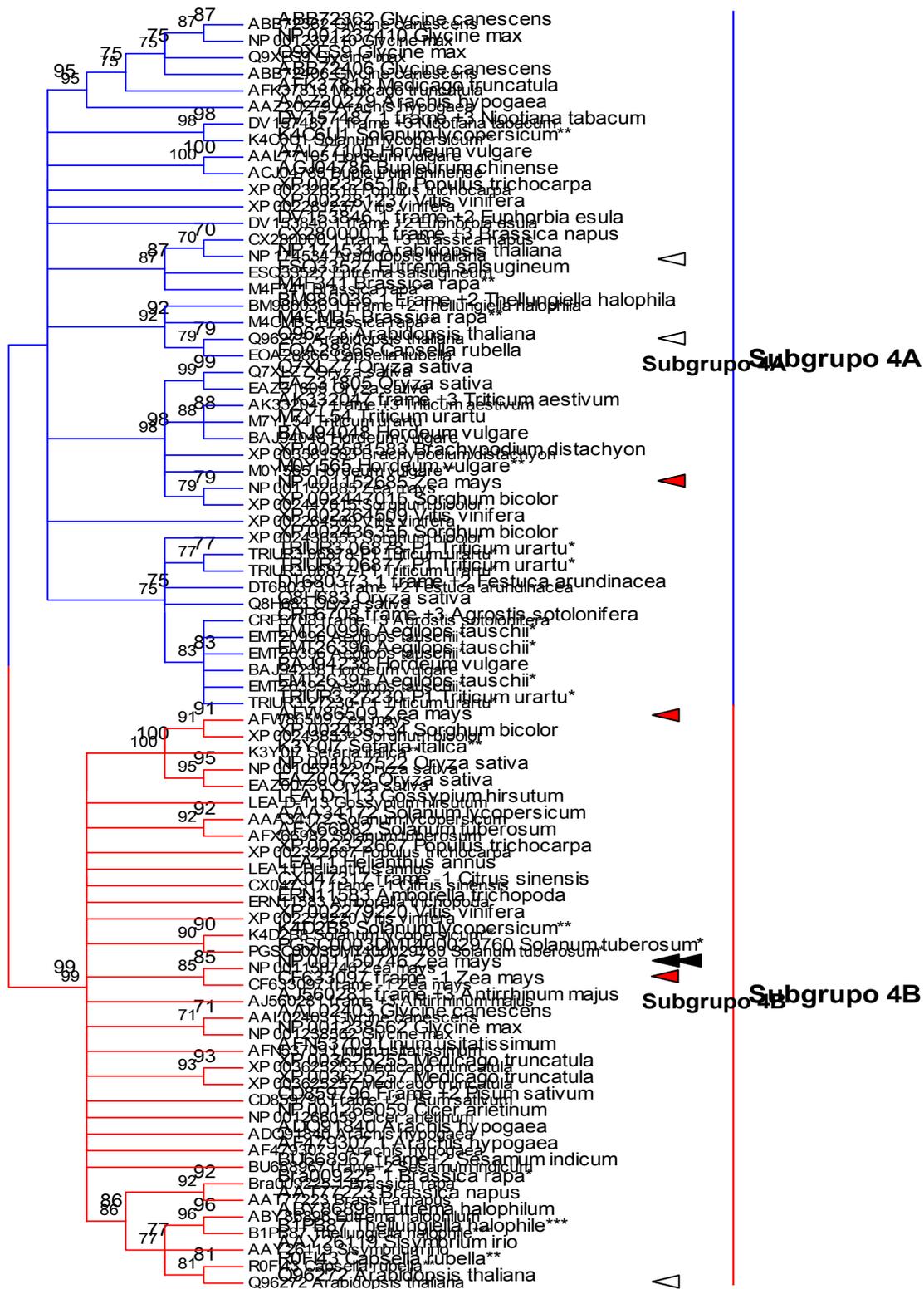


Figura 4. Árbol filogenético de las proteínas LEA 4. Las secuencias fueron tomadas del NCBI y EnsemblePlants, Unipro, Pfam y otras del trabajo de Battaglia *et al.*, 2010. Con flechas rojas se indican las secuencias de maíz que codifican para LEAs 4, con flechas negras, la secuencia de maíz caracterizada en este trabajo y en flechas blancas están indicadas las secuencias de *A. thaliana* evaluadas en el trabajo de Olvera-Carrillo *et al.*, en 2010. Las secuencias fueron analizadas con MEGA 5.2 empleando la matriz de sustitución de Jones-Taylor-Thorton, con 500

bootstrap. Las ramas con valores de bootstrap <70 se colapsaron. La LEA caracterizada pertenece al subgrupo B.

Por otro lado, para producir los anticuerpos anti LEA 4, se obtuvo una proteína recombinante de GST::LEA 4. Para ello, primero se optimizaron los codones del ORF de la LEA 4 (del mRNA reportado en el NCBI que codifica para la NP_001150746.1), con la finalidad de reducir el contenido de GC de 77.56% a 66.57, eliminar codones raros y modificar el índice de adaptación de codones (CAI) de 0.73 a 0.89 para *E. coli* y facilitar de esta forma, la manipulación de la secuencia y mejorar la traducción de la recombinante en este modelo. Tratada así la secuencia, se envió a sintetizar y clonar en el pUC 57 a la compañía Genescript®.

6.2. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-LEA 4 Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-LEA 4

El ORF de la LEA 4 se amplificó a partir del vector pUC 57-*lea* 4 con los oligonucleótidos PGL4F BamHI F 5'-ATAATTGGATCCATGCAGGCGGGCAAGACAGC-3' y PGL4R EcoRI R 5'-GAATGTGAATTCTTACTGATACTGGCCGCCCGT-3' y se subclonó en el vector pGEX 4T2 entre los sitios BamHI-EcoRI, para producir la fusión GST::LEA 4 (Figura 5).

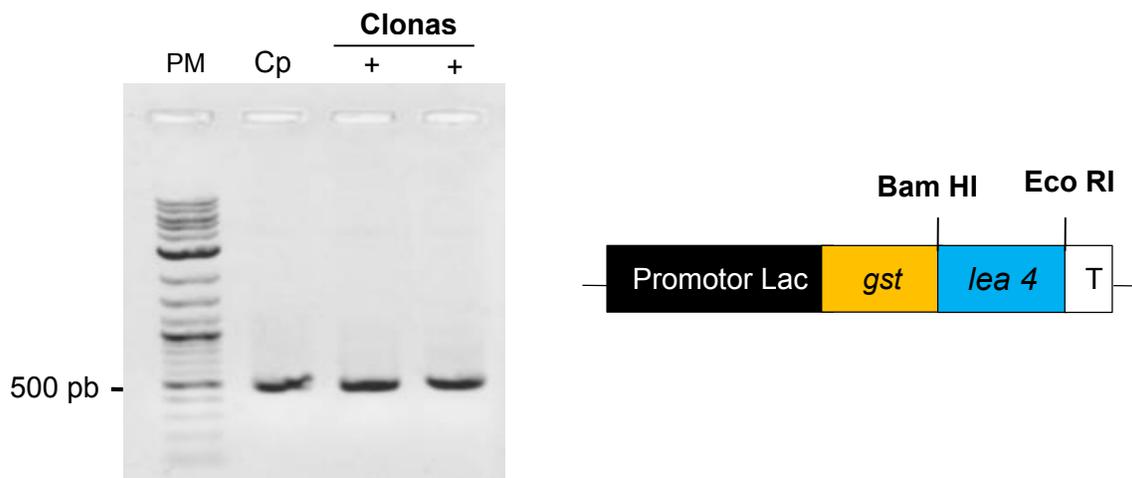


Figura 5. Construcción del vector pGEX 4T2-*lea* 4. A la izquierda, escrutinio de transformantes. CP: Control positivo pUC57-*lea* 4. +: clona con el inserto. A la derecha, representación del CDS de la construcción.

Con este, se transformaron células *E. coli* BL21 codón plus y las clonas transformantes se identificaron por PCR con los oligonucleótidos PGL4F BamHI F y PGL4R EcoRI R (Figura 6).

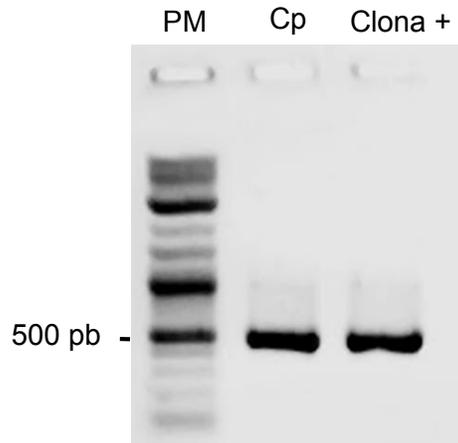


Figura 6. Escrutinio de transformantes de *E. coli* cepa BL21 codón plus con el pGEX 4T2-*lea* 4. Cp: Control positivo pUC 57-*lea* 4. Clona+: Clona transformada con pGEX 4T2-*lea* 4.

Por otro lado, para estimar el tiempo de óptimo de inducción de la proteína recombinante se realizó una cinética de crecimiento celular de células *E. coli* cepa BL21 transformadas con el pGEX 4T2 y se monitoreó la producción de la proteína recombinante a la 0, 1 y 3 h, post-inducción con IPTG 1 mM. Las células del cultivo se empastillaron, lisaron y el extracto total se analizó en geles de SDS-PAGE al 16%. A 1 h hay inducción, pero a las 3 h es más abundante, por lo que para los ensayos siguientes se usó éste último tiempo (Figura 7).

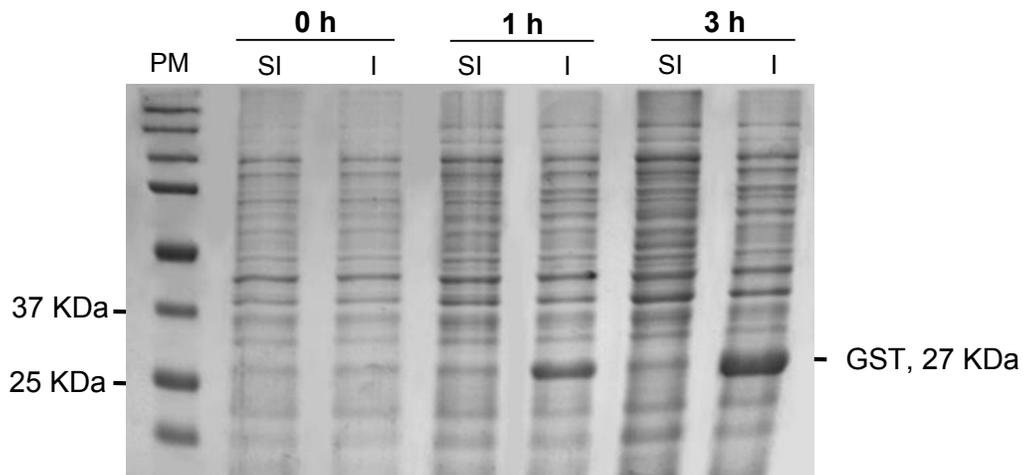


Figura 7. Lisados de *E. coli* BL21 transformadas con pGEX 4T2, inducidas con IPTG 1 mM y resueltas en SDS-PAGE al 16%. SI: sin inductor. I: con inductor. La flecha indica la GST al peso molecular esperado.

Estas condiciones de inducción se emplearon con la *E. coli* BL21 codón plus transformadas con pGEX 4T2-LEA 4. El tamaño del producto es \approx 43 KDa (Figura 8).

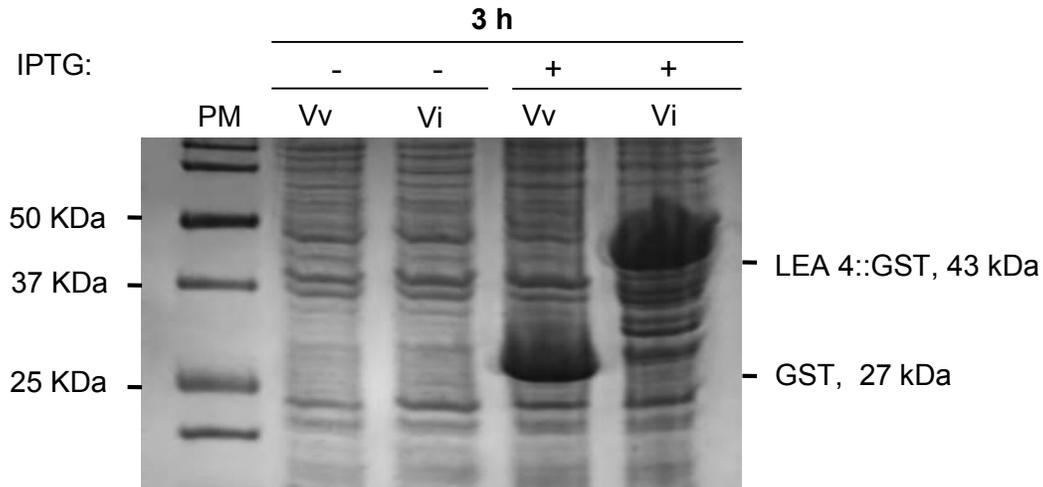


Figura 8. Evaluación de las condiciones de inducción de la proteína de fusión. Vv: vector vacío pGEX 4T2. Vi: vector inserto (pGEX 4T2-*lea 4*). En estas condiciones, se observa una acumulación importante de la proteína de fusión.

Posteriormente, se procedió a la purificación de la GST-LEA 4 por cromatografía de afinidad a glutatión sefarosa.

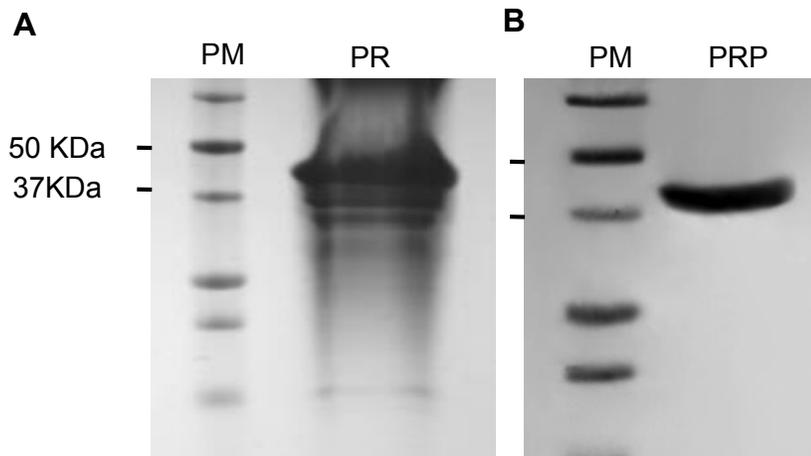


Figura 9. Purificación de la proteína de fusión GST-LEA 4 resuelta por SDS-PAGE al 16 %. A) purificación por glutatión sefarosa. B) purificación a partir del corte y elución de la banda correspondiente de SDS-PAGE en geles. En cada caso se cargó 0.3 μ g de proteína.

