



Abiotic stress in plants: Late Embryogenesis Abundant proteins

Imen Amara

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Spanish Summary

De acuerdo con los requisitos del formato de la tesis doctoral escrita en un idioma no oficial de la Universidad de Barcelona, se presenta el resumen de esta memoria en castellano. Esta tesis doctoral, con título "**Abiotic stress in plants: Late Embryogenesis Abundant proteins**", ha sido realizada en el laboratorio del Prof. M. Pagés bajo la dirección de Dr. Adela Goday, en el Departamento de Genética Molecular del CSIC, Center for Research in Agricultural Genomics (CRAG) con la financiación del programa F.I. (Formació Personal Investigador), l'Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) la Generalitat de Catalunya, 2011FI_B2 0012, España. La tesis comenzó en el año académico 2006-2007. Esta tesis doctoral ha sido inscrita en el programa de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

El grupo del Prof. M. Pagés, Laboratorio de Genética Molecular de Plantas, CSIC, CRAG está dedicado a estudiar los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico en plantas. Con este objetivo ha realizado diversos trabajos dirigidos a identificar y caracterizar genes y proteínas implicados en la resistencia al estrés hídrico. Las investigaciones abarcan aproximaciones diversas, como genes reguladores, factores de transcripción, mecanismos de transducción de señal, regulación por fosforilación y estudio de las proteínas LEA ó Late Embryogenesis Abundant.

Introducción

Las proteínas LEA, originalmente fueron descritas en las semillas de algodón; se acumulan en grandes cantidades en estructuras tolerantes a la desecación (semillas, polen) y en tejidos vegetativos sometidos a estrés abiótico, sequía, salinidad y frío. También se hallan en organismos anidrobióticos, en plantas de resurrección, algunos invertebrados y microorganismos. La presencia de proteínas LEA se correlaciona con la adquisición de tolerancia a la desecación. Desde un principio se les atribuyó un papel en las respuestas de las plantas en la adaptación al estrés (revisado en Bartels and Salamini 2001, Tunnacliffe 2007, Shih et al. 2010, Tunnacliffe 2010, Hand et al. 2011).

Las proteínas LEA se clasifican en diversos grupos en función de dominios y secuencias de aminoácidos específicos (Wise 2010, Bataglia et al 2008, Bies-Ethève et al 2008). Los grupos 1, 2 y 3 son los más relevantes ya que abarcan la mayoría de las proteínas de la familia LEA. Una característica general de estas proteínas es su elevada hidrofiliidad, alto contenido de aminoácidos cargados y su falta de estructura en estado hidratado. A pesar de encontrarse mayoritariamente en forma de “random coil”, algunas adquieren un cierto grado de estructura durante la deshidratación o en la presencia de agentes promotores de α -hélices (Shih et al. 2010, Hand et al. 2011). A nivel celular se han hallado en todas las localizaciones, citosol, núcleo, nucleolo, mitocondria, cloroplasto, vacuola, retículo endoplásmico, peroxisoma y membrana plasmática, donde se supone ejercen su función protectora frente al estrés (Tunnacliffe and Wise 2007, Hundertmark and Hinch 2008). En relación a las modificaciones post-traduccionales, algunas se hallan fosforiladas (Jiang and Wang 2004; Plana et al. 1991, Heyen et al. 2002, Rohrig et al. 2006). Los efectos protectores de las varias proteínas LEA se han demostrado mediante ensayos *in vitro* y en aproximaciones transgénicas que han dado lugar a fenotipos resistentes a la sequía, sal y frío. Por lo general, se considera que estas proteínas contribuyen a la protección y a la estabilización de macromoléculas y estructuras celulares en las respuestas de adaptación al estrés en plantas; sin embargo, sus funciones específicas aún no han sido esclarecidas. A nivel molecular se ha propuesto que las funciones de las proteínas LEA pueden ser variadas: estabilización y renaturalización de proteínas, mantenimiento de membranas, en combinación, o no, con azúcares, tampones de hidratación (substitución de moléculas de agua), afinidad por iones y función antioxidante (Tunnacliffe and Wise 2007, Shih et al. 2010, Bataglia et al. 2008).

