

R.19.089

TD 472



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**REQUERIMIENTO DE UN HSE IMPERFECTO Y OTROS ELEMENTOS EN  
CIS PARA LA EXPRESIÓN EMBRIONARIA DEL GEN *Ha hsp17.6 G1*, UN  
GEN *shsp* VEGETAL QUE NO SE INDUCE EN RESPUESTA AL CALOR.**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al  
folio... 30 ..... número... 370 ..... del libro  
correspondiente.

Sevilla, ..... 16 JUN. 2000 .....

El Jefe del Negociado.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Raúl Carranco Galán", with a horizontal line underneath.

Raúl Carranco Galán

TESIS DOCTORAL

Sevilla, Junio de 2000

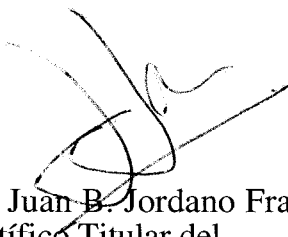
**REQUERIMIENTO DE UN HSE IMPERFECTO Y OTROS ELEMENTOS EN  
CIS PARA LA EXPRESIÓN EMBRIONARIA DEL GEN *Ha hsp17.6 G1*, UN  
GEN *shsp* VEGETAL QUE NO SE INDUCE EN RESPUESTA AL CALOR.**

Tesis presentada por el licenciado Raúl Carranco Galán  
para optar al grado de Doctor en Biología



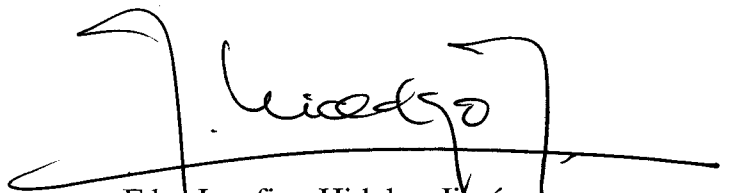
Sevilla, Junio de 2000

VºBº El Director



Fdo: Juan B. Jordano Fraga.  
Científico Titular del  
Consejo superior de  
Investigaciones Científicas.

VºBº El Tutor



Fdo: Josefina Hidalgo Jiménez.  
Profesor Titular de la  
Facultad de Biología.  
Universidad de Sevilla.

<b>INDICE</b> .....	i
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>I. INTRODUCCION.</b>	
1. La embriogénesis zigótica en plantas superiores. ....	1
2. Expresión de las sHSPs durante el desarrollo embriona .....	4
2.1. Características estructurales de las sHSPs.....	4
2.2. Posibles funciones de las HSPs. ....	5
2.3. Expresión de las sHSP. ....	7
3. Regulación transcripcional de los genes shsp. ....	8
3.1. Los elementos en cis de respuesta a choque térmico. ....	8
3.2. Los factores transcripcionales de choque térmico. ....	10
3.3. Participación de los HSEs en la regulación embrionaria de genes shsp. ....	12
<b>II. MATERIALES Y METODOS.</b>	
1. Material biológico. ....	17
1.1. Genoteca y vectores. ....	17
1.2. Bacterias. ....	17
1.3. Material vegetal. ....	18
1.3.1. Especies vegetales. ....	18
1.3.2. Esterilización de semillas y germinación. ....	18
1.3.3. Cultivo de plantas. ....	19
1.4. Tratamientos del material vegetal. ....	19
1.4.1. Tratamientos con ácido abscísico. ....	19
1.4.2. Tratamientos de estrés hídrico. ....	19
1.4.3. Tratamientos de estrés térmico.....	19
2. Escrutinio de una genoteca genómica. ....	20
2.1. Propagación de los bacteriófagos. ....	20
2.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa del ADN de los bacteriófagos. ....	21
2.3. Preparación de sondas radiactivas de ADN. ....	21
2.4. Cromatografía en minicolumnas de Sephadex G-50. ....	22
2.5. Hibridación de las membranas con la sonda. ....	22
2.6. Selección del clon Ha hsp17.6 G1. ....	23
3. Purificación y análisis de ADN. ....	23
3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano. ....	23
3.2. Purificación de ADN de cadena sencilla. ....	23
3.3. Purificación de ADN de bacteriófagos. ....	23
3.4. Purificación de ADN de plantas. ....	24
3.5. Cuantificación del ADN. ....	25
3.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa. ....	25
3.7. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa. ....	25
3.8. Análisis de tipo Southern. ....	25
3.8.1. Digestión de los ADNs. ....	25