Con la proteína GST::LEA 4 pura se inmunizaron conejos. Primero se obtuvieron muestras de suero pre-inmune de los conejos para cerciorarse que los anticuerpos basales no reaccionaran frente a las proteínas totales de eje de maíz quiescente. Esto se evaluó por WB. No se observó ninguna interacción (Figura 10).

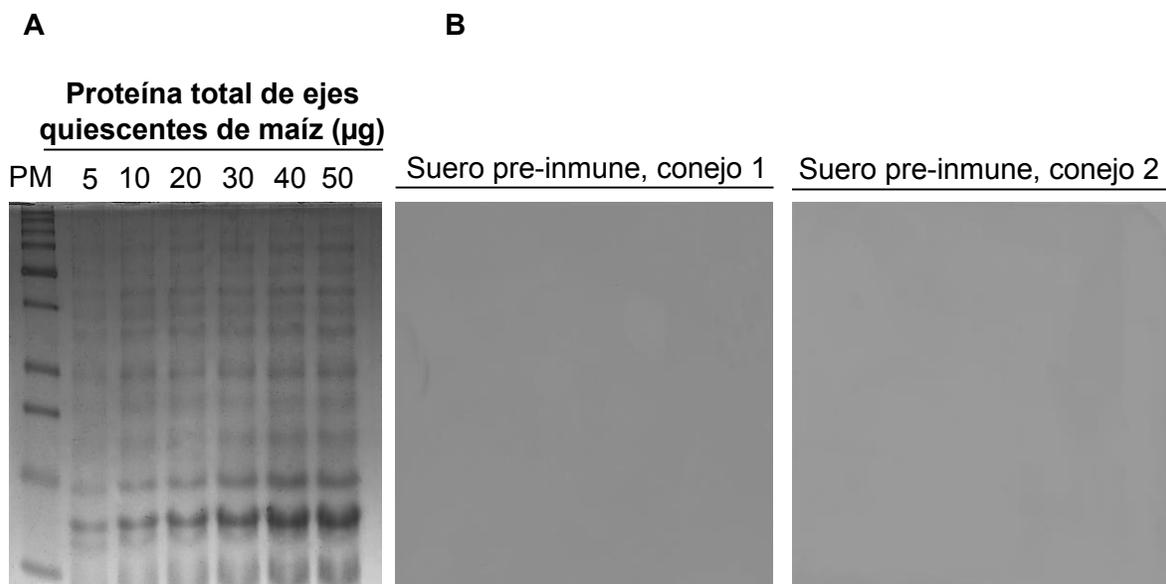


Figura 10. Reactividad de anticuerpos endógenos de conejo frente a proteína total de ejes secos de maíz. Se probaron cantidades de 5 a 50 µg de proteína total. a) Tinción con Coomassie de las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS al 16%. b) Ensayo *WB* con suero pre-inmune de los conejos (dilución 1: 500). No hay interacción de los anticuerpos del suero y las proteínas de maíz.

Se intentó cortar la etiqueta de GST para obtener la LEA 4 pura y usarla para realizar ensayos de competencia de péptidos. Para esto, la GST::LEA 4 se purificó y digirió con trombina. Luego al eluato se le aplicó un choque térmico. Sin embargo, la trombina realizó cortes inespecíficos a lo largo de la LEA 4. Por otro lado, para analizar si sucedió lo mismo con el tag de GST, se eluyó la GST unida a la resina y mediante un SDS PAGE se comparó con GST recombinante producida por la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el pGEX 4T2 y aislada con el mismo paquete. Además, para corroborar que las bandas adicionales observadas, son fragmentos de la LEA 4 digerida y no proteínas contaminantes, se realizó un *WB* con los anticuerpos anti-LEA 4 y se comprobó que las bandas adicionales fragmentos de la LEA 4. Como control positivo se empleó 1 µg de proteínas totales de ejes de maíz quiescentes. En la comparación se observa que la banda del control positivo de maíz corresponde a la banda más grande identificada en el eluato (Figura 11).

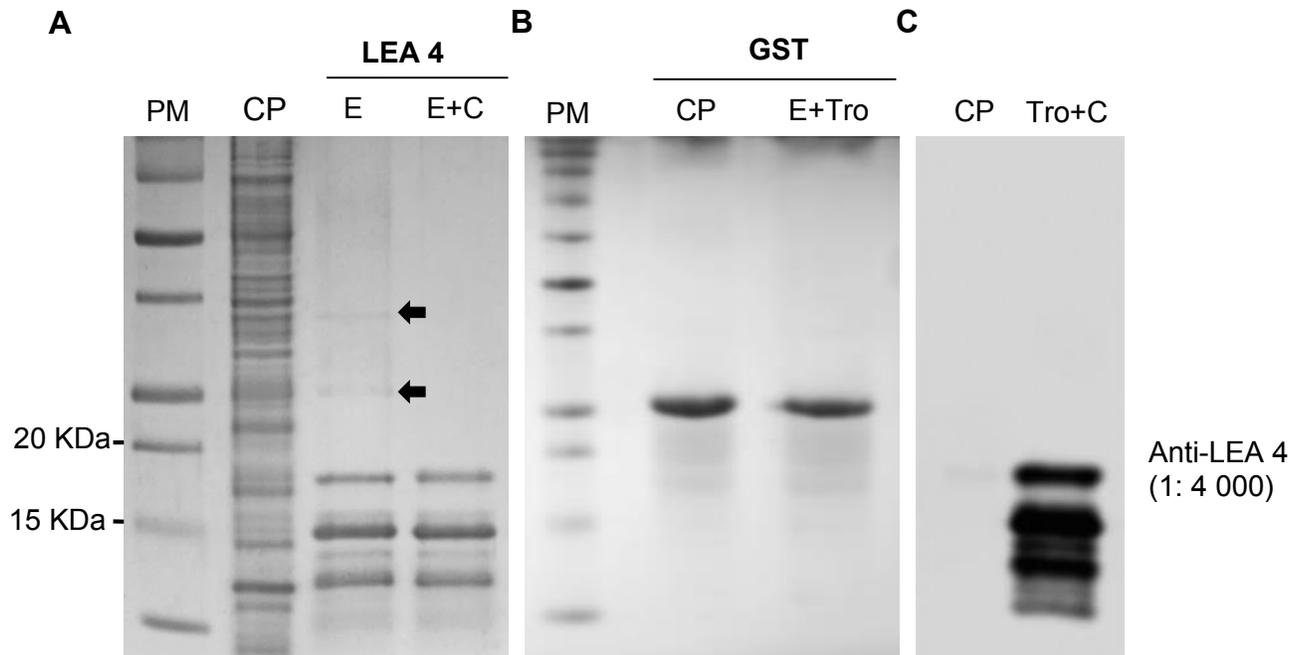


Figura 11. Eliminación del tag de GST con trombina. A) CP: control positivo (proteína total de ejes quiescentes de maíz). E: proteína LEA recombinante purificada, cortada con trombina y eluida de la glutatión sefarosa. E+C: lo mismo que en E, pero tratada con calor como paso adicional. Las bandas contaminantes señaladas con flechas desaparecen. B) CP: control positivo (GST inducida y purificada). E+Tro: GST eluida después de digerir la recombinante GST-LEA 4. C) WB de extracto de maíz y las bandas obtenidas en A (E+C). En el CP se observa una banda a la misma altura que la banda más alta de E+C.

Realizado esto, se evaluó el título de anticuerpos mediante dot blot, usando a la proteína recombinante obtenida con trombina y tratada con choque térmico -E+C-, (Figura 12).

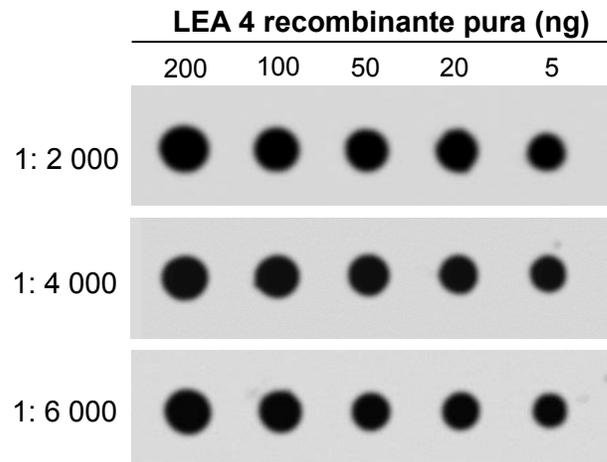


Figura 12. Reactividad del anticuerpo frente a proteína recombinante purificada. Se probó la reactividad de un gradiente de proteína de 200 a 5 ng contra tres diluciones de anti-LEA 4 (1:2 000, 1:4 000 y 1: 6 000). Dilución anticuerpo secundario, 1:10 000.

La inmunoespecificidad de los anticuerpos anti-LEA 4, se evaluó por *WB*, con un gradiente (de 5-35 μg) de proteínas totales de ejes quiescentes de maíz (Figura 13).

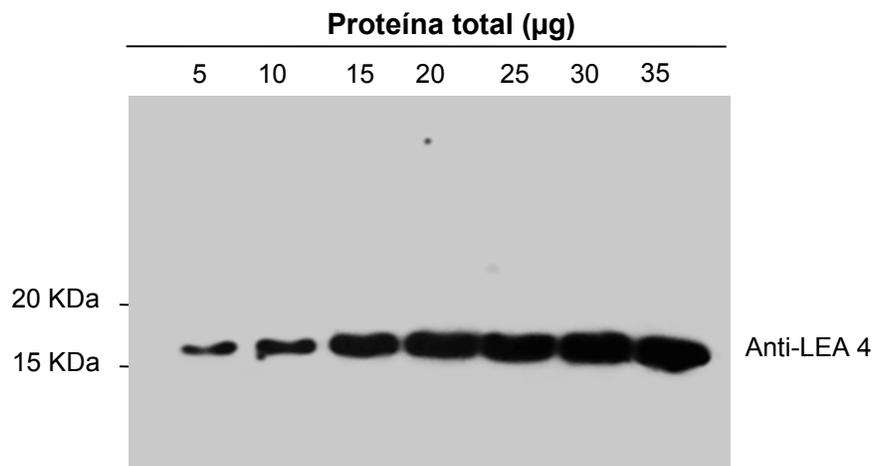


Figura 13. Ensayo de inmunodetección de LEA 4 en un gradiente de proteínas de eje quiescente de maíz resueltas en SDS-PAGE al 16%. Se distingue una banda única a una altura semejante a la que se espera a la LEA 4. La dilución del anticuerpo empleada fue de 1: 5 000.

Además, para evaluar la inmunoselectividad, se realizó un ensayo de competencia de péptido empleando los péptidos producidos por la acción de la trombina sobre la LEA 4 y tratados con choque térmico (E+C, Figura 11), usando un gradiente de proteína total de ejes secos de maíz y como competidor, la proteína recombinante liberada de la GST, empleando una relación de 5:1 competidor: proteína total de suero inmuno-reactivo (Figura 14).

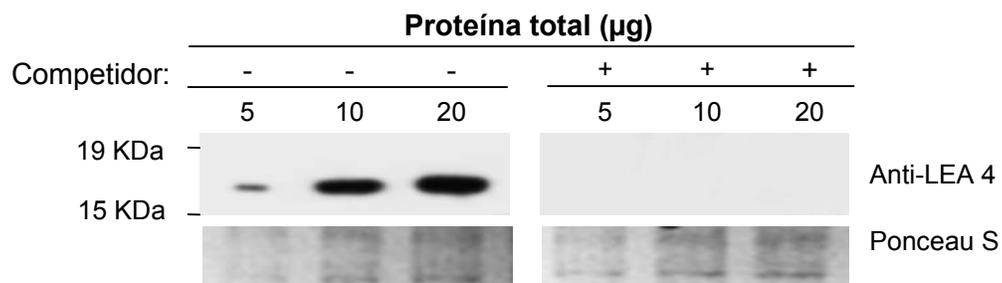


Figura 14. Ensayo de competencia con un gradiente de 5 a 20 μg de proteína total de eje quiescente de maíz. El competidor titula al anticuerpo y abate la señal.

6.3. DETERMINACIÓN DE LA TERMOACIDOSOLUBILIDAD DE LA LEA 4 EN EJES DE MAÍZ QUIESCENTES

Una vez comprobada la fiabilidad de los anticuerpos, se evaluó indirectamente la inestructura de la LEA 4. Para ello, se probó la solubilidad de la LEA en condiciones agregantes, esto es, tratando extractos crudos de proteína total de ejes secos de maíz con choque térmico (96°C, 15 min y hielo, 30 min), seguido de la adición del TCA al 3%. Las proteínas solubles e insolubles de cada etapa se resolvieron SDS-PAGE y la proteína LEA 4 se inmunodetectó por *WB*. Bajo las condiciones probadas, la LEA 4 permanece soluble y además se enriquece (Figura 15).

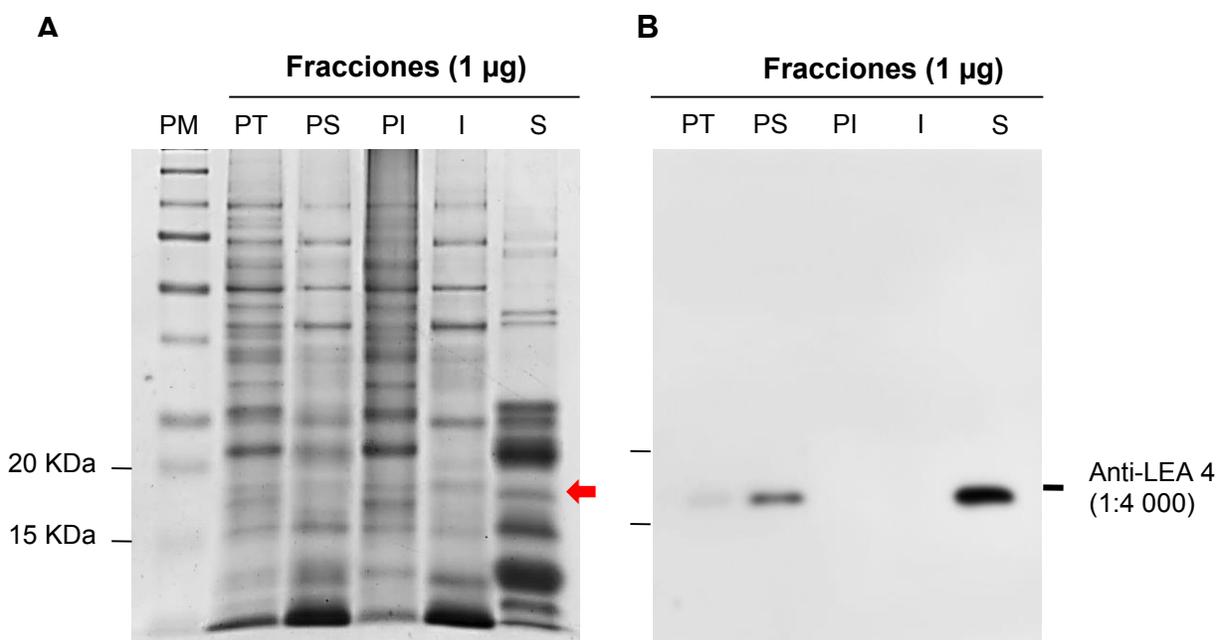


Figura 15. Termoacidosisolubilidad de la LEA. A) Perfil de proteínas totales (PT) y de la proteína soluble (PS) e insoluble (PI) tras el choque térmico; de la proteína insoluble y soluble (S 3%) tras agregar TCA al 3%. B) *WB* del gel corrido en paralelo. La proteína LEA 4 se enriquece en cada fraccionamiento.