Objetivos

En esta tesis se pretende ampliar los conocimientos sobre las proteínas LEA y sus funciones relativas a la tolerancia a la sequía. Los resultados están presentados en forma de capítulos.

Capítulo 1: Aproximación proteómica para el estudio de la composición de proteínas LEA en semillas de *Arabidopsis*. Se establece un método para obtener poblaciones enriquecidas en proteínas LEA basado en un procedimiento de extracción que combina

la estabilidad al calor y la solubilidad en ácido de las proteínas de tipo LEA, proteínas no estructuradas en estado hidratado. Las fracciones proteicas obtenidas fueron analizadas por espectrometría de masas (MS).

Capítulo 2: Se analiza el contenido de proteínas LEA en embriones maduros de maíz, utilizando el método descrito anteriormente. Del conjunto de proteínas LEA identificadas, se seleccionaron Emb564, Rab17 y Mlg3 pertenecientes a los grupos 1, 2 y 3 respectivamente, para su posterior estudio dirigido a detectar diferencias funcionales entre ellas. Con este objetivo, se analizaron las modificaciones post-traduccionales (PTM) de las proteínas, las propiedades antiagregantes de las correspondientes proteínas recombinantes *in vitro*, su capacidad de protección *in vivo* frente al estrés abiótico en células de *E.coli* y en hojas de tabaco y su localización subcelular.

Capítulo 3: Se generaron plantas transgénicas de maíz sobre-expresando el gen *rab28* del grupo LEA 5 bajo el control del promotor de la *ubiquitina* con el fin de investigar su nivel de tolerancia al estrés hídrico. Los fenotipos de las plantas transgénicas fueron caracterizados en condiciones óptimas de crecimiento y bajo estrés osmótico. Paralelamente, se realizó el estudio de la localización subcelular de la proteína Rab28.

Resultados y Discusión

Capítulo I: Identificación por LC-MSMS de proteínas de semillas de *Arabidopsis thaliana* estables al calor y ácido

Las proteínas LEA acumuladas en semillas de *Arabidopsis* fueron enriquecidas por tratamiento con calor seguido de tratamiento con ácido (3%TCA). Estas propiedades ya habían sido utilizadas anteriormente por separado para obtener proteomas no estructurados de células de mamífero y bacterias (Cortese et al. 2005, Csizmok et al. 2006, Galea et al. 2006). Aquí se han combinado ambos tratamientos para obtener fracciones enriquecidas en proteínas LEA a partir de semillas. Las proteínas de reserva de *Arabidopsis*, globulinas 12S y albúminas 2S, son mayoritarias en semilla y suelen ser una fuente importante de contaminación; estas proteínas son parcialmente termoestables pero insolubles en ácido, por lo que se concentran sobretudo en la fracción insoluble en ácido obtenida. La identificación de proteínas se realizó mediante dos sistemas: 1) análisis por geles de acrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones proteicas aisladas, teñido de bandas por coomassie, disección de bandas e identificación de polipéptidos por LC-

ESI-MSMS y 2) análisis de la fracción estable al calor y soluble en ácido por LC-MALDI-MSMS. Se identificaron un total de 18 proteínas LEA. Su composición reveló preponderancia de aminoácidos Pro, Glu, Lys, Ser, Gly y Gln y niveles bajos de Trp, Tyr, Phe, Cys, Ile, Leu and Val, en concordancia con su naturaleza desordenada. El genoma de *Arabidopsis* contiene 50 genes *lea*, en consecuencia al menos un tercio se expresan en semilla. Se identificaron proteínas LEA de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, siendo el grupo 3 el grupo más representado. Se identificaron tres proteínas del grupo 2 y la totalidad de grupo 1, *Atm1* y *Atm6*; las proteínas del grupo 1 en *Arabidopsis* son específicas de semilla y no se inducen en tejidos vegetativos bajo estrés (Manfre et al. 2009).

El enriquecimiento de proteínas solubles al calor y ácido facilita enormemente el análisis a gran escala de proteínas de tipo LEA, comparación de la composición de la familia LEA entre semillas de especies o variedades distintas y el análisis de sus modificaciones post-traduccionales. Además, el sistema puede ser adaptado para analizar y comparar la inducción de proteínas LEA en distintos tejidos vegetativos bajo distintas situaciones de estrés.