3.8.2. Transferencia de ADN desde los geles a membranas de nylon. ....	26
3.8.3. Preparación de las sondas de ADN. ....	26
3.8.4. Hibridación con sondas radiactivas. ....	26
3.8.5. Lavado de los filtros hibridados. ....	27
4. Manipulación enzimática del ADN. ....	27
4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción. ....	27
4.2. Defosforilación de extremos 5'. ....	27
4.3. Generación de extremos romos de ADN. ....	28
4.4. Ligación de moléculas de ADN. ....	28
5. Transformación de bacterias. ....	29
5.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> . Método del RbCl (Hanahan, 1983). ....	29
5.2. Transformación de <i>E. coli</i> . ....	29
5.3. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> (Holsters et al, 1978). ....	30
5.4. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> . ....	30
6. Secuenciación de ADN. ....	30
6.1. Reacciones de secuenciación. ....	30
6.2. Electroforesis con geles de poliacrilamida. ....	31
6.3. Análisis de secuencias asistido por ordenador. ....	31
7. Purificación de ARN. ....	32
7.1. Preparación de ARN total de tejidos vegetales. ....	32
7.2. Cuantificación de ARN. ....	32
7.3. Electroforesis desnaturalizante de ARN. ....	33
8. Protección frente a la digestión con ARNasa A. ....	33
8.1. Preparación de la ribosonda. ....	33
8.1.1. Transcripción in vitro. ....	33
8.1.2. Purificación de la ribosonda. ....	34
8.2. Hibridaciones. ....	35
8.3. Digestiones con ARNasa A. ....	36
8.4. Electroforesis. ....	36
9. Extensión del cebador (primer extension). ....	36
9.1. Marcaje del oligonucleótido. ....	37
9.2. Hibridación del ARN con el cebador. ....	37
9.3. Reacción de la retrotranscriptasa. ....	37
9.4. Resolución en gel de secuenciación. ....	38
10. Experimentos de transcripción in vitro con núcleos aislados (run on). ....	38
10.1. Purificación de los núcleos. ....	38
10.2. Cuantificación del ADN de la solución de núcleos. ....	39
10.3. Reacción de transcripción y purificación de los ARN. ....	40
10.4. Preparación de los filtros para la hibridación. ....	40
10.5. Hibridación y detección. ....	41
11. Experimentos de retardo de bandas. ....	42
11.1. Preparación de los fragmentos de ADN. ....	42