6.4. OBTENCIÓN DE LA LEA 4 RECOMBINANTE

Debido a que no fue posible liberar a LEA 4 de la etiqueta de GST sin proteolizarse, se clonó el marco abierto de lectura de LEA sin etiquetas en el vector pTrc99a (Figura 16), para así poder caracterizar las propiedades de solubilidad de la recombinante.



Figura 16. Esquema general de la construcción pTrc99a-*lea 4*. El marco abierto de lectura que codifica para LEA 4 se clonó entre los sitios EcoRI en el flanco 5' y BamHI en el 3' y bajo el promotor trc, el cual es inducible por IPTG.

Los escrutinios de células de *E. coli* cepas DH5α y BL21 transformadas con el vector pTrc99a-*lea 4*, se hicieron por PCR con los oligonucleótidos PGL4F BamHI F 5'-ATAATTGGATCCATGCAGGCGGGCAAGACAGC-3' y PGL4R EcoRI 5'-GAATGTGAATTCTTACTGATACTGGCCGCCCGT-3' (Figura 17).

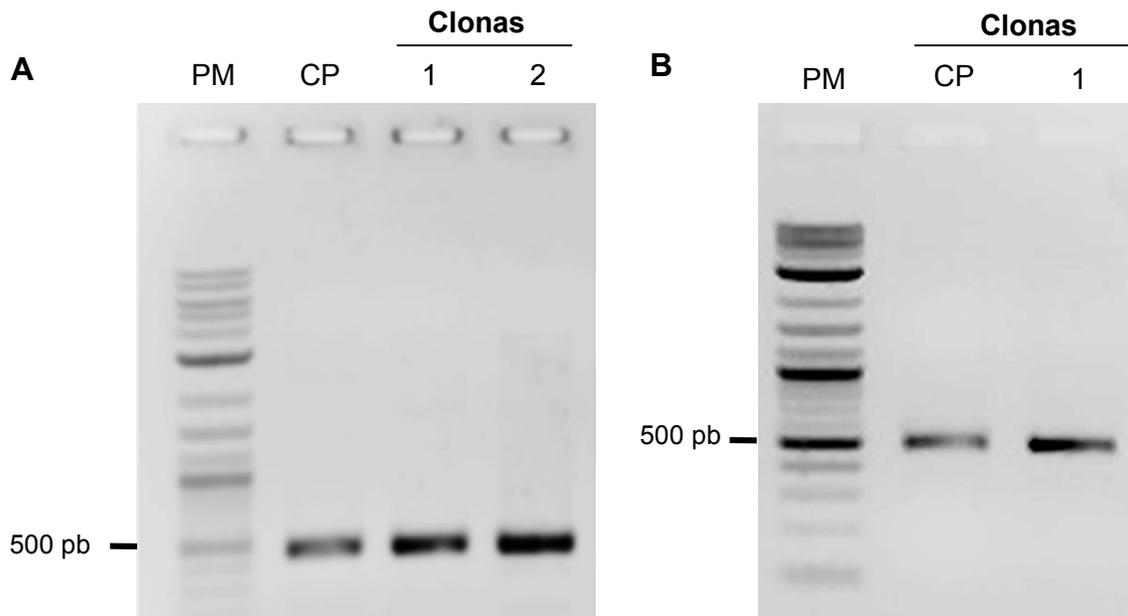


Figura 17. Escrutinio de transformantes por PCR. EcoRI R de clones recombinantes de la clonación pTrc99a-*lea 4*. A) clones recombinantes de la cepa DH5α. B) clones recombinantes BL21. CP: control positivo (pUC 57-*lea 4*).

Se indujo la proteína recombinante sin etiquetas en *E. coli* cepa BL21 y se purificó por choque térmico, seguido de la adición de TCA al 3%, corroborando que la recombinante posee características fisicoquímicas similares a la proteína inmunodetectada en los extractos de maíz (Figura 18).

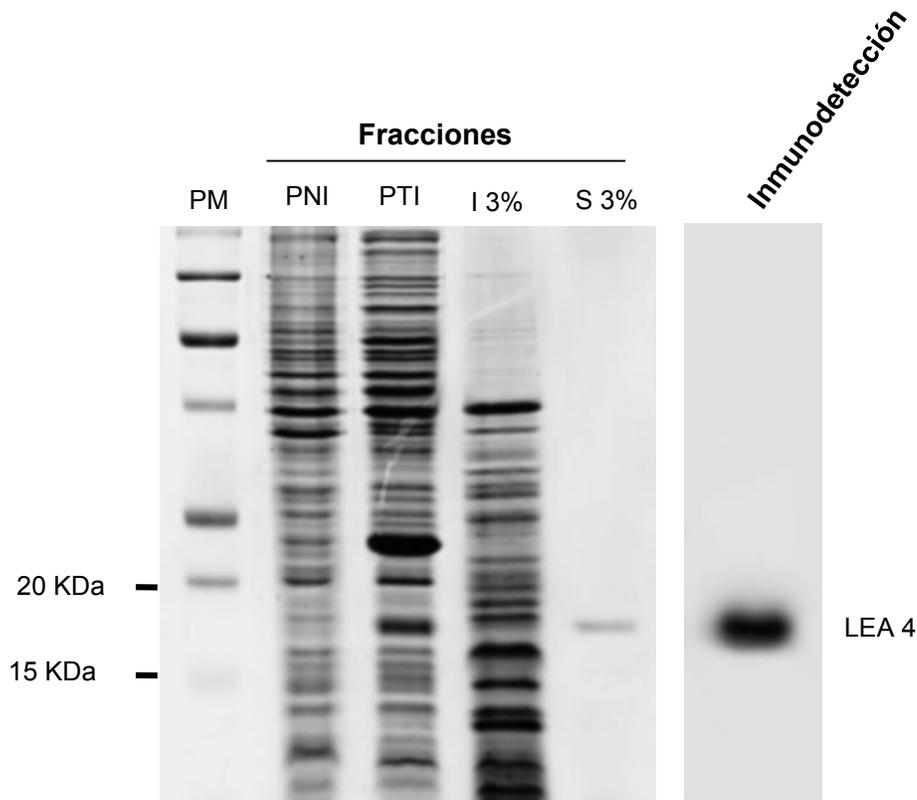


Figura 18. Inducción de la proteína LEA 4 recombinante y purificación mediante choque térmico y TCA al 3%. A la derecha se muestra un gel de Coomassie de las diferentes etapas de purificación. PNI: proteína total de *E. coli* transformada con el pTrc99a-*lea 4* sin IPTG. PTI: lo mismo que en PNI pero con IPTG. I 3%: proteína insoluble después de tratar con 3% de TCA la fracción termosoluble del extracto PTI. S3%: proteína soluble (LEA 4 pura) después de tratar con 3% de TCA la fracción termosoluble del extracto PTI. A la izquierda, inmunodetección de la fracción S3% con anticuerpos anti-LEA 4.

6.5. PERFIL DE LA EXPRESIÓN DE LA LEA 4 DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA Y LA GERMINACIÓN

Las LEA son proteínas que son abundantes en la embriogénesis, por lo que se analizó la cinética de acumulación de la LEA 4 en el embrión en la embriogénesis zigótica y durante la imbibición. Además, se comparó su patrón de aparición con el de una LEA 2 (empleando para esto anticuerpos contra el segmento K -una región conservada de estas proteínas-). Se encontró que ambas proteínas presentan una cinética de aparición semejante y que este perfil de proteínas, está relacionado con el contenido de agua del endospermo (Figura 19).

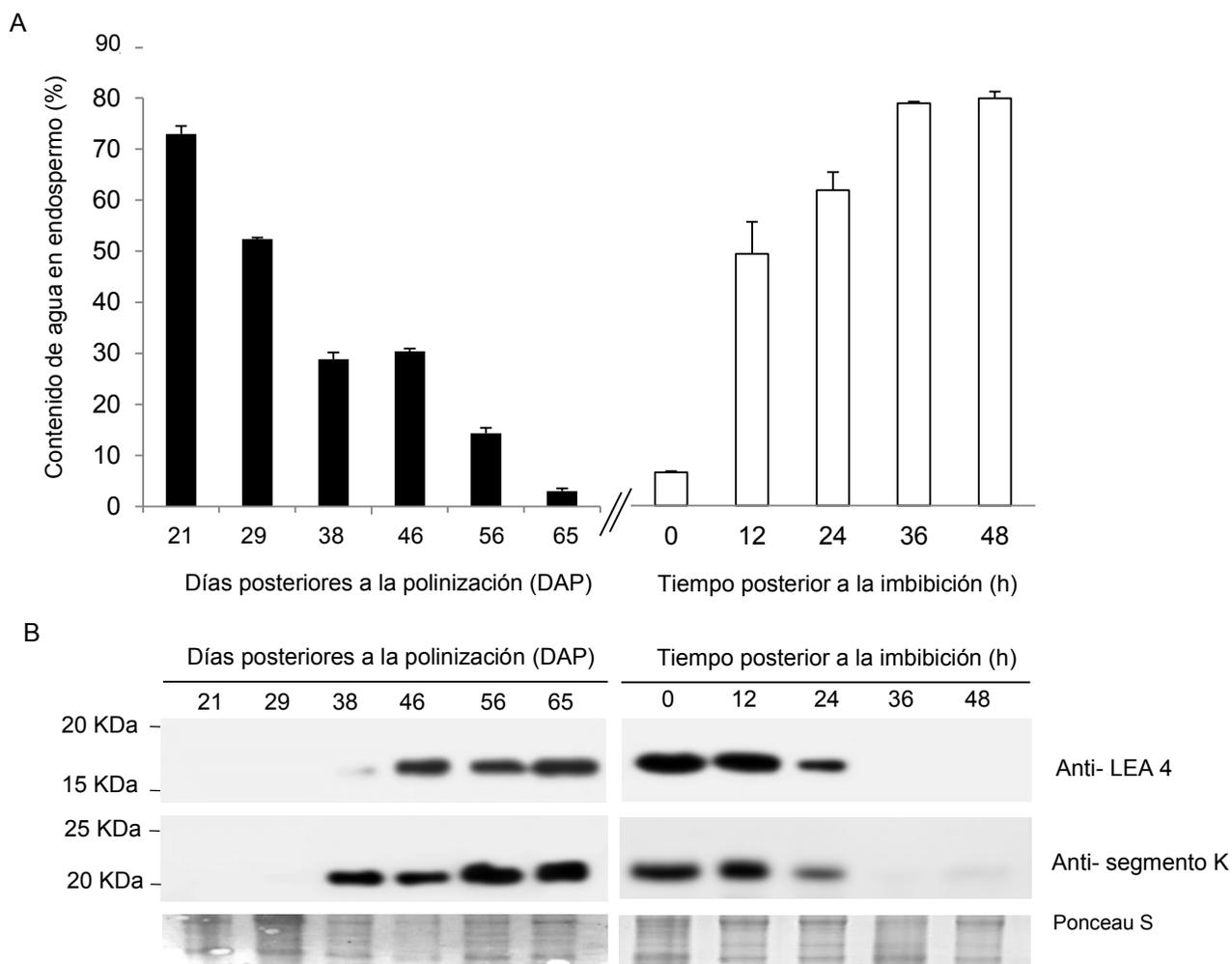


Figura 19. Perfil de la proteína LEA 4 en el desarrollo de la cariósida y la imbibición. A) Contenido de agua de los endospermos de las cariósidas empleadas para los WB, construida con tres grupos de aproximadamente 25 endospermos cada uno. Las barras son las desviaciones estándar de las lecturas. **B)** Inmunodetección de la LEA 4 en extractos de proteína total (20 µg) de ejes de diferentes días post-polinización. **B)** inmunodetección del segmento K de las dehidrinas (LEAs 2) usado como comparativo. Abajo de las inmunorélicas se muestran las proteínas teñidas en la membrana.

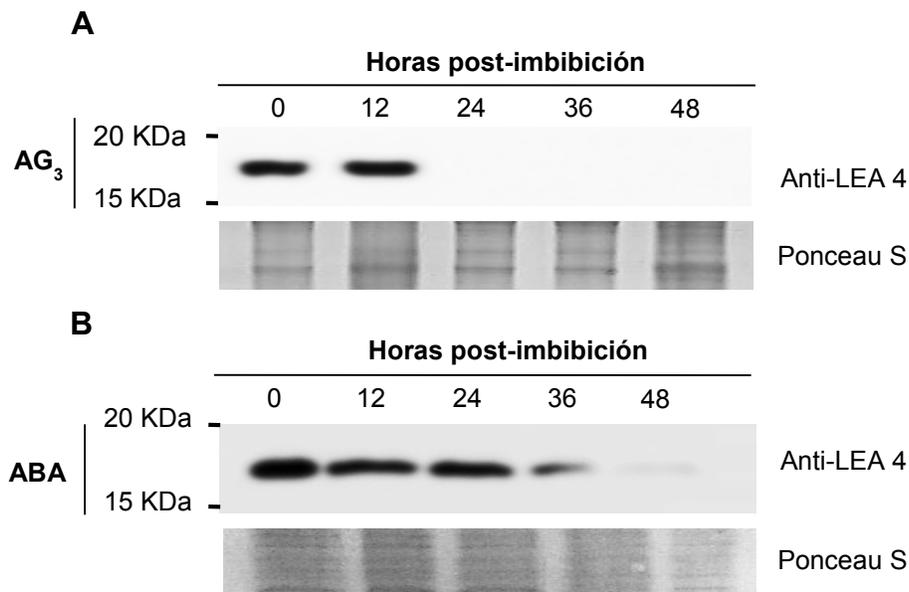
Además, se encontró que el mRNA de la LEA 4 se mantiene a niveles coordinados con la cantidad de proteína.