Capítulo 2: Proteínas LEA en maíz: aproximación proteómica y funcional

Proteómica

El maíz es una planta de interés agronómico. El proteoma LEA se obtuvo a partir de embriones maduros diseccionados para separarlos del endospermo, tejido muy rico en proteínas de reserva. La identificación por MS de los polipéptidos del proteoma no-estructurado reveló que en embrión de maíz la familia LEA es mayoritaria, seguida por las proteínas DNA-binding. Se identificaron 13 proteínas LEA de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5. Al igual que en *Arabidopsis*, el grupo 3 fue el más numeroso, indicando que las proteínas de este grupo deben de contribuir significativamente a la tolerancia a la desecación del embrión. Del grupo 2 ó deshidrinas, sólo se identificó *Rab17*, aunque otras variedades de maíz contienen además la deshidrina *DH2* (Asghar et al. 1994). La búsqueda en las bases de datos (<http://www.maizesequence.org/blast>) indicó una estimación mínima de 9 deshidrinas en el genoma del maíz. En comparación con *Arabidopsis*, el grupo 2 en el embrión de maíz está poco representado. Puesto que algunas deshidrinas no se expresan en semillas de *Arabidopsis* (Hundermark and Hincha 2008) ello podría indicar una contribución específica de algunas proteínas LEA

del grupo 2 en la respuesta al estrés en tejidos vegetativos. En relación al grupo 1, las dos proteínas estimadas, Emb564 y Emb5, ambas fueron identificadas.

Modificaciones post-traduccionales (PTM)

Las PTM de las proteínas son características que pueden ser esenciales para su funcionalidad. En las proteínas LEA, los estudios se han centrado en la fosforilación, especialmente en deshidrinas (Plana et al. 1991; Alsheikh et al. 2003; Jiang and Wang 2004, Heyen et al. 2002; Rohrig et al. 2006, Irar et al. 2006). Sin embargo, aparte de la desaminación y oxidación de LEAM, proteína LEA mitocondrial del guisante, no se han descrito otras PTM en la familia LEA. En este trabajo se analizó el patrón bidimensional de tres proteínas LEA seleccionadas: Emb564 del grupo 1, Rab17 del grupo 2 y Mlg3 del grupo 3. Se combinó el uso de anticuerpos específicos generados contra las correspondientes proteínas recombinantes, el análisis por electroforesis bidimensional (2D) y análisis de spots por LC-MSMS. Los resultados mostraron que Mlg3 no presenta PTM y aparece en forma de spot único en geles 2D; Rab17 está altamente fosforilada y aparece en forma de una ristra de spots en la zona ácida del gel de 2D tal como ya se había descrito (Villardell et al. 1990, Plana et al. 1991); Emb564 presenta un patrón bidimensional complejo que combina fosforilación, acetilación, metilación y desaminación. Algunas de estas PTM se hallan en el motivo conservado de 20 aminoácidos característico de las proteínas LEA del grupo 1. Aunque en la proteína Em de trigo del grupo 1 la eliminación de este motivo conservado no modifica la actividad protectora de la proteína recombinante *in vitro* (Gilles et al. 2007), en la proteína LEAM del grupo 3 la desaminación y oxidación contribuyen a la conformación funcional de la proteína (Tolleter et al. 2007). Un aspecto importante relativo a las MPT es el hecho de que las proteínas recombinantes empleadas en los ensayos *in vitro* no tengan las mismas PMT que las proteínas nativas, con lo cual podrían no ser totalmente funcionales. En el caso de Emb564, el patrón complejo de PMT que presenta puede ser relevante para su conformación, localización, recambio y/o interacción con dianas intracelulares *in vivo*.