11.2. Reacción de unión del hHSF1 a los fragmentos de ADN. ...	42
11.3. Electroforesis y detección. ....	43
12. Mutagénesis dirigida por PCR. ....	43
12.1 Construcción del plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS. ....	43
12.2 Síntesis del "megaprimer". ....	43
12.3 La segunda PCR. ....	44
12.4 Introducción de los fragmentos de ADN mutagenizados en el plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS. ....	45
13. Transformación de plantas de tabaco mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	45
13.1. Plásmidos para la transformación de plantas de tabaco. ..	45
13.1.1. Construcción quimérica -1486::GUS ....	45
13.1.2. Construcción quimérica -533::GUS ....	46
13.1.3. Construcción quimérica -126::GUS. ....	46
13.1.4. Construcciones quiméricas -1486(m)::GUS y -1486(p)::GUS. ....	46
13.2. Preparación de las células de <i>A. tumefaciens</i> . ....	47
13.3. Transformación de discos de hoja de tabaco. ....	47
13.4. Selección de transformantes y enraizamiento. ....	48
14. Comprobación de la presencia del transgén en las plantas de tabaco transformadas. ....	48
14.1. PCR de ADN genómico de plantas. ....	48
14.1.1. Reacciones de PCR. ....	49
14.1.2. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR. .	49
14.2. Análisis de las plantas transformadas mediante hibridaciones tipo Southern. ....	49
15. Análisis de la actividad $\beta$ -glucuronidasa de las plantas transgénicas. ....	50
15.1. Detección histoquímica de la actividad GUS. ....	50
15.2. Cuantificación de la actividad GUS por fluorimetría. ....	50
15.2.1. Extracción de proteínas. ....	51
15.2.2. Cuantificación de las proteínas de los extractos. ..	51
15.2.3. Reacciones fluorimétricas. ....	51
15.2.4. Medidas fluorimétricas. ....	51
15.3. Análisis estadístico de los datos. ....	52

### III. RESULTADOS.

1. Clonación, secuenciación y determinación del inicio de la transcripción del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> . ....	53
2. El gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> contiene un HSE imperfecto capaz de unirse al hHSF1 in vitro. ....	58
3. Los ARNs <i>Ha hsp17.6 G1</i> se acumulan durante la embriogénesis, pero no en tejidos vegetativos en respuesta a estrés térmico o hídrico. ....	63
4. El gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> no se transcribe en respuesta a choque térmico en germínulas. ....	71

<b>INDICE</b> .....	i
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
5. El gen quimérico -1486::GUS reproduce en plantas transgénicas de tabaco el patrón de expresión del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> en girasol. .	73
6. El HSE del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> es necesario para la expresión del gen quimérico -1486::GUS en embriones de tabaco transgénico. ....	82
7. Las mutaciones que ajustan al consenso las secuencias de las regiones con HSE de los genes <i>Ha hsp17.6 G1</i> y <i>Ha hsp17.7 G4</i> tienen efectos distintos sobre su expresión embrionaria. ....	91
8. El gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> contiene otros elementos en cis, aguas arriba de su HSE, con efectos positivos y negativos sobre su regulación. ....	94
<b>IV. DISCUSION.</b>	
1. Evolución de la regulación de los genes shsp. ....	99
2. El HSE del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> es necesario para la activación transcripcional de dicho gen durante la fase de desecación de los embriones. ....	100
3. El gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> contiene elementos en cis que, junto con su HSE, activan a su promotor durante la fase de desecación del embrión. ....	106
4. Regulación del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> en etapas anteriores a la desecación del embrión. ....	110
5. El estudio del gen <i>Ha hsp17.6 G1</i> podría ayudar determinar el papel de las sHSPs durante la desecación de los embriones. ....	113
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	
1. Conclusiones. ....	117
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	
1. Bibliografía. ....	119

- 6BA: 6-Benzil-aminopurina.  
ABA: ácido abcísico.  
ADNasa: desoxirribonucleasa.  
ADNc: ADN correspondiente a un ARNm.  
APS: persulfato amónico.  
ARNasa: ribonucleasa.  
ARNm: ARN mensajero.  
ARNt: ARN transferente.  
ATG: sitio de inicio de la traducción.  
ATP: adenosín trifosfato.  
BSA: seroalbúmina bovina.  
cm: centímetros.  
c.p.m.: cuentas por millón.  
DEPC: dietil pirocarbonato.  
DMSO: dimetilsulfóxido.  
dpa: días post anthesis.  
dpi: días post imbibición.  
D.O.: densidad óptica.  
DOC: deoxicolato sódico.  
DTT: ditioneitol.  
EDTA: ácido etilen-diamino tetracético.  
g: gramos.  
G: aceleración de la gravedad.  
Gly: glicina.  
GUS:  $\beta$  glucuronidasa.  
h: horas.  
Hepes: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure.  
hHSF: factor transcripcional de respuesta a choque térmico humano.  
HSE: elemento en cis de respuesta a choque térmico.  
HSF: factor transcripcional de respuesta a choque térmico.  
HSP: proteínas de choque térmico.  
IAA: alcohol isoamílico.  
Ile: isoleucina.  
kDa: kilodalton.  
Leu: leucina.  
M: molar.  
mg: miligramos.  
min: minutos.