Figura 20. Expresión del mRNA de la LEA 4 a diferentes horas post-imbibición evaluada por RT-PCR a partir del RNA total de ejes de maíz de 0, 12, 24, 36 y 48 h post-imbibición. Como control de carga se usó el 18 S.

6.6. EFECTO DEL GA₃ Y ABA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LEA 4 DURANTE LA GERMINACIÓN

Los resultados anteriores respaldan la idea de que ésta proteína es una LEA 4 y dado que el ABA es un fitoregulator importante de la expresión de genes *lea* y a que el promotor putativo del gen *lea 4* tiene sitios de unión a factores de transcripción que son coordinados por esta hormona y por el AG₃ (Cuadro 3, sección 6.1), se decidió analizar el papel de estas hormonas en la acumulación de la LEA 4 en semillas durante la imbibición. Se encontró que la acumulación de la LEA 4 en la germinación responde negativamente a AG₃ y positivamente a ABA y se correlaciona con el contenido de agua y el desarrollo de las carióspsides (Figura 21).



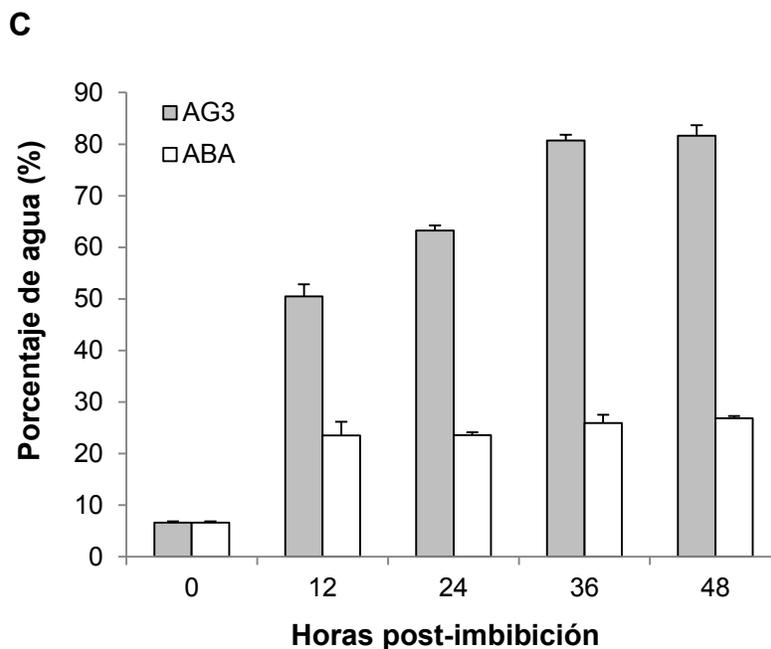


Figura 21. Acumulación de la LEA 4 a diferentes horas post-imbibición y su relación con el contenido de agua de carióspsides expuestas a AG₃ y/o ABA. A: WB de proteína extraída de ejes de carióspsides expuestas a AG₃ (577.4 μM). B) WB de proteína extraída de ejes de carióspsides expuestas a ABA (100 μM). C) contenido de agua de endospermos de los ejes usados para extraer proteína, expresado como contenido porcentual de agua. Las barras de error son las desviaciones estándar de las lecturas hechas por triplicado.

6.7. INDUCCIÓN DE LA LEA 4 POR ABA EN EMBRIONES INMADUROS

La acumulación paulatina durante las últimas etapas de la embriogénesis zigótica y la observación de que los niveles de la proteína disminuyen toda vez que avanza la germinación y desaparecen de forma precoz y retardada en respuesta a AG₃ y ABA, respectivamente, da las bases suficientes para pensar que la regulación del gen *LEA 4* está mediada por el ABA, razón por la que se decidió probar el efecto de la aplicación de ABA sobre la acumulación de la LEA 4 en embriones inmaduros de maíz de 21 dap (es decir, en una etapa en la que no se detecta señal en condiciones normales) y confirman que el gen *lea 4* es regulado por ABA (Figura 22). Estos resultados son acordes a los presentados en las Figuras 19, 20 y 21.

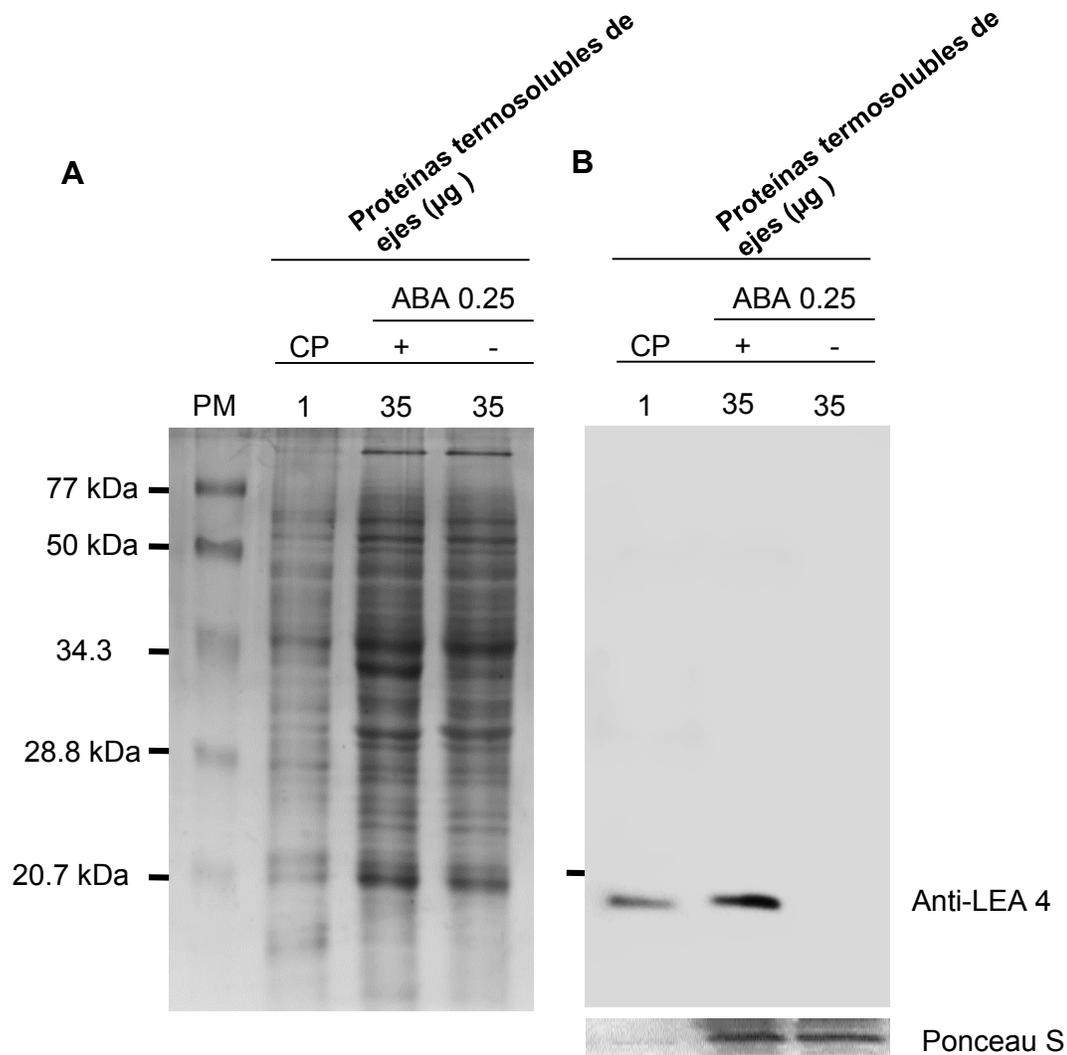


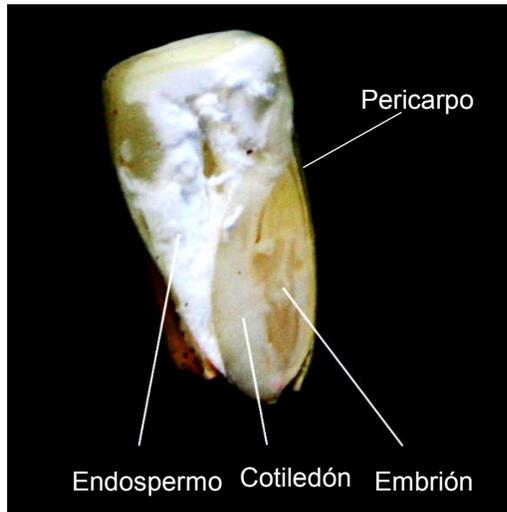
Figura 22. Inducción de la proteína LEA 4 en embriones de 21 dpp en respuesta a ABA. A: gel teñido con Coomassie de las proteínas termosolubles de ejes de maíz. Proteínas de eje quiescente de maíz (CP: control positivo), proteínas de eje inmaduro de maíz tratadas con ABA (+) y sin ABA (-). **B:** WB de las proteínas de A. Aparece una banda cuando al peso aproximado de la LEA 4 cuando se aplica ABA a los embriones de 21 dpp. Finalmente, como control de carga, la tinción con rojo de Ponceau de la membrana usada para el WB.

6.8. LOCALIZACIÓN DE LA LEA 4 EN DIFERENTES TEJIDOS DE LA CARIÓPSIDE QUIESCENTE

Para determinar en qué tejidos de la cariósida se localiza la proteína LEA 4, se disectaron cariósidas de maíz para separar el embrión, el endospermo, el pericarpo y el cotiledón. De estas estructuras, se obtuvo la proteína total y se inmunodetectó la LEA 4 en cada una. Esto es relevante en el sentido que permite discernir si la función de esta proteína se da a nivel de la cariósida en su conjunto o sólo se encuentra limitada a uno o un grupo

determinado de tejidos. Este último caso parece ser el que ocurre, ya que sólo se pudo detectar en embriones de semillas y en ningún otro tejido (Figura 26).

A



B

15 horas post-imbibición con agua

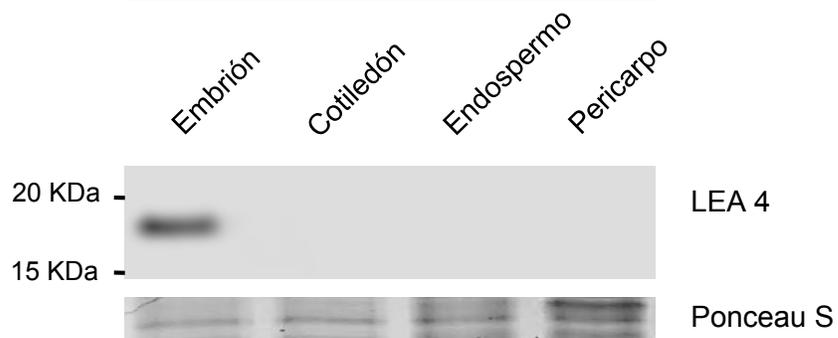


Figura 23. Acumulación de la LEA en diferentes secciones de la cariósida de maíz 15 horas posteriores a la imbibición. En A, se muestran gráficamente los elementos que se analizaron, mientras que en B, se aprecia el WB de los extractos obtenidos de cada fracción. Por carril se cargaron 15 µg de proteína total. Debajo, se muestra la tinción con rojo de Ponceau como control de carga.

6.9. EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La presencia de la LEA 4 en los embriones zigóticos de maíz, planteó la posibilidad de que esta proteína también participa en la embriogénesis somática. Este no parece ser el caso, ya que no se detectó la presencia de la LEA en callos de maíz durante la etapa de inducción de embriones somáticos y tampoco cuando éstos son sometidos a diferentes tipos de estrés (Figura 23).

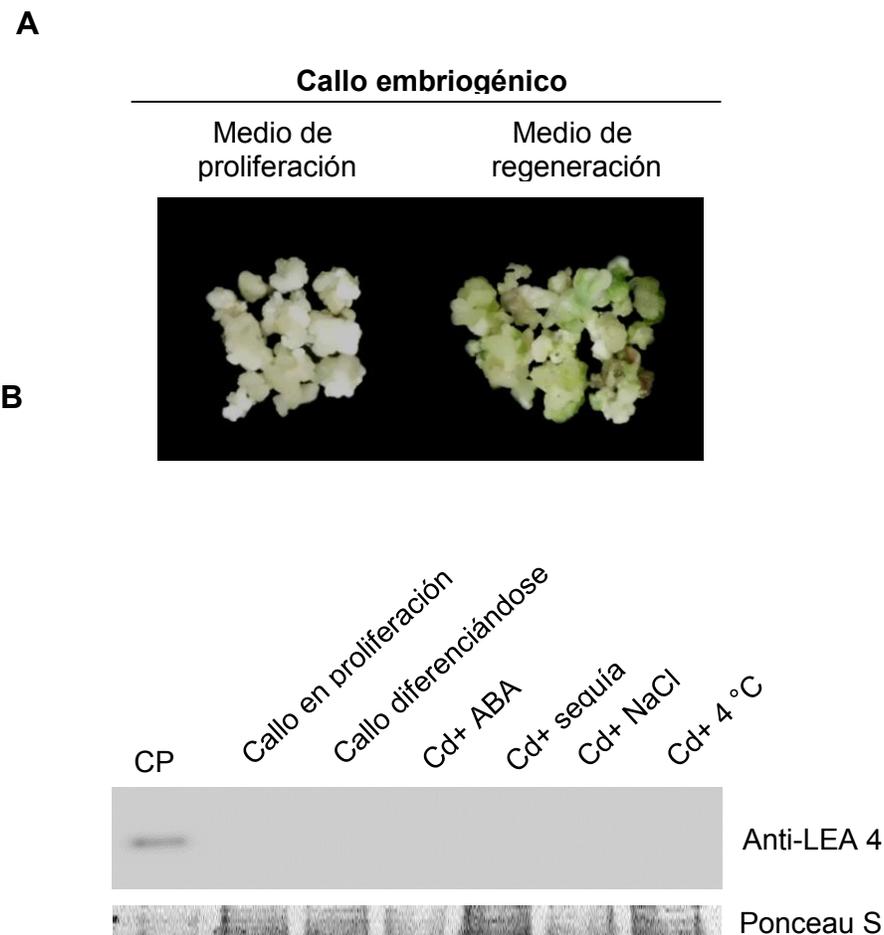
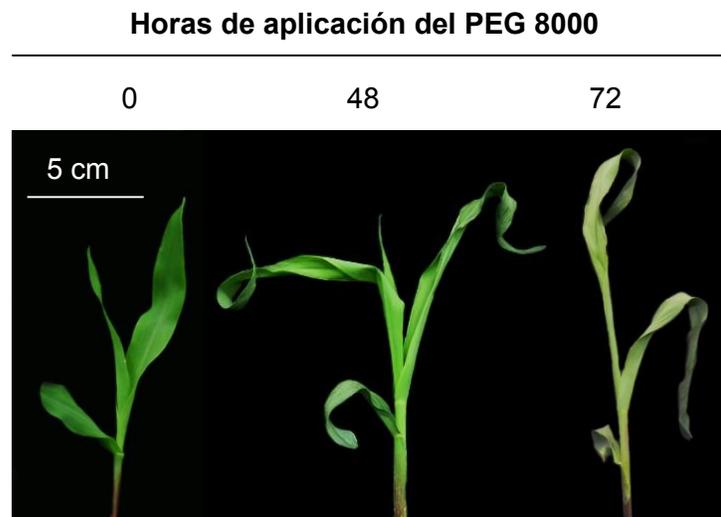


Figura 24. LEA 4 en callos embriogénicos de maíz. A: morfología del callo en medio de proliferación y después de 9 días en medio de diferenciación. B) WB en el que no se detecta señal bajo las condiciones evaluadas. CP: control positivo (proteína total de ejes quiescentes de maíz). Callo en medio de proliferación. Callo en medio de diferenciación (Cd). Cd, tratado con ABA (0.25 μ M), sequía (8 h), NaCl (100 mM, 8 h) y 4°C (8 h).