Propiedades antiagregantes de las proteínas Emb564, Rab17 y Mlg3

Las actividades antiagregantes de Emb564, Rab17 y Mlg3 se analizaron *in vitro* e *in vivo* en un sistema de expresión en *E.coli*. En ningún caso la expresión *per se* disminuyó la tasa de crecimiento de las bacterias, en contraste con otras observaciones en que

proteínas LEA recombinantes reducen el crecimiento de *E.coli* (Campos et al. 2006). La actividad antiagregante de cada una de las proteínas LEA se estudió *in vitro* evaluando la desnaturalización del proteoma soluble en sal de *E.coli*, bajo condiciones de desecación (secado al vacío, 2 horas), choque térmico (48°C, 45 min) y congelación (-20°, 2 horas); la agregación del proteoma se cuantificó midiendo la absorbancia a 340 nm. *In vivo*, los efectos protectores de las proteínas LEA se evaluaron comparando las tasas de crecimiento de las bacterias en condiciones óptimas y bajo estrés osmótico con 10% PEG (polietilenglicol), choque térmico o congelación. Hay que mencionar que los tres tratamientos producen directa o indirectamente un déficit hídrico puesto que la temperatura incrementa la evaporación y la congelación reduce la disponibilidad de agua libre. Los resultados obtenidos mostraron una clara correlación entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de las proteínas.

De las tres proteínas LEA estudiadas, Emb564 del grupo 1 muestra una actividad antiagregante reducida, en concordancia con las observaciones realizadas previamente con MtEM, otra proteína del grupo 1 de *M. trunculata*, durante estrés por sequía o congelación (Boucher et al.2010).

Rab17 del grupo 2 es altamente eficaz como antiagregante y mejora substancialmente el crecimiento bacteriano bajo estrés osmótico, choque térmico o congelación. Esta elevada capacidad antiagregante es independiente de fosforilación puesto que Rab17 recombinante no se fosforila en *E.coli*. Los efectos protectores de Rab17 concuerdan con la amplia actividad chaperona atribuida a las deshidrinas ERD10 y ERD14 de *Arabidopsis* (Kovacs et al. 2008).

Mlg3 del grupo 3 es un caso interesante porque es muy eficaz como antiagregante y protector de crecimiento bajo sequía, igual o más que Rab17, y poco eficiente bajo tratamiento de choque térmico o frío. Este comportamiento se puede atribuir al hecho de que dependiendo de la velocidad a la que se pierde agua, gradual o rápidamente, se consiguen distintos niveles de conformación α -hélice a partir de ausencia de conformación o random coil (Reyes et al. 2005, 2008, Boudet et al. 2006; Hand et al. 2011; Tolleter et al. 2007, Li and He 2009). De hecho, la proteína LEAM mitocondrial del guisante, del grupo 3, adopta estructura en α -hélice al secarse, pero no al liofilizarse; la congelación rápida que precede a la liofilización evita la transición a α -hélice la cual permite su interacción con membranas (Tolleter et al. 2007). Así pues, la adquisición de

conformación por parte de Mlg3 durante la deshidratación y no durante el choque térmico o congelación rápida, podría justificar su actividad protectora exclusivamente durante la deshidratación.

Expresión de proteínas de fusión Emb564-GFP, Rab17-GFP y Mlg3-GFP en tabaco

Para determinar la localización subcelular y la capacidad de protección de las proteínas Emb564, Rab17 y Mlg3 frente al estrés, se agroinfiltraron hojas de tabaco con las proteínas LEA fusionadas a la proteína fluorescente GFP. Mediante microscopia confocal se observó que las tres proteínas de fusión se distribuían en el citosol y núcleo de células epidérmicas agroinfiltradas, con un patrón uniforme, soluble sin mostrar afinidad por estructuras determinadas; quedaban excluidas de vacuolas, pared celular y otros compartimentos. Esta distribución indica que muy probablemente las funciones de Emb564, Rab17 y Mlg3 ocurran en la fracción soluble del citosol y núcleo.

Aunque la proteína de fusión Emb564-GFP es estable en hojas de tabaco agroinfiltradas, Emb564 en maíz sólo se expresa en embriones y no es inducible por estrés en tejidos vegetativos tal como ya ha sido descrito para otras proteínas del grupo 1 (Battaglia et al. 2008; Hundertmark and Hincha 2008, Manfre et al. 2009). En maíz, la complejidad de las PTM observadas en la proteína nativa Emb564 podrían ser relevantes para la funcionalidad de esta proteína; en este sentido, el determinar la distribución intracelular de Emb564 en el embrión maduro del maíz sería conveniente para conocer el papel que juega esta proteína en el embrión durante su maduración y desecación.