mm: milímetros  
MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.  
MU: 7-hidroxi-4-metilumbeliferona.  
MUG: 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucurónido.  
NAA: ácido naftaleno acético.  
nt: nucleótidos.  
pb: pares de bases de nucleótidos.  
PCR: reacción en cadena de la DNA polimerasa.  
PEG: polietilén glicol.  
pfc: partículas formadoras de calvas de lisis.  
PIPES: 1,4 piperazindiethansulfonsaure.  
Pro: prolina.  
SDS: dodecilsulfato sódico.  
sHSP: proteínas de choque térmico de bajo peso molecular.  
RNAsa: ribonucleasa.  
TBP: proteína de unión a la caja TATA.  
TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina.  
TFIID: factor de transcripción IID.  
Tris: tris- (hidroximetil)-aminoetano.  
U: unidades de actividad enzimática.  
V: voltios.  
Val: valina.  
X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido.



## **I. INTRODUCCIÓN.**

## 1. La embriogénesis zigótica en plantas superiores.

Las plantas superiores se caracterizan por la formación de semillas que contienen el embrión protegido por una cubierta procedente de tejidos maternos (Wobus y Weber, 1999). La formación de las semillas comienza con un doble evento de fertilización, del que se forman el cigoto y la célula progenitora del endospermo. El endospermo es un tejido de reserva, que forma parte de las semillas maduras en plantas monocotiledóneas. En cambio, en plantas dicotiledóneas puede formar parte de la semilla madura, como es el caso del tabaco, o desaparecer durante la embriogénesis, como es el caso del girasol. El cigoto por su parte, sufre una serie de divisiones celulares y cambios morfológicos hasta transformarse en un embrión maduro con un eje embrionario, que contiene un meristemo apical y otro radicular (de los que surgirán el tallo y la raíz respectivamente), y los cotiledones. El embrión maduro permanece en estado quiescente hasta la germinación (revisado en Goldberg *et al.*, 1994 y Dodeman *et al.*, 1997).

El desarrollo embrionario en plantas dicotiledóneas se puede dividir en tres fases sucesiva: una fase inicial (embriogénesis temprana), una fase de maduración temprana y una fase de desecación (Parcy *et al.*, 1997 y Dodeman *et al.*, 1997).

La embriogénesis temprana es un período de intensa división y diferenciación celular, donde se produce la morfogénesis del embrión. Tras la fertilización, el cigoto se divide en dos células hijas: la célula apical y la célula basal. La célula basal sufre una serie de divisiones transversales y genera el suspensor, que ancla el embrión en desarrollo a los tejidos maternos adyacentes y transporta los nutrientes desde la planta madre al embrión. El suspensor senesce posteriormente y no forma parte del embrión maduro. La célula apical, mediante divisiones radiales, forma el embrión globular. En el embrión globular se diferencian el protoderma, el procambium y el meristemo fundamental que generan los tejidos epidérmicos, vasculares y parenquimáticos de la planta adulta, respectivamente. El embrión globular sufre una serie de divisiones celulares asimétricas y una diferenciación celular que forman el embrión con forma de corazón. En este embrión se diferencian dos sistemas de órganos: el eje y el cotiledón. El eje contiene los meristemos apical y radicular que, tras la germinación, dan lugar a la planta adulta. El cotiledón en cambio, almacena

sustancias de reserva para nutrir a la germínula hasta que sea fotosintéticamente activa y senesce durante la germinación (revisado en Goldberg *et al.*, 1994 y Dodeman *et al.*, 1997).