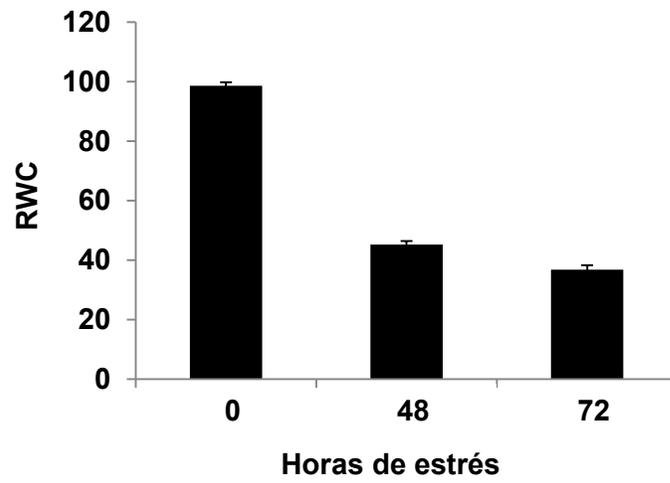
6.10. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA LEA 4 EN TEJIDOS VEGETATIVOS EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

Finalmente, para probar que esta proteína está involucrada en la respuesta a estrés hídrico, se evaluó por *WB* su inducción en tejidos vegetativos deshidratados, tanto en la porción aérea (tallo+hojas), como en raíz (Figura 25 C) y para validar la señal se realizaron ensayos de competencia de péptidos (Figura 25 D). Como medida fisiológica de estrés se estimó el RWC en hojas (Figura 25 B).

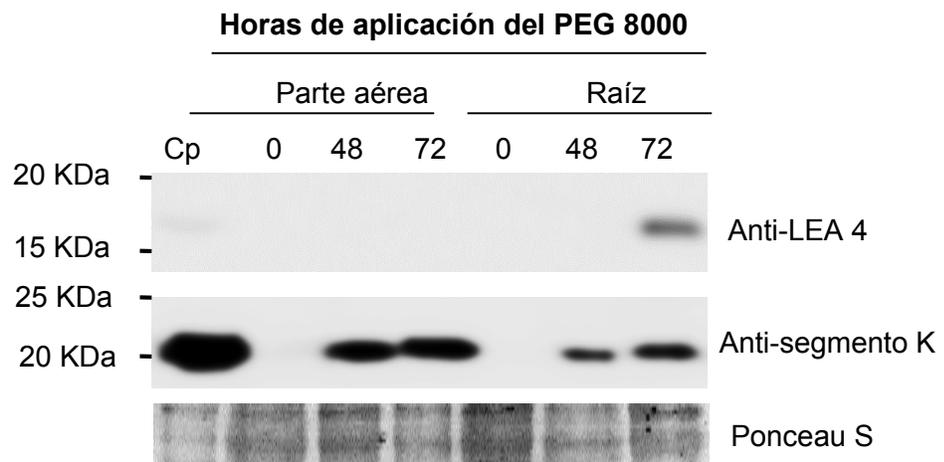
A



B



C



D

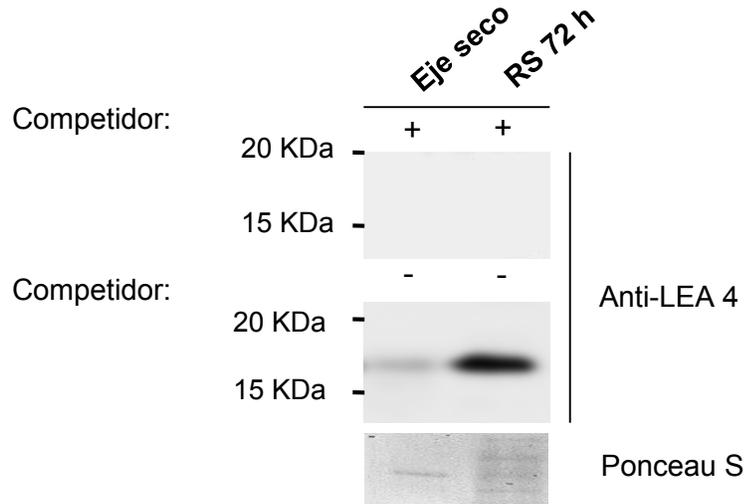


Figura 25. Análisis de LEA en tejidos vegetativos de plantas de maíz sometidas a estrés hídrico. A) ejemplo representativo del aspecto físico de plantas control y estresadas por falta de agua al momento del muestreo. B) determinación del RWC en tres muestras independientes. Las barras representan las desviaciones estándar de las lecturas. C: evaluación de la inducción de la proteína LEA 4 en la porción aérea y radicular a 0, 48 y 72 h post-aplicación del PEG 8000. CP: control positivo (proteína total de ejes de maíz quiescentes). Se usaron anticuerpos anti-segmento K de las dehidrinas como control de estrés. D: ensayo de competencia de péptido de LEA 4 empleando la proteína recombinante purificada de *E. coli* por calor y TCA. La señal del anticuerpo se abate con el competidor.

7. DISCUSIÓN

7.1 LA LEA 4 ES APARENTEMENTE INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA

La idea de estructura-función, es un cuasi-dogma generalmente aceptado para proteínas tales como enzimas, anticuerpos, receptores hormonales y neurotransmisores, para las que se considera, existen como estructuras compactas en las que el esqueleto polipeptídico y sus cadenas laterales se pliegan en una conformación única que es crucial para la función de la proteína. Sin embargo, se ha visto que algunas secuencias de aminoácidos (aa) que se caracterizan por tener cargas netas elevadas y poca hidrofobicidad, adoptan, en solución, ensamblados extendidos, conformaciones flexibles con poca o ninguna tendencia a la estructuración. Este fenómeno se conoce como desorden intrínseco (^aDunker *et al.*, 2008).

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs), esto es, proteínas que contienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) o que carecen completamente de estructura a lo largo de toda su longitud, son abundantes, especialmente en eucariontes (Uversky *et al.*, 2000; Suskiewicz, *et al.*, 2011). Dado que la secuencia de aminoácidos contiene la información del plegamiento proteico, resulta razonable pensar que la falta de estructura tridimensional también esté contenida a este nivel. De hecho, se sabe que la tendencia al desorden intrínseco está dado por particularidades a nivel de composición de aminoácidos. Por ejemplo, hay residuos que actúan como residuos promotores de orden (ej. W, C, F, I, Y, V, L, H, T y N), de entre estos residuos destacan los que además son hidrofóbicos (W, F, Y y T). En general, estos residuos promotores de orden son poco abundantes en la mayoría de las IDPs, mientras que los residuos polares y cargados, los cuales son abundantes en este tipo de proteínas, funcionan como residuos promotores del desorden-, (ej. K, E, S, Q, R y M, además de P). Los aminoácidos A y G se consideran neutrales (Sun *et al.*, 2013). Estas observaciones hacen posible que las predicciones de desorden sean significativamente mejores que las predicciones de estructura tridimensional, esto a pesar de que ambas son inherentes a la secuencia de aminoácidos (^bDunker *et al.*, 2008). De ahí que los programas de predicción de desorden sean herramientas confiables y en general se consideran argumentos claves sobre la existencia y distinción de IDR (Radijovac *et al.*, 2007).

Dentro de las IDPs se encuentran las proteínas LEAs, las cuales son proteínas altamente hidrofílicas (con un índice de hidrofiliidad >1), que tienen escasos residuos de C y W, pero son ricas en G, A, Q, K, R y T (con más del 6% de G), tienen baja complejidad, poseen una carga neta relativamente alta, carecen de una estructura definida aparente y son solubles bajo condiciones desnaturalizantes como el calor (Cuming, 1999; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Uversky *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2001; Wise y Tunnacliffe, 2004; Battaglia *et al.*, 2010). Estas características se evaluaron para la proteína LEA 4 en este trabajo con el fin de validar si la proteína en cuestión cumple estos criterios. De acuerdo con la predicción bioinformática, no hay regiones ordenadas a lo largo de la secuencia de LEA 4 (Figura 2). Además, carece de cisteínas y tiene pocos aminoácidos aromáticos grandes como F (0.6%), Y (1.9%) y W (0%) (Cuadro 2). En cambio, es rica en aa hidrofílicos (43% de D, E, K, N, R, S, T y Q) y cargados (24% de D, E, K, H y R) y G (13.9%), por lo que no resulta extraño que el perfil hidropático muestre que toda la secuencia es homogéneamente hidrofílica, lo que indica que esta proteína no es transmembranal, pues carece de los aminoácidos hidrofóbicos necesarios para cruzar la membrana (Lodish, *et al.*, 2000). Este aspecto hace que la accesibilidad predicha al solvente de la mayoría de los residuos sea elevada y la estructura globular sea prácticamente nula. El promedio de hidropaticidad (GRAVY) es de -0.754, menor a 0 como el de todas las proteínas hidrofílicas (Kyte y Doolittle, 1982). A su vez, los residuos de la región N-terminal, tienden a formar una estructura secundaria de α hélice, mientras que el resto son regiones tipo *coils* (Figura 1). De hecho, los ≈ 70 -80 aa que conforman la región N-terminal, están relativamente conservados en las proteínas LEA 4 y dan lugar al motivo Pfam PF03760, los cuales tienden a formar α hélices anfipáticas, mientras que el C-terminal está menos conservado, lo cual es una característica descrita en la literatura pero que hasta el momento carece de significado biológico (Dure *et al.*, 1993; Battaglia *et al.*, 2008). La región N-terminal es rica en aminoácidos cargados, de tal forma que la proporción de residuos cargados de la región N terminal respecto a los residuos cargados de región C-terminal es aproximadamente de 2:1. Aunque tal observación no ha sido todavía asociada a una función específica, lo mismo se ha observado para otras LEA 4, como PM16 (NP_001237410.1 de *Glycine max*), PM29 (Q9XES9 de *Glycine max*) y PAP260 (Q39138 de *Arabidopsis thaliana*) que tienen la mayoría de sus residuos cargados en la mitad de la secuencia hacia el N-terminal del polipéptido, mientras que otras como D113 (P09441 de *G. hirsutum*) y PM1 (NP_001238562.1 de *G. max*) (Chen *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1988; Shih *et al.*, 2004), los tienen distribuidos de manera homogénea a lo largo de la secuencia. El hecho de que en

esa región la predicción indique que la secuencia tiende a formar α hélices, es congruente con lo reportado para otras LEAs 4, por ejemplo, la LEA 14 y la D113 (Shao *et al.*, 2005). Análisis espectroscópicos de la PM16 (LEA 4) de *Glycine soja*, confirman parcialmente estas predicciones. En solución acuosa, esta proteína es principalmente desordenada, aunque se detectaron ciertas estructuras helicoides. Además, la presencia de compuestos capaces de inducir estructuras ordenadas, tales como 1% SDS, 50% trifluoretanol (TFE, agente desolvatador), o en el estado seco, esta proteína adopta casi 90% de conformación α hélice (Shih *et al.*, 2004). Otro ejemplo es LEAM, una LEA 3 de chícharo. Con esta proteína se hicieron experimentos de filtración en gel que sugieren una estructura no globular y además su espectro CD en solución acuosa es típico de una estructura tipo *random coil*. Sin embargo, posee una alta probabilidad de plegarse en motivos α hélices, de acuerdo con predicciones bioinformáticas de la estructura secundaria (Grelet *et al.*, 2005), y en presencia de TFE o SDS, se indujo un cambio reversible en su espectro de CD, al pasar de uno de IDP a uno de proteínas con regiones de α hélices (Tollete, *et al.*, 2007). Con lo que se confirma que bajo ciertas condiciones estas proteínas pueden plegarse parcialmente.