En condiciones de estrés osmótico (riego de las plantas de tabaco agroinfiltradas con 15% PEG durante 2 días) la distribución intracelular soluble de Emb564-GFP, Rab17-GFP y Mlg3-GFP no varía. Sin embargo, se observó que las células que sobreexpresaban Mlg3-GFP eran de mayor tamaño que las restantes. Durante la desecación, la concentración intracelular aumenta y el volumen de la célula se reduce debido a la pérdida de agua produciendo un “encogimiento” celular (Mouillon et al. 2008). Mlg3 compensa, al menos en parte, los efectos de “encogimiento” celular de las células epidérmicas ocasionados por el tratamiento con PEG. En un modelo usando péptidos sintéticos de una proteína LEA del grupo 3, se constató que la transición de random coil a α -hélice, coiled coil, dependía de la disponibilidad de agua (Shimizu et al.

2009). Siguiendo este modelo, la adquisición de cierta estructura por parte de Mlg3, podría ser un requisito previo a su funcionalidad; en este contexto, la identificación de posibles dianas intracelulares bajo condiciones de deshidratación progresiva podría esclarecer cómo Mlg3 reduce los efectos de “encogimiento” celular producidos durante el déficit hídrico.

Con el choque térmico (plantas de tabaco agroinfiltradas sometidas a 48°C durante 45 min) las células epidérmicas expresando Rab17-GFP mostraron una viabilidad superior a las restantes. Mediante geles 2D se comprobó que la proteína de fusión Rab17-GFP se hallaba efectivamente fosforilada en hojas de tabaco. Algunas deshidrinas, como Rab17, contienen en su secuencia el motivo S compuesto de varias Ser consecutivas, que *in vivo* se halla altamente fosforilado (Vilardell et al. 1990, Plana et al. 1991); de hecho, Rab17 es la proteína fosforilada más abundante del embrión maduro de maíz (Goday et al. 1994). Empleando una versión de Rab17 mutada que no puede fosforilarse por llevar una alteración en el consenso EDD para la CK2 (Riera et al. 2004), se comprobó que el incremento de viabilidad celular observada con Rab17 también ocurría en las células incapaces de fosforilar Rab17. Así pues, la protección ejercida por Rab17 frente al choque térmico no depende de su estado de fosforilación. El efecto protector probablemente sea consecuencia directa de la gran capacidad antiagregante de la proteína Rab17 no fosforilada observada en células de *E.coli*.

Sin embargo, el resultado importante relativo a Rab17 fue observar *in vivo* su colocalización en cuerpos oleicos (oil bodies) de hoja bajo estrés. Esta colocalización ocurría después del choque térmico, y en menor grado en las plantas tratadas con PEG, pero nunca en plantas sin tratar. En plantas, la mayoría de cuerpos oleicos se encuentran en la semilla donde tienen un función de reserva para la germinación (Huang et al. 2009); sin embargo, también se han descrito en hoja (Lersten et al. 2006, Huang et al. 2009) donde se les atribuye una función relacionada con la tolerancia a la sequía y bajas temperaturas (Aubert et al. 2010, Lersten et al. 2006; Shimada and Hara-Nishimura 2010). La interacción de Rab17 con cuerpos oleicos *in vivo* después de un choque térmico indica que este orgánulo podría ser una de las dianas intracelulares de Rab17 bajo estrés, y apoya el papel de las deshidrinas en la protección de membranas celulares.