Durante la fase de maduración temprana se produce una expansión celular y una enorme síntesis y deposición de proteínas, lípidos y azúcares de reserva que se utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno durante la germinación. En este período, en dicotiledóneas se alcanza la máxima acumulación de ácido abscísico (ABA) y comienza a descender el potencial hídrico de las células embrionarias (revisado en Galau *et al.*, 1991, Goldberg *et al.*, 1994 y Dodeman *et al.*, 1997).

En la fase de desecación se detiene toda actividad transcripcional, se reduce el contenido hídrico de las células embrionarias y de las envueltas adyacentes hasta el 10% y el embrión entra en un estado quiescente donde se detiene toda la actividad metabólica. El embrión maduro permanece en estado quiescente hasta que las condiciones ambientales son propicias para su germinación (revisado en Galau *et al.*, 1991, Goldberg *et al.*, 1994 y Dodeman *et al.*, 1997).

Aún queda mucho por saber sobre los mecanismos de regulación que coordinan los procesos que ocurren durante las fases de maduración temprana y desecación de la embriogénesis. Sin embargo, hay evidencias de que el ABA es un regulador fundamental de muchos de estos procesos (Giraudat *et al.*, 1994). Algunos mutantes en la síntesis de ABA de *Arabidopsis* (mutantes *aba*), que contienen un nivel reducido de esta hormona, muestran una acumulación reducida de algunas proteínas de reserva, lo que indica que el ABA está involucrado en su acumulación, junto con otros factores (Giraudat *et al.*, 1994). También se ha demostrado que el ABA interviene en la inhibición de la germinación, en el establecimiento y mantenimiento de la dormancia y en la adquisición de tolerancia a la desecación (Thomas *et al.*, 1997, Dodeman *et al.*, 1997 y Quatrano *et al.*, 1997).

Entre los genes implicados en la regulación de la maduración y desecación de las semillas de *Arabidopsis* se ha determinado un papel prominente de los genes *ABA-insensitive3* (*abi3*), *fusca3* (*fus3*) y *leafy cotyledon1* (*lec1*) que afectan a un amplio espectro de procesos específicos de estas fases (Parcy *et al.*, 1997 y Wobus y Weber, 1999). El análisis de los dobles mutantes en estos genes demuestra que son responsables de distintas rutas de desarrollo que se integran en la regulación de la maduración de las semillas. Así por ejemplo, *abi3* es el

único de los tres que está implicado en la respuesta a la hormona ABA. *abi3* actúa conjuntamente con *fus3* y con *lec1* en la degradación de la clorofila, en la supresión de la acumulación de antocianinas durante la embriogénesis tardía, en la acumulación de proteínas de reserva y en la adquisición de la dormancia y la tolerancia a la desecación. Por su parte, los mutantes en los genes *fus3* y *lec1* son los únicos que presentan cotiledones con características de hojas, lo que indica que están relacionados con la morfogénesis de los cotiledones (Parcy *et al*, 1997 y Holdsworth, 1999).