Experimentalmente, la falta de estructura de la proteína se determinó indirectamente mediante los ensayos de solubilidad en calor y en presencia de TCA. Este tipo de ensayos se usa para separar al conjunto de proteínas estructuradas de las no estructuradas, ya que sus propiedades fisicoquímicas contribuyen a su solubilidad en este tipo de medio y se usa para enriquecer proteínas LEA en extractos proteicos (Oliveira *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2011; Amara *et al.*, 2012; Burrieza *et al.*, 2012). De hecho, se sugiere que una de las propiedades distintivas de las IUPs es su habilidad de permanecer soluble después de aplicar calor y en presencia de ácido tricloroacético (TCA) (Campos *et al.*, 2011). La razón de lo anterior, radica en que las proteínas globulares se pliegan alrededor de núcleos hidrofóbicos y su plegamiento está, al menos, dirigido por el efecto hidrofóbico (Scheef y Fink, 2003). Esto provoca que las proteínas globulares posean regiones hidrofóbicas fuera del alcance de las interacciones polares del solvente. Cuando este tipo de proteínas se someten a cambios de temperatura, estas regiones quedan expuestas. Al exponerse regiones hidrofóbicas de moléculas diferentes, también se favorecen las colisiones hidrofóbicas intermoleculares, con las que se forman agregados moleculares de mayor tamaño. Cuando estos agregados alcanzan una masa crítica, precipitan. Las UIPs en cambio, no precipitan por el mismo hecho de que carecen de regiones hidrofóbicas (Tompa,

2002), de tal forma que cuando ocurre cambios en el medio que obligan a modificar la disposición de sus residuos en el espacio, al no haber regiones hidrofóbicas que puedan dar lugar a esos agregados, simplemente no precipitan. Por su parte, a pesar de su amplio uso, el mecanismo por el cual el TCA induce la precipitación de las proteínas no se comprende del todo. Un mecanismo plausible es que a bajas concentraciones, los iones de tricloroacetato promueven la pérdida de estructura, mediante la ruptura de interacciones electrostáticas que desestabilizan la conformación nativa de las proteínas. El desplegamiento parcial de las proteínas da lugar a la exposición de la cara no polar al solvente, lo que resulta en la coalescencia intermolecular de moléculas de proteínas proximales, lo que permite su precipitación (Rajalingam, *et al.*, 2009). Por otra parte, la composición de aa de las proteínas inestructuradas explica por qué las proteínas IUP resisten más a la precipitación por TCA, apoyados en que su alta proporción de residuos hidrofílicos favorece amplias zonas de interacción con el solvente y probablemente, pocas zonas de interacción intra e intermoleculares que contribuyan al colapso intermolecular, la coalescencia y finalmente, la precipitación de la proteína. El modelo anterior, sin embargo, no es suficiente para explicar el hecho de que algunas proteínas LEA con pl ácido y que son capaces de permanecer solubles después del choque térmico, se insolubilizan en presencia de TCA (Campos *et al.*, 2011). Sin embargo, se completa, si se toma en cuenta que el TCA, por tratarse de un ácido, también induce la precipitación isoeléctrica de proteínas, es decir, cuando al cambiar el pH, la carga neta de las proteínas tienden a cero y las fuerzas de repulsión electrostáticas se anulan, haciendo que las proteínas se agreguen y precipiten (Rajalingam, *et al.*, 2009). De esta manera, esta prueba permitió determinar que la proteína en cuestión se comporta como una IDP.

La navegación genómica es una estrategia que se ha empleado para descubrir genes LEA de otros grupos de maíz (Amara *et al.*, 2011). Mediante esta estrategia, se encontró que en el genoma de maíz B73, el gen que codifica la LEA que se caracterizó en este trabajo se ubica en el cromosoma 10, por lo que se puede denominar LEA 4-10 de acuerdo con la nomenclatura propuesta en el trabajo de Olvera *et al.*, en el 2010. Por otro lado, también se encontraron otras 2 secuencias génicas anotadas que codifican proteínas con un Pfam PF03760. La secuencia génica GRMZM2G473960 en el marco +1 codifica para una LEA 4 putativa de 112 aa y entre los 7 y 23 DAP se expresa en endospermo y en embrión (de acuerdo con la aproximación de EST del NCBI) (Lai *et al.*, 2004). Sin embargo, no hay datos disponibles sobre su expresión en otros tejidos en condiciones de estrés. La secuencia

GRMZM2G177084 en el marco -1 codifica para otra LEA putativa. En este caso, esta secuencia se obtuvo de una biblioteca obtenida de raíces y brotes que fueron sometidos a sequía (Alexandrov *et al.*, 2009), pero tampoco hay datos sobre su presencia en embriones. Además, existe un tercer gen putativo, el cual se localiza en un scaffold, por lo que no aparece en el genoma ensamblado (Figura 3).

Además, Olvera *et al.*, en el 2010 encontró que el grupo 4 de las proteínas LEA divergió en dos subgrupos, el subgrupo A y el subgrupo B. En el árbol filogenético de la Figura 6, se observa que LEA 4 pertenece al subgrupo B.

Por otro lado, una de las características comúnmente asociada a las IDPs, es su susceptibilidad a la proteólisis (Tompa y Fuxreiter, 2008). De hecho, la proteólisis limitada es usada como herramienta para detectar desorden (Fontana, *et al.*, 2010), a raíz que la proteólisis enzimática está influenciada por características estructurales superiores a la interacción entre el sustrato y la proteasa, además de las restricciones impuestas por la especificidad primaria de la enzima (Wu *et al.*, 1999) y explica que la mayor sensibilidad proteolítica de las IUPs resulte del hecho de que las proteasas rompen en sitios que poseen accesibilidad estérica y flexibilidad suficiente para hacer contactos productivos, los cuales son mayores en estas proteínas debido a la falta de un estado de equilibrio estructural. De esta forma, los dominios globulares muestran una resistencia significativa a la proteólisis, mientras que las UIPs son muy sensibles a lo largo de toda su secuencia (Tompa, 2002). Lo anterior puede explicar, por qué la proteína recombinante fue cortada por la trombina en sitios donde aparentemente no debía cortar según el análisis *in silico* hecho con PeptideCutter. Se descarta que las bandas adicionales encontradas se deban a la contaminación de la preparación con otras proteínas, debido a que es reconocido consistentemente por el anticuerpo y son termosolubles. La integridad de la GST retenida en la columna (que funciona como control interno, Figura 14B) refleja que ésta no se hidroliza inespecíficamente por la trombina bajo esas mismas condiciones, lo cual puede deberse a que esta proteína es completamente estructurada y carece de sitios de corte para trombina. Por otra parte, las IUPs unen menos SDS que lo usual esto debido a su composición de aminoácidos y su peso aparente es frecuentemente de 1.2 a 1.8 veces más elevado que el calculado a partir de los análisis de secuencia o las mediciones por espectrometría de masas (Tompa, 2002). Para el caso de la LEA 4, el peso nominal es de 16.09 kDa, (peso promedio considerando que las LEA tienen un peso molecular,

normalmente entre 11 y 30 kDa, Tingzhang, *et al.*, 2012) el cual difiere ligeramente de los 18.5 kDa, estimados mediante la determinación del Rf en SDS-PAGE. Esto es 1.15 veces aparentemente mayor que el peso molecular nominal, lo cual no es debido a modificaciones postraduccionales, ya que lo mismo sucede con la proteína recombinante producida en *E. coli*. Con Rab28 (LEA 5) sucede un fenómeno semejante, ya que su peso nominal es de 27.7 kDa, pero su peso aparente es de 30 kDa (Niogret *et al.*, 1996). No obstante, para determinar con contundencia esta determinación, convendría emplear métodos hidrodinámicos más exactos tales como la filtración en gel o métodos espectroscópicos.

7.2. LA LEA 4 PRESENTA UN PATRÓN DE ACUMULACIÓN CANÓNICO Y RESPONDE A SEQUÍA

Mientras tanto, las funciones individuales de las proteínas LEA permanecen a la expectativa, como resultado del escaso entendimiento de sus mecanismos moleculares de acción (Tollete, *et al.* 2007; Hunault y Jaspard, 2011) y a falta de este conocimiento, la designación estricta de una LEA puede realizarse a través de diversas vías. Y es que a pesar de que todas las evidencias anteriormente presentadas dan soporte suficiente para pensar que la proteína analizada en este estudio es efectivamente una IDP, solamente con estos datos no se puede concluir contundentemente que la proteína en cuestión es una LEA. Al respecto, la definición original de las proteínas LEA, involucra al menos dos características: la similitud de secuencia con proteínas LEA canónicas y la acumulación de la proteína en la semilla durante la embriogénesis zigótica (Tunnacliffe y Wise, 2007). Además de esto, Hughes y Galau (1989) propusieron reservar la designación de LEA solamente a proteínas que se expresan en periodos post-abscisión. Aunque lógica, la propuesta nunca fue aceptada. Sin embargo, la inducción por ABA es otra característica sobresaliente para los genes de proteínas LEA, así como lo es la respuesta a diversos tipos de estreses abióticos (ej., estrés hídrico, estrés salino y estrés por frío) (Wise, 2003). Contrario a lo anterior, no obstante, existen proteínas consideradas proteínas LEA que poseen un perfil de expresión probado que difiere de los prototipos originales. Por ejemplo, Xero 1 (XERO1_ARATH; P25863), incluida frecuentemente dentro de las LEA del grupo 2, no se encuentra en semillas y no es inducible por desecación o estrés por frío o por aplicación de ABA. Más aún, se expresa constitutivamente (Welin *et al.*, 1994). Por otro lado, la fiabilidad de la similitud de secuencia como característica discriminativa debe ser tomada con cautela, ya que la tasa de cambio de los residuos de las IDPs y de las IDRs

tienden a ser más elevadas que las de los residuos de las proteínas estructuradas, debido a que en éstas últimas, las sustituciones funcionales de los residuos está limitada por la estructura de la proteína y se ha encontrado que los cambios en los residuos ocurren más rápido en las regiones ricas en aminoácidos expuestos al solvente. Además, las regiones no estructuradas de una proteína dada, en general, exhibe menor grado de conservación relativa respecto a regiones estructuradas en la misma proteína y este caso parece ser mantenido para gran parte de las proteínas estudiadas (Brown *et al.*, 2002; ^{a,b}Dunker *et al.*, 2008). Todo lo anterior, es suficiente para justificar el hecho de que la proteína LEA 4 de maíz y sus ortólogos de algodón y *A. thaliana*, guarden niveles de similitud en secuencia bajos entre sí, además del efecto de la distancia evolutiva que separa a estas especies. Por otra parte, las secuencias de baja complejidad (como es el caso de la proteína LEA 4 de maíz) representan un problema particular para las herramientas de alineamiento local tales como BLAST (Altschul *et al.*, 2006), lo que hace menos confiables la asignación de homologías putativas basadas en esta estrategia. Todo lo anterior dio pauta a evaluar la acumulación de LEA 4 en diferentes tejidos bajo determinadas condiciones para soportar y validar experimentalmente la asignación conceptual de esta proteína, como proteína LEA 4, esto a pesar de la existencia en la literatura de casos que escapan a los esquemas generales propuestos como necesarios para considerar a una proteína LEA como tal (ej. XERO1_ARATH; P25863).

De esta forma, basados en que las proteínas LEA, en sentido estricto, se caracterizan por tener un patrón de acumulación característico durante la embriogénesis zigótica, se esperaba que la proteína LEA 4 comenzara a acumularse alrededor del día 20 después de la polinización en maíz (al final de la etapa 4 según la clasificación de Ritchie *et al.*, 1992), justo cuando comienzan a acumularse las proteínas LEA y ocurre la adquisición de la tolerancia a la desecación (Thomann *et al.*, 1992). Sin embargo, en la realidad esto no ocurrió al menos hasta el día 38, mostrando un patrón de acumulación semejante al de las dehidrinas (Wise, 2003). Por otra parte, la regulación de diversos genes *lea* se relacionan con la actividad del ABA en determinadas etapas del desarrollo o en respuesta a condiciones de estrés (Zimmermann *et al.*, 2004; Grelet *et al.*, 2005). Aunado a lo anterior, el contenido de la proteína LEA 4 disminuye rápidamente en la germinación y desaparece durante la emergencia de la radícula (lo que para esta variedad de maíz ocurre entre las 24 y las 36 horas post-imbibición) y esta acumulación guarda una relación inversa con el contenido porcentual de agua presente en el endospermo. Por ejemplo, en 2006, Boudet *et*

al., observaron asociación entre la pérdida de resistencia a la desecación y la disminución paulatina en el contenido de diferentes proteínas LEA en semillas de *Medicago truncatula*. Más específicamente, compararon el patrón de acumulación de *MtPM25* (LEA 5) y *MtEm6* (LEA 1) y hallaron que *MtPM25* desaparece a las 24 h post-imbibición, mientras que la *MtEm6*, a las 48 h. En 2004, Ming-der *et al.*, reportaron que la proteína *GmPM16* permanece hasta las 72 h post-imbibición. Otro ejemplo es el de LEA 3 mitocondrial de guisante, cuyo mensajero se pierde a las 22 h post-imbibición, pero hasta las 66 h si se aplica ABA. Mediante ensayos de transgénesis diseñados para evaluar la regulación del promotor del gen D-113 en tabaco vía expresión del gen reportero GUS, en las plántulas se observó que este gen responde a ABA, deshidratación y alta salinidad en tejidos vegetativos y su expresión es específica de las últimas etapas del desarrollo de la semilla (Luo *et al.*, 2008). Por otra parte, ciertas LEAs pueden acumularse prematuramente en embriones inmaduros disectados (como los de soya o los de maíz) mediante la aplicación de ABA (Blackman *et al.*, 1995; Ming-der, *et al.*, 2008; Amara, *et al.*, 2013). Por ejemplo, la Rab17 (LEA 3) y la Rab 28 (LEA 5), se inducen prematuramente en respuesta a ABA exógeno en embriones inmaduros, aunque la inducción de éste último es más importante (Niogret *et al.*, 1996). Una respuesta semejante ocurre para las LEAs 1 (Galau *et al.*, 1986; Ming-Der *et al.*, 2010). En el caso de LEA 4 sucede lo mismo (Figura 27), lo cual refleja la importancia que el ABA representa en la regulación de este gen. Además, si se aplica GA₃ durante la germinación, la proteína desaparece a las 12 h, contrario a lo que pasa cuando se aplica ABA, en cuyo caso la proteína está presente incluso a las 48 h (Figura 25). El desarrollo de la semilla es dirigido primordialmente por el balance de estas dos hormonas, controlando la dormancia y la germinación y que pueden estar participando mediante la regulación transcripcional del gen *lea 4* a través de factores transcripcionales regulados hormonalmente, ya que en el promotor putativo, se predice la existencia de motivos de unión a factores de transcripción, regulados por ABA, tales como ABRE, DREB y DRE y que también son punto de anclaje a factores de transcripción que reprimen la expresión de genes en respuesta a GA (Busk y Pages, 1998; Ogawa, *et al.*, 2003; Dubouzet *et al.*, 2003; Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005; Nakashima *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2007). También se predijo la presencia de una secuencia KCACGW, que es el núcleo de los motivos de unión a los factores DPBF-1 y 2 de la clase bZIP (ABI5 es de esta clase). Este motivo ha sido caracterizado en el gen Dc3 de zanahoria, el cual codifica para una proteína LEA 4 que es embrión-específica y que se induce en respuesta a ABA (Kim *et al.*, 1997; Finkelstein y Lynch, 2000). Otra secuencia (CAAACACC), también presente en los promotores de genes que codifican

muchas proteínas de almacenamiento de semillas, como napA de *Brassica napus* y corresponde con una región conocida como prox B (proximal portion of B-box) de este mismo gen (Stalberg *et al.*, 1996; Ellerstrom *et al.*, 1996; Ezcurra *et al.*, 1999; Ezcurra, *et al.*, 2000). El ABA reprime la germinación y se presume que estabiliza el estado dormante (Himmelbach *et al.*, 2003; Kermode, 2005) mediante vías de señalización que usualmente incluyen redes regulatorias de factores de transcripción que se unen en regiones promotoras que regulan sus genes blancos y sus niveles de expresión (Nakabayash *et al.*, 2005). Así, en términos generales, la germinación, se retrasa con la aplicación de ABA y se acelera con GA₃, como por ejemplo la emergencia de la punta de la radícula a través de las capas de la cubierta de la semilla (Manz *et al.*, 2005). Este proceso se inicia y completa gracias a la entrada de agua a la semilla (imbibición) en condiciones ambientales que la favorecen y depende de la expansión del embrión, proceso dirigido por la toma de agua y la pérdida de pared celular (Bewley, 1997; Obroucheva y Antipova, 1997; Koornneef *et al.*, 2002).