La asociación de deshidrinas a membranas ya había sido observada previamente. WCOR414 de trigo y Lt129 de *Arabidopsis* se localizaran por inmunocitoquímica cerca

de la membrana plasmática de tejidos aéreos durante la aclimatación a bajas temperaturas (Danyluk et al. 1998; Puhakainen et al. 2004). *In vitro*, las deshidrinas ERD10 and ERD14 de *Arabidopsis* y DHN (Rab17) del maíz se unen a vesículas acídicas de fosfolípidos (Kovacs et al. 2008; Koag et al. 2003); la unión y adquisición de cierta conformación fue atribuida al motivo K (Koag et al. 2009), motivo presente en todas las proteínas LEA del grupo 2, EKKGIMDKIKEKLP (Galau and Close 1992). En un estudio reciente (Eriksson et al. 2011), se ha demostrado que la participación del motivo K de la deshidrina Lti30 de *Arabidopsis* en la interacción con membranas, y especialmente de las cadenas de lisina flanqueantes, es un efecto dependiente del pH. En el presente estudio se demuestra que la interacción deshidrina Rab17-cuerpo oleico está inducida por estrés en células vivas.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que la naturaleza desordenada de las proteínas LEA puede favorecer la multifuncionalidad (Tompa and Kovacs 2010; Tunnacliffe et al. 2010). Hemos comprobado que Rab17 evita de un modo eficaz la agregación proteica consecuencia de la desnaturalización por estrés, tanto en *E.coli* como en células epidérmicas de tabaco; estas propiedades pueden contribuir a la estabilización general del proteoma celular bajo un estrés. Sin embargo, la funcionalidad de los motivos S presentes en algunas proteínas LEA del grupo 2, los cuales *in vivo* se hallan altamente fosforilados, sigue siendo una cuestión abierta. En las deshidrinas de *Arabidopsis* ERD10, ERD14 y COR47, la fosforilación determina *in vitro* la capacidad de unión a iones y la actividad chaperona dependiente de calcio (Alsheikh et al. 2003; Heyen et al. 2002). En el presente estudio se demuestra que la fosforilación no está implicada ni en la actividad antiagregante de Rab17 *in vivo*, en concordancia con otros trabajos (Kovacs et al. 2008; Koag et al. 2009), ni en la interacción Rab17 con cuerpos oleicos. Sin embargo, la fosforilación de Rab17 interviene en el paro germinativo que sufren las semillas de *Arabidopsis* en condiciones de salinidad (Riera et al. 2004). Así pues, la fosforilación de Rab17 podría participar o modular activamente interacciones con otras dianas celulares, quizás de un modo más específico en las semillas, donde los niveles de pérdida de agua alcanzados son muy superiores a los sufridos por otros tejidos; de este modo, en un embrión de maíz maduro y deshidratado se podrían favorecer estructuras o interacciones que nunca ocurran en las deshidrataciones parciales y transitorias que se dan en los tejidos vegetativos.

En conclusión, en el capítulo 2 de la presente tesis se analiza el proteoma LEA de embriones de maíz y se ponen de manifiesto las diferencias existentes entre las proteínas LEA Emb564 del grupo 1, Rab17 del grupo 2 y Mlg3 del grupo 3. Emb564 destaca por las numerosas PMT, fosforilación, acetilación, metilación y desaminación de la proteína nativa que serían relevantes para su función específica en semilla. Mlg3 es muy eficaz como antiagregante en condiciones de deshidratación en *E. coli* y en células epidérmicas de tabaco agroinfiltradas, la presencia de Mlg3 reduce considerablemente los efectos de “encogimiento” celular provocados por la pérdida de agua. Finalmente, Rab17 muestra propiedades antiagregantes generales y muy potentes que evitan la desnaturalización de proteínas en condiciones de sequía, choque térmico ó bajas temperaturas; bajo choque térmico Rab17 interacciona *in vivo* con cuerpos oleicos, lo que apoya el papel de protección de membranas de las deshidrinas durante el estrés.

Capítulo 3: Plantas transgénicas de maíz que sobreexpresan el gen LEA *rab28*.

En este capítulo se analizan los efectos de la sobreexpresión de un gen LEA en el maíz, planta de interés agronómico y cuya productividad se ve muy afectada por la sequía (Boyer and Westgate, 2004). Se generaron plantas transgénicas de maíz expresando el gen LEA *rab28* del grupo 5 bajo el promotor constitutivo de la *ubiquitina*. El patrón de expresión de *rab28* en maíz sigue el patrón típico de un gen LEA: aumenta a lo largo de la embriogénesis, desaparece durante la germinación y es inducible en tejidos vegetativos por deshidratación y ABA (Pla et al. 1991). A diferencia de otras proteínas LEA, Rab28 se localiza en los nucléolos de las células del embrión maduro (Niogret et al. 1996).