Los mutantes *abi* de *Arabidopsis* (entre los que se incluye *abi3*) son mutantes insensibles a ABA que se aislaron como embriones capaces de germinar en medios de cultivo en presencia de dicha hormona. El análisis de los dobles mutantes *aba/abi3* indica que la proteína ABI3 modula la expresión de determinados genes embrionarios a través de dos rutas, una dependiente de ABA y otra independiente (Parcy *et al*, 1994). Los embriones con mutaciones en *abi3* o en *vp1* (su homólogo en maíz) se desarrollan con normalidad hasta la fase de maduración. En cambio, durante esta etapa, estos mutantes acumulan niveles bajos de proteínas y lípidos de reserva en sus semillas, no degradan la clorofila acumulada en etapas anteriores del desarrollo y no alcanzan la tolerancia a la desecación ni entran en dormancia (Thomas *et al*, 1997). No todas las proteínas de reserva están afectadas de igual modo por la mutación de *abi3*. Por ejemplo, en los embriones mutantes para *abi3* ven reducidos sus niveles de acumulación de ARNm de las proteínas de reserva cruciferinas y napinas, pero en cambio los ARNm PAP85 que codifican proteínas de reserva homólogas a las vicilinas de haba se acumulan normalmente. La mayoría de los ARNm de genes *lea* (*late embryogenesis abundant*) presentan patrones de acumulación anómalos en los mutantes *abi3*, pero la acumulación de algunos como los ARNm PAP51 y RAB18 no está alterada (Parcy *et al*, 1994).

Los genes *abi3* y *vp1* codifican proteínas que contienen dominios con características típicas de factores transcripcionales (McCarty, 1995). Estas proteínas pueden actuar sobre algunos genes como un activador transcripcional y sobre otros como un represor. Por ejemplo, se ha comprobado que durante la maduración de la semilla, el factor VP1 actúa como activador transcripcional de los genes embrionarios *em* de trigo y *C1* (*colourless-1*) de maíz y como represor del gen  $\alpha$ -amilasa de cebada que se expresa durante la germinación

(Schwechheimer y Bevan, 1998). El factor VP1 puede ejercer su acción como un activador (uniéndose directamente al ADN) o como coactivador (no se une al ADN sino que actúa sobre otros factores). Así, por ejemplo, VP1 activa directamente al gen *Cl* a través de los elementos Sph de su promotor pero, en cambio, activa al gen *em* facilitando la unión del factor EMBP1 a los elementos Emla y Emlb de su promotor (Schwechheimer y Bevan, 1998). El factor ABI3 también puede actuar como un coactivador. En la activación del gen de girasol *Ha hsp17.7 G4*, Rojas *et al* (1999) demostraron que ABI3 no se une directamente a su promotor sino que lo hace a un HSF y éste se une a los HSEs allí presentes (descrito con más detalle más adelante).

## **2. Expresión de las sHSPs durante el desarrollo embrionario.**

### **2.1. Características estructurales de las sHSPs.**

Ante una subida en la temperatura (choque térmico) los organismos, desde las bacterias hasta los eucariotas superiores, responden con un fuerte aumento en la síntesis de un grupo de proteínas denominadas de choque térmico (HSP) y la represión de la transcripción y traducción de la mayoría de los genes restantes. Esta respuesta a choque térmico ocurre cuando la temperatura se eleva hasta constituir un estrés para el organismo en cuestión, lo que en plantas suele ser entre 8 y 12°C sobre su temperatura óptima de crecimiento (Vierling, 1991 y Nagao y Gurley, 1999). Las principales HSPs sintetizadas por los eucariotas se agrupan en al menos cinco familias muy conservadas: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP de bajo peso molecular (sHSP) con tamaños entre 17 y 30 kDa. Las ubiquitininas, involucradas en proteólisis dependiente de ATP, también se consideran HSPs dada su inducibilidad por choque térmico aunque no tienen homologías de secuencias con las demás clases de HSPs (revisado por Vierling, 1991 y Nagao y Gurley, 1999).

Una característica de la respuesta al choque térmico que diferencia a las plantas del resto de los organismos es la síntesis de un gran número de sHSPs diferentes, que en algunas especies alcanza hasta 30 (revisado por Vierling, 1991). En cambio, en levaduras sólo se sintetiza una única sHSP, cuatro en *Drosophila* y tres en mamíferos, incluyendo el  $\alpha$ A y el  $\alpha$ B-cristalinos, que se pueden considerar como verdaderas sHSPs (Revisado por Arrigo & Landry, 1994). En plantas las

sHSPs durante un choque térmico, llegan a constituir hasta el 1% del total de las proteínas en hojas, a diferencia de otros organismos donde predominan las HSP70 (DeRocher *et al*, 1991).