Por otro lado, hasta la fecha existen pocos datos en la literatura respecto a la localización de las proteínas LEA 4 en los diferentes tejidos de la semilla. En lo que respecta a la proteína LEA 4, ésta se ubica únicamente en el embrión (Figura 27). La proteína D-113 de algodón, al igual que Rab 28 (LEA 5) de maíz, se distribuyen homogéneamente en todos los tejidos embrionarios (Roberts *et al.*, 1993; Niogret *et al.*, 1996), mientras que *HvAI* (LEA 3) de *Hordeum vulgare* se acumula en la capa de células de la aleurona (Xu *et al.*, 1996). Es de hacer notar que está bien establecido que la expresión de Vp1 es abundante en la aleurona y el embrión y débil en el endospermo durante la fase de maduración de la semilla y que este es un factor de transcripción muy importante en la regulación de genes LEA mediada por ABA y (Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005).

En estudios con callos embriogénicos se encontró que las dehidrinas están implicadas en el desarrollo del programa morfogénico de la embriogénesis somática en caña de azúcar (Burieza *et al.*, 2012), de forma semejante a lo encontrado para estas proteínas en la embriogénesis somática de zanahoria y avena (Tan y Kamada, 2000; Ko *et al.*, 2006). Sin embargo, parece no ser el caso de la proteína LEA 4, ya que bajo ninguna de las condiciones evaluadas se observó señal alguna de esta proteína en callos embriogénicos de maíz. Por otra parte, muchos estudios de caracterización de proteínas LEA en diferentes organismos han encontrado que las proteínas LEA son inducidas por estrés osmótico, ABA

exógeno o frío (Wise y Tunnacliffe, 2004; Battaglia, *et al.*, 2008; Olvera *et al.*, 2010; Tolleter, *et al.*, 2010; Duan y Cai, 2012; Amara, *et al.*, 2013) e incluso en respuestas a estrés biótico (Liu, *et al.*, en 2013). La Figura 29, indica que LEA 4, participa en la respuesta a estrés hídrico y es específica de raíz. Es interesante que su acumulación ocurra sólo en raíz. Aunque no igual, Mgl3 (LEA 3 de maíz) se induce en respuesta a deshidratación tanto en raíz como en hoja, pero su acumulación es más abundante en raíz (Thomann *et al.*, 1992). Además de los sitios de unión de factores de transcripción antes discutidos, es de destacar la presencia de sitios predichos que ayudan a explicar el patrón de acumulación encontrado. Por ejemplo, se predijeron los motivos RHE (*Root Hair-specific cis-Elements*) y el ROOTMOTIFTAPOX1. El primero se encuentra conservado en el promotor del gen de la expansina 7 de *A. thaliana*, sus ortólogos y parálogos de diferentes especies de angiospermas (Kim, *et al.*, 2006) y es específico de genes que se expresan en raíz, mientras que el segundo, se encuentra en el gen roID de *A. rizhogenes* (Elmayan y Tepfer, 1995). Además, se encontraron otros sitios, como una región DREB (*dehydration-responsive element binding proteins*), involucrada en la respuesta a la falta de agua y a bajas temperaturas (Xue, 2002; Svensson *et al.*, 2006); el motivo A (ACGTABREMOTIFA2OSEM) importante en la unión de factores de transcripción DRE y ABRE, los cuales son interdependientes del ABA y está bien caracterizado en genes como rd29A de *A. thaliana* y son importantes para la activación de genes de respuesta a sequía y salinidad como rab28, erd1, clpA y LEA 3 (Niogret *et al.*, 1996; Hattori, *et al.*, 2002; Narusaka *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2003, Xiao, *et al.*, 2007). También se encontró la secuencia consenso del motivo de unión a MYC, común en regiones promotoras de genes de respuesta a deshidratación como rd22, CBF3 e ICE1 (*inducer of CBF expresión 1*) (Abe, *et al.*, 1997; Abe, *et al.*, 2003; Chinnusamy, *et al.*, 2003; Lee, *et al.*, 2005) y erd1 (*early responsive to dehydration*) de *Arabidopsis thaliana* y que también funciona como sitio de unión a NAC (Simpson *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2004). También hay una secuencia de unión a GRA (*GC-rich rab activator*), presente en la región promotora del gen rab28 y de la rab17, ambos de maíz (Busk y Pagés, 1997; Busk y Pages 1998). Finalmente, también hay un sitio de unión a MYB. Los MYB 1 y 2 de *A. thaliana* están involucrados en la regulación de genes de respuesta a deshidratación (como rd22), vía señalización por ABA (Urao *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 1993). Todo ello da pauta a plantear diversos mecanismos que expliquen la especificidad en la acumulación de esta proteína. Sin embargo, hacen falta análisis para explicar detallada y experimentalmente los mecanismos de regulación que dan lugar al patrón de acumulación característico de esta proteína. Así como también se requiere

evaluar el papel que esta proteína realiza en la respuesta a la deshidratación. Ambos puntos son relevantes y quedan a la expectativa para ser aclarados.

8. CONCLUSIÓN

Los datos bioinformáticos y experimentales presentados en este trabajo indican que la proteína que se caracterizó es una LEA 4 canónica. Su expresión es abundante en el eje quiescente, siendo, aparentemente, exclusiva de esta estructura, y durante las últimas etapas del llenado de grano, su acumulación aumenta progresivamente en la medida en que avanza la maduración y con ella, la desecación del grano. En presencia de ABA exógeno, esta proteína se acumula en el eje inmaduro. En contraste, desaparece paulatinamente durante la imbibición, respondiendo durante esta etapa, de manera positiva a ABA y negativamente a GA₃. Finalmente, la LEA 4 se induce en la raíz en respuesta a la deshidratación.

9. PERSPECTIVAS

Dentro del trabajo a continuar, se propone:

-Evaluar mediante genética reversa, la función de este gen, tanto por sobre-expresión como por silenciamiento, empleando para ello construcciones en las que tanto el CDS de la *lea 4* como su antisentido se pongan bajo el promotor de ubiquitina (promotor fuerte). Estas construcciones se podrían usar para transformar maíz mediante biobalística.

-Diseñar experimentos de fraccionamiento subcelular y de inmunohistoquímica para poder localizar la ubicación compartamental de la LEA bajo estudio. Esto podría sugerir probables mecanismos de acción.

-Establecer el interactoma de la LEA 4 mediante ensayos de foto entrecruzamiento acoplado a inmunoprecipitación y análisis de espectrometría de masas. Esto podría generar información valiosa, ya que se desconocen los blancos moleculares de las proteínas LEA y en general se sabe muy poco respecto a los interactores moleculares de las proteínas desordenadas.

-Generar líneas transgénicas de maíz en las que se prueben la expresión de la proteína roja fluorescente bajo el promotor putativo de la LEA 4, para determinar los factores

ambientales que lo regulan. Paralelamente se proponen desarrollar ensayos tipo EMSA para poder describir experimentalmente los factores de transcripción que participan en la regulación transcripcional del gen *lea 4*.

-Aplicar técnicas fisicoquímicas para el análisis estructural de la LEA 4, tales como FTIR, NMR y CD, para confirmar experimentalmente la inestructura sugerida de la LEA 4, así como evaluar si cumple algún papel como escudo molecular. Esto último mediante ensayos de protección a enzimas termolábiles como la citrato sintasa.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9: 1859-1868.

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 131: 1748-1755.

Alexandrov NN, Brover VV, Freidin S, Troukhan ME, Tatarinova TV, Zhang H, Swaller TJ, Lu YP, Bouck J, Flavell RB, Feldmann KA (2009) Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Molecular Biology*, 69: 179-194.

Amara I, Capellades M, Ludevid MD, Pagès M, Goday A (2013) Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. *Journal of Plant Physiology*, 170: 864-73.

Amara I, Odena A, Oliveira E, Moreno A, Masmoudi K, Pagès M, Goday A (2012) Insights into maize LEA Proteins: From Proteomics to Functional Approaches. *Plant Cell Physiology*, 53(2):312-329.

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230.

Andjelkovic V, Thompson R (2006) Changes in gene expression in maize kernel in response to water and salt stress. *Plant Cell Report*, 25: 71-79.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-402.

Altschul SF and Gish W (1996) Local Alignment Statistics. In *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* Edited by: Russell F. Doolittle. Academic Press. Pp: 460-480.

Alves VS, Castilho BA (2005) Gir2 is an intrinsically unstructured protein that is present in *Saccharomyces cerevisiae* as a group of heterogeneously electrophoretic migrating forms. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 332: 450-455.

Baker J, Steel C, Dure III L (1988) Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11: 277-291.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32: 138-141.

Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcirrubio A, Campos F, Covarrubias A (2008) The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, 148: 6-24.

Bhatnagar-Mathur P, V Vadez, K K Sharma (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27: 411-424.

Bies N, Aspart L, Carles C, Gallois P, Delseny M (1998) Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*: evidence for post-transcriptional controls. *Journal of Experimental Botany*, 49 (329): 1925-1933.

Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the Lea (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67: 107-124.

Bjellqvist B, Hughes G, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez J, Frutiger S, Hochstrasser D (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14: 1023-1031.

Bjellqvist, B., Basse, B, Olsen, E. and Celis, JE (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15: 529-539.

Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1995) Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Plant Physiology*, 93: 630-638

Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larré C, Satour P, Leprince O (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 140(4):1418–1436.

Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre´ C, Satour P, Leprince O (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 140: 1418-1436.

Boucher V, Buitink J, Lin X, Boudet J, Hoekstra FA, Hundertmark M, Renard D, Leprince O (2010) MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant and Cell Environment*, 33: 418-430.

Browne JA, Tunnacliffe A, Burnell AM (2002) Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature* 416: 38.

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*. *Eukaryotic Cell*, 3: 966-975.

Brown CJ, Takayama S, Campen AM, Vise P, Marshall TW, Oldfield CJ, Williams CJ, Dunker AK (2002) Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 104-110.

Bravo, A, H Salinas (2006) Introducción, conceptos y definiciones de sequía en Bravo, A., H. Salinas y A. Sotomayor (comp.) *Sequía: vulnerabilidad, impacto y tecnología para afrontarla en el norte de México*. Zacatecas, INIFAP-SAGARPA.

Bravo-Peña L C, Castellanos-Villegas A E, Doode-Matsumoto OS (2010) Sequía agropecuaria y vulnerabilidad en el centro-oriente de Sonora. Un caso de estudio enfocado a la actividad ganadera de producción y exportación de becerros. *Estudios sociales*, 35: 211-241.

Burrieza P H, López-Fernández M P, Barroso-Chiquieri T, Silveira V, Maldonado S (2012) Accumulation pattern of dehydrins during sugarcane (var. SP80.3280) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 31: 2139-2149.

Burgess A W, Ponnuswamy PK, Sheraga H A (1974) Analysis of conformations of amino acid residues and prediction of backbone topography in proteins, *Israel Journal of Chemistry*, 12: 239-286.

Busk PK, Pages M (1997) Protein binding to the abscisic acid-responsive element is independent of VIVIPAROUS1 in vivo. *Plant Cell*, 9: 2261-2270.

Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37:425-35.

Campos F, Guillén G, Reyes JL, Covarrubias AA (2011) A general method of protein purification for recombinant unstructured non-acidic proteins. *Protein Expression and Purification*, 80(1):47-51.

Vicente-Carbajosa J, Carbonero, P (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *The International Journal of Developmental Biology*, 49: 645-651.

Castiglioni P, Warner D, Robert J. et al. (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology*, 147: 446-455.

Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P (2006) DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl 2): W177-W181 doi:10.1093/nar/gkl266

Chakbortee S, Meersman F, Kamisniski S, Bertoncini CW, Mc Gee B, Clemens F, Kaminski, Tunnacliffe A (2010) Catalytic and chaperone –like functions in an intrinsically disordered protein associated with desiccation tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37):16084-16089.

Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Kaminski-Schierle G S, Kurniawan DP, Kaminski CF, Wise MJ, Tunnacliffe A (2012) Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular BioSystems*, 8: 210-219.

Chen ZY, Hsing YIC, Lee PF, Chow TY (1992) Nucleotide sequences of a soybean cDNA encoding an 18 kD late embryogenesis abundant (Lea) protein. *Plant Physiology*, 99: 773-774.

Chu C., et al. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *SCIENCE CHINA Mathematics*, 18: 659-668.

Close TJ, Kortt AA, Chandler PM (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology*, 13: 95-108.

Contreras-Servín, C (2005) Las sequías en México durante el siglo XIX. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM. ISSN 0188-4611*. 56, pp: 118-133.

Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) (2007) Agricultura, desarrollo rural, tierra, sequía y desertificación: resultados, tendencias y desafíos para el desarrollo sostenible de América Latina y el Caribe. ONU, pp: 4-78.

Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 25: 147-150.

Cortese MS, Baird JP, Uversky VN, Dunker AK (2005) Uncovering the unfoldome: enriching cell extracts for unstructured proteins by acid treatment. *Journal of Proteome Research*, 4: 1610-1618.

Cuming, AC (1999). Lea proteins. In *Seed Proteins*, P.R. Shewry and R. Casey, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 753-780.

Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, Bansal KC (2009) Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology*, 139: 137-145.

Dele`age G, Roux B (1987) An algorithm for secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Engineering*, 1: 289-294.

Dimitri T, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel MH, Macherela D (2007) Structure and function of a mitochondrial Late Embryogenesis Abundant Protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, 19:1580-1589

Duan J, Cai W (2012) OsLEA3-2, an Abiotic Stress Induced Gene of Rice Plays a Key Role in Salt and Drought Tolerance. *PLoS ONE*. 7: e45117. doi:10.1371/journal.pone.0045117.

^a**Dunker KA, Silman I, Uversky VN, Sussman JL** (2008) Function and structure of inherently disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 18: 756-764.

^b**Dunker KA, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN** (2008) The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*, 9(Suppl 2):S1 doi:10.1186/1471-2164-9-S2-S1

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Os-DREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, 33: 751-763.

Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho THD, Mundy J, Quatrano RS, Thomas T, Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12:475-486.