Las plantas transgénicas de maíz sobreexpresando el gen *rab28* no presentaron diferencias apreciables con las de tipo salvaje en cuanto a su desarrollo y crecimiento en condiciones óptimas de cultivo en el invernadero. Sin embargo, el condiciones de déficit hídrico provocado por la presencia 15% PEG en el medio de riego, las plantas transgénicas crecían mejor que las de tipo salvaje. En estas condiciones, el análisis de diversos parámetros fisiológicos indicaron que las plántulas transgénicas tenían un contenido hídrico (RWC) superior, menos degradación de clorofila y áreas foliares y radiculares mayores que las plántulas salvajes. La producción de MDA (malondialdehyde), marcador de daño lipídico por oxidación, era bajo en las

transgénicas indicando que la necesidad de producir compuestos antioxidantes era poca; por el contrario, la liberación de MDA se hallaba incrementada en las plantas control. Además, en condiciones de estrés osmótico las plantas transgénicas mostraron una capacidad de germinación superior. Así pues, en conjunto las plantas transgénicas *rab28* crecen a una mayor velocidad en condiciones de estrés hídrico. Estos resultados sugieren el potencial del gen LEA *rab28* para aumentar la resistencia de cultivos frente al estrés. De hecho, varios estudios han mostrado el beneficio que supone la sobreexpresión de genes LEA en otras especies vegetales en relación a la tolerancia al estrés (Leprince and Buitink 2010, Yang et al. 2010).

En las plantas de maíz transgénico *rab28* se observó una reducción en el número de granos por mazorca. La reducción era más pronunciada en las plantas homocigotas que las heterocigotas. El peso y aspecto de las semillas producidas era, sin embargo, normal. No es infrecuente que las aproximaciones transgénicas en maíz resulten en una reducción de la producción de semillas, puesto que este carácter está asociado a numerosos genes. En plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan factores de transcripción de estrés y en plantas de arroz que sobreexpresan una proteína LEA del grupo 3 las penalizaciones en la producción ya se habían descrito (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007, Xiao et al. 2007). El uso de promotores apropiados y la selección de plantas con copias únicas del transgen pueden evitar o reducir los efectos colaterales indeseados (Xiao et al. 2007).

Respecto a la localización intracelular, la proteína Rab28 se localizó mediante inmunocitoquímica “whole mount” y microscopía confocal en los nucléolos de las células de raíz de plantas transgénicas, tanto en condiciones de estrés osmótico como en condiciones óptimas de crecimiento. Con anterioridad, Rab28 ya había sido localizada en los nucléolos de las células del escutelo de embriones maduros de maíz (Niogret et al. 1996). En el presente estudio hemos ampliado esta información puesto que por fraccionamiento de núcleos aislados de embrión se ha comprobado que la proteína Rab28 está asociada a la fracción S2 o fracción ribonucleoproteica (RNP). La fracción S2 corresponde al proteoma soluble en tampón de baja fuerza iónica y contiene 70-80% de RNA y proteínas nucleolares implicadas en la síntesis y procesamiento de los precursores ribosomales (Cárcer et al. 1997). Esta observación abre la posibilidad de que la diana biológica de Rab28 no sea necesariamente, o no sólo, una proteína sino también RNA. Finalmente y a modo de resumen, los datos expuestos en el capítulo 3 de

esta tesis demuestran que la sobreexpresión del gen *rab28* de la familia LEA, grupo 5, en plantas de maíz genera plantas más resistentes al estrés osmótico, lo que indica el potencial biotecnológico de este gen LEA; a nivel subcelular la proteína Rab28 tiende a acumularse en el nucleolo de la célula, tanto en embriones como en tejido vegetativo, lo que sugiere que Rab28 podrían contribuir a la estabilización y protección de los componentes de la estructura nucleolar durante el estrés osmótico.