Dure L (1993) Structural motifs in Lea proteins. In: T.J. Close and E.A. Bray (Eds.), *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. Current Topics in Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists Series. USA, vol. 10. pp. 91-103.

- Edgar RC** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797
- Elmayan T, Tepfer M** (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. *Transgenic Research*, 4: 388-396.
- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L** (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Molecular Biology*, 32: 1019-1027.
- Ezcurra I, Ellerstrom M, Wycliffe P, Stalberg K, Rask L** (1999) Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology*, 40: 699-709.
- Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerstrom M, Rask L** (2000) Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant Journal*, 24: 57-66
- FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations)** (2004) FAO production yearbook. FAO, Rome.
- Fink AL** (2005) Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15: 35-41.
- Finkelstein y Lynch** (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12: 599-609.
- Frahm M, Rosas J C, Mayek N, López E, Acosta J A, Kelly J D** (2003) Resistencia a sequía terminal en frijol negro tropical. *Agronomía Mesoamericana*, 14:143-150.
- 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 Molecular Biology*, 63: 719-730.
- Fontana A, Polverino de Laureto P, Spolaore B, Frare E, Zambonin M**, Detecting disordered regions in proteins by limited proteolysis. Uversky V, Longhi S, Eds. (2010) *Assessing structures and conformations of intrinsically disordered proteins* (Wiley Series in Protein and Peptide Science). New York: John Wiley and Sons, pp 569-626.
- Galau GA, Hugh DW, Dure L III** (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 7: 155-170.
- Gal TZ, Glazer I, Koltai H** (2003) Differential gene expression during desiccation stress in the insect killing nematode *Steinernema feltiae* IS-6. *Journal of Parasitology*, 89: 761-766.
- Galau GA, Bijaisoradat N, Huges DW** (1987) Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis abundant mRNAs and storage protein mRNAs: coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Developmental Biology*, 123(1):198-212.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 5668-5674.

Garnier J, Gibrat, Robson B (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology*, 266: 97-120.

Garnier J, Osguthorpe D J, Robson B (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 120: 97-120

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 15898-15903.

Gascuel O, Golmard J L (1988) A simple method for predicting the secondary structure of globular proteins: implications and accuracy. *Computer Applications in the Biosciences*, 4: 357-365.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch (2005) A Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John M. Walker editor: *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. pp 571-607.

Goyal K, Walton L, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388: 151-157.

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 Physiology*, 143: 617-628.

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 Physiology*, 137(1):157-167.

Gutiérrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science*, 12: 294-300.

Guobao L, Xu H, Zhang L, Zheng Y (2011) Fe Binding Properties of Two Soybean (*Glycine max* L.) LEA 4 Proteins Associated with Antioxidant Activity. *Plant and Cell Physiology*, 52:994-100.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.

Harada JJ (1997) Seed maturation and control of germination. *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Edited by Larkins BA, Vasil IK. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Pp. 545-592.

Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A (2002) Experimentally determined sequence requirement of acgt-containing abscisic acid response element. *Plant and Cell Physiology*, 43: 136-140.

He JX, Fu JR (1996) The research progresses in LEA proteins of seeds. *Plant Physiology Communications*, 32: 241-246.

He S, Tan L, Hu Z, Chen G, Wang G, Hu T (2012). Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Molecular Genetics and Genomics*, 287: 39-54.

Henry B, Burkhard R (2006). PROFtmb: a web server for predicting bacterial transmembrane beta barrel proteins. *Nucleic Acids Research*, 34 (Web Server issue): W186-188.

Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik KF, Seals DF, Randall SK (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiology*, 130: 675-687.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, 27: 297-300.

Himmelbach A, Yang Y, Grill E (2003) Relay and control of abscisic acid signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 470-479.

Hincha DK, Thalhammer A (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society Transactions*, 40: 1000-1003.

Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 431-438.

Holding DR, Otegui MS, Li B, Meeley RB, Dam T, Hunter BG, Jung R, Larkins BA (2007) The maize floury1 gene encodes a novel endoplasmic reticulum protein involved in zein protein body formation. *Plant Cell*, 19(8): 2569-2582.

Holley H, Karplus M (1989) Protein secondary structure prediction with a neural network, *Proceedings in Natural Academy of Sciences USA*, 86: 152-156.

Hu T, Zeng H, He S, Wu Y, Wang G, Huang X (2012) Molecular analysis of *oslea4* and its contributions to improve *E. coli* viability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 222-233.

Hubbard T, et al., (2002) The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30: 38-41.

Hunault G, Jaspard E (2011) LEAPdb: a database for the late embryogenesis abundant proteins. *BMC Genomics*, 11: 221

Hundertmark M, Hincha D K (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9: 1-22.

Iakoucheva ML, Kimzey AL, Masselon CD, Smith RD, Dunker AK, Ackerman EJ (2001) Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Science*, 10: 1353-1362.

Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review on Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403.

Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM (2005) The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 771-787.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8: 275-282.

Kermode AR (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 319-44.

Kim DW, Lee SH, Choi SB, Won SK, Heo YK, Cho M, Park YI, Cho HT (2006) Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *Plant Cell*, 18: 2958-2970.

Kim SY, Chung HJ, Thomas TL (1997) Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that

interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant Journal*, 11: 1237-1251.

Koag M-C, Frenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology*, 131: 309-316.

Kyte J., Doolittle R. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157: 105-132.

Lai J, Dey N, Kim CS, Bharti AK, Rudd S, Mayer KF, Larkins BA, Becraft P, Messing J. (2004) Characterization of the maize endosperm transcriptome and its comparison to the rice genome. *Genome Research*, 14: 1932-1937.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK (2005) The Arabidopsis Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17: 3155-3175.

Levin JM, Garnier J (1988) Improvements in a secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool. *Biochimica et Biophysica Acta*, 955: 283-295

Liu J, Rost B. (2004) CHOP: proteins into structural domain-like fragments. *Proteins*, 55: 678-688.

Liu J, Rost B (2003) NORSp: predictions of long regions without regular secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 31: 3833-3835.

Liu X, Wang Z, Wang LL, Wu RH, Phillips J, Deng X (2009) LEA 4 group genes from the resurrection plant *Boea hygrometrica* confer dehydration tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science*, 176: 90-98

Liu Y, Wang L, Xing X, Sun L, Pan J, Kong X, Zhang M, Li D (2013) ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiology*, doi: 10.1093/pcp/pct047.

Lodish H, Berk A, et al. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; Section 3.4, Membrane Proteins. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21570/>.

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 Reports*, 27: 707-717.

Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR (2009) Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the Arabidopsis thaliana Mutant atem6-1. *Plant Cell Physiology*, 50: 243-253

Manz B, Müller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G (2005) Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology*, 138: 1538-1551

Marcos-Valiente O (2001) Sequía: definiciones, tipologías y métodos de cuantificación. *Investigaciones Geográficas*, 26: 59-80.

Maskin L, Maldonado S, Iusem ND (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced Asr genes. *Molecular Biology Reports*, 35: 501-505.

Ming-der S, Folkert A H, Yue-le C H. Chapter 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins, In: Jean-Claude Kader and Michel Delseny, Editor(s), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, 2008, Volume 48, Pp 211-255.

Ming-Der S, Lin-Tzu H, Fu-Jin W, Ming-Tsung W, Folkert AH, Yue-le CH (2010) OsLEA1a, a new Em-Like protein of cereal plants. *Plant and Cell Physiology*, 51: 2132-2144.

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 Journal*, 41: 697-709.

Nambara E, Marion-Poll A (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science*, 8: 213-217.

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant Journal*, 34: 137-148.

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 analysis*. *Plant Physiology*, 129: 1368-1381.

Niogret MF, Culiàñez-Macià FA, Goday A, Albà MM, Pagès M (1996) Expression and cellular localization of rab28 mRNA and Rab 28 protein during maize embryogenesis. *The Plant Journal*, 9: 549-557.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J, Garcarrubio A, Covarrubias A (2010) Functional analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154:373-390.

Oliveira E, Amara I, Bellido D, Odena MA, Dominguez E, Pagès M, et al. (2007) LC-MSMS identification of *Arabidopsis thaliana* heat-stable seed proteins: enriching for LEA-type proteins by acid treatment. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1485-1495.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J, Garcarrubio A, Covarrubias A (2010) Functional analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154: 373-390.

Ofran Y, Rost B (2007) ISIS: Interaction Sites Identified from Sequence. *Bioinformatics*, 23: 13-16.

Ofran Y, Venkatesh M, Burkhard R (2007) Prediction of DNA-binding residues from sequence. *Bioinformatics*, 23: 347-353.

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15: 1591-1604.

Popova AV, Hundertmark M, Seckler R, Hinch DK (2011) Structural transitions in the intrinsically disordered plant dehydration stress protein LEA7 upon drying are modulated by the presence of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 1879-1887.

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12: 99-105.

Qian N, Sejnowski T (1988) Predicting the secondary structure of proteins using neural network models. *Journal of Molecular Biology*, 202: 865-884.

Radiwojac P, Iakoucheva LM, Oldfield Cj, Obradovic A, Uversky VN, Dunker Ak (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophysical Journal*, 92: 1439-1456.

Rajesh N, Burkhard R (2005) Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *Journal of Molecular Biology*, 348: 85-100.

Rajalingam D, Loftis C, Xu JJ, Thallapuranam-Krishnaswamy SK (2009) Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science*, 18: 980-993.

Ritchie, SW, Hanway JJ, Benson, GO (1992) How a corn plant develops. Special Report No. 48. Iowa State University, Cooperative Extension Service, Ames, IA, <http://maize.agron.iastate.edu/corngrows.html>.

Roberts, JK (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell*, 5: 769-780.

Rojas-Garcidueñas M (2003) La resistencia a la sequía. *Ciencia UANL*. 003: 326-331.

Romero, P, Obradovic, Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*, 42: 38-48.

Rorat T (2006) Plant dehydrins, tissue location, structure and function. *Cell Molecular Biology Letters*, 11: 536-556.

Ross D K, Sternberg J E (1990) Machine learning approach for the prediction of protein secondary structure. *Journal of Molecular Biology*, 216: 441-457.

Ross DK, Sternberg JE (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Science*, 5: 2298-2310.

Rost B (1998) unpublished. GLOBE predicts the globularity of a protein.

Rost B (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods in Enzymology*, 266: 525-539.

Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research*. 32 (Web Server issue): W321-W326.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Ed 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Scheef ED, Fink JL (2003) Fundamentals of protein structure. In: Bourne PE, Weissig H (eds) *Structural bioinformatics*. Wiley-Liss, Hoboken NJ pp 15-39.

Schlessinger A, Punta M, Yachdav G, Kajan L, Rost B (2009) Improved disorder prediction by combination of orthogonal approaches, *PLoS One*. 4: e4433.

Schlessinger A, Yachdav G, Rost B (2006) PROFbval: predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics*, 22: 891-893.

Schlessinger A, Yachdav G, Rost B (2006) PROFbval: predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics*, 22: 891-893.

Schonfeld MA, Johnson RC, Carver BF, Mornhinweg DW (1998) Water relations in winter wheat as drought resistance indicator. *Crop Science*, 28:526-531.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 215-225.

Shao HB, Liang ZS, Shao MA (2005) LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45: 131-135

Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 113: 1177-1183.

Shih MD, Lin SC, Hsieh JS, Tsou Ch, Chow TY, Lin T, Hsing YI (2004) Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max L.*) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology*, 56: 689-703.

Shih MD, Hoekstra FA, Hsing YC (2008) Late embryogenesis abundant proteins. *Advances in Botanical Research*, 48: 212-40.

Shimizu T, Kanamori Y, Furuki T, Kikawada T, Okuda T, Takahashi T, H. Mihara, M Sakurai (2010) Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*, 49: 1093 -1104.

Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132: 199-208.

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant Journal*, 33: 259-270.

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 protein. *Protein Science*, 14: 2601-2609.

Stalberg K, Ellerstrom M, Ezcurra I, Ablov S, Rask L (1996) Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta*, 199: 515-519.

Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102-1104.

Sun X, Rikkerink EHA, Jones WT, Universky VN (2013) Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *Plant Cell*, 25:38-55.

Svensson JT, Crosatti C, Campoli C, Bassi R, Stanca AM, Close TJ, Cattivelli L (2006) Transcriptome analysis of cold acclimation in barley albina and xantha mutants. *Plant Physiology*, 141: 257-270.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

Thalhammer, A., Hundertmark, M., Popova, A.V., Seckler, R. and Hinch, D.K (2010) Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798: 1812-1820.

Thomann EB, Sollinger J, White C, Rivin CJ (1992) Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of Abscisic acid and the viviparous-1 gene product. *Plant Physiology*, 99(2):607-614.

Tingzhang Hu, Hua Z, Shuai H, Yingmei W, Wang G, Xiaoyun H (2012) Molecular analysis of OsLEA4 and its contributions to improve *E. coli* viability. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 166: 222-233.

Tollete D, Dirk K, Macherel D (2010) A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(10):1926-1933.

Tompa P (2002) Intrinsically unstructured proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27: 527-533.

Tompa P, Fuxreiter M (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends in Biochemical Science*, 33:2-8.

Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481-2498.

Tunnacliffe A, Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94: 791-812.

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 5: 1529-1539.

Uversky VN (2002) Natively unfolded proteins. A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 11: 739-756.

Uversky, VN, Gillespie, JR, Fink, AL (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41: 415 - 427.

Vicente-Carbajosa J, Carbonero P (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *International Journal of Developmental Biology*, 49: 645-651.

Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martinez CM, Torn M, Pagès M (1990) Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Molecular Biology*, 14: 423-432.

Vinocur B, Altman (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 123-132

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

Welin BV, Olson A, Nylander M, Palva ET (1994) Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 26: 131-144.

Wise, MJ (2003) LEAPing to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC. Bioinformatics*, 4: 52-70.

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Sciences*, 9: 13-17.

Wu C, Duncan, Robertson HL, Hubbard SJ, Gaskell SJ, Beynon RJ (1999) Proteolysis of native proteins: trapping of a reaction intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 1108-1115.

Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 35-46.

Xiaolin Sun,a,1 Erik H.A. Rikkerink,b William T. Jones,a and Vladimir N. Uversky,c, Suskiewicz MJ, Sussman JL, Silman I, Shaul Y (2011) Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein Science*, 20: 1285-1297.

Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Wu R (1996) Expression of late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficits and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110: 249-257.

Xue B, DunBrack RL, Williams RW, AK Dunker, VN Uversky (2010) PONDR-Fit: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 996-1101.

Xue GP (2002) Characterization of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research*, 30: e77.

Young M, Kirshenbaum K, Dill KA, Highsmith S (1999) A conformational switch prediction program. *Protein Science*, 8: 1752-64.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, 136: 2621-2632.