La familia de las sHSPs es la menos conservada evolutivamente de las HSPs. Todas las sHSPs vegetales presentan un dominio carboxilo terminal conservado (dominio de choque térmico) pero muestran una gran variabilidad en su región amino terminal. El dominio de choque térmico está formado por unos 100 aas que forman dos subdominios, denominados consenso I y II, separados por una región hidrofílica de extensión variable. En el consenso I, más próximo al extremo carboxilo terminal, destaca la conservación en casi todas las sHSPs de la secuencia Pro-X<sub>(14)</sub>-Gly-Val-Leu. En el consenso II aparece el motivo Pro-X<sub>(14)</sub>-X-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile y se le predice una estructura secundaria similar a la del consenso I (revisado en Waters *et al.*, 1996). Las sHSPs vegetales se han clasificado en 6 grupos según la homología entre sus secuencias y su localización celular: dos grupos se localizan en el citosol (clases I y II), otro en las mitocondrias, otro en los cloroplastos y otro en el sistema de endomembranas (Waters *et al*, 1996 y Waters y Vierling, 1999). La clase VI está representada por un único cDNA de *Glycine max*, Gm hsp22.3, descrito por Lafayette *et al* (1996). Según los análisis evolutivos, este gran número de familias de sHSPs debió surgir por duplicaciones génicas y divergencia previas a la diversificación de las plantas angiospermas (Waters *et al*, 1996 y Waters y Vierling, 1999).

## 2.2. Posibles funciones de las HSPs.

La correlación entre la expresión de HSPs y la resistencia celular a altas temperaturas ha conducido a la hipótesis de que las HSPs protegen a las células de los efectos negativos de las altas temperaturas (Waters *et al*, 1996). Para comprobar esta hipótesis se han generado plantas de *Arabidopsis* que superproducen At HSF3 (Prandl *et al*, 1998) o que expresan el factor At HSF1 fusionado traduccionalmente con el gen *gus* (esta fusión activa artificialmente el factor At HSF1) (Lee *et al*, 1995 B). De acuerdo con la hipótesis de partida, en ambos casos las plantas obtenidas sufrían un incremento en sus niveles de HSPs y mostraban una mayor termotolerancia. Aún no se ha determinado en detalle el mecanismo por el que las HSPs ejercen esta protección pero se ha comprobado que algunas HSPs actúan como "chaperonas moleculares". Las chaperonas moleculares son proteínas que se unen a

otras proteínas parcialmente plegadas o desnaturalizadas y, o bien evitan una agregación irreversible, o bien promueven un plegamiento correcto (Waters *et al*, 1996). Las chaperonas moleculares son esenciales durante la síntesis de proteínas o en su translocación a través de membranas, para evitar asociaciones incorrectas entre distintas regiones de los péptidos que emergen. Para ello, las chaperonas se unen a estos péptidos y secuestran transitoriamente las superficies proteicas que pueden interaccionar indebidamente. Durante el choque térmico, las proteínas celulares se pueden desnaturalizar y formar agregados. Se propone que las HSPs, a través de su actividad chaperona podrían evitar la formación de estos agregados y participar en su correcta renaturalización después del estrés (revisado en Vierling, 1991, Parsell y Lindquist, 1993 y Nover y Scharf, 1997).

Aunque en el caso de las sHSPs tampoco se conocen sus funciones específicas, su abundancia, distribución y la conservación de sus secuencias también sugieren que están involucradas en la capacidad de la plantas para sobrevivir en condiciones de estrés (Waters *et al*, 1996). Para algunas de ellas, como la proteína de zanahoria HSP17.7, se ha determinado un papel esencial en la termotolerancia. Las plantas transgénicas de zanahoria que superproducen HSP17.7 son más termotolerantes mientras que las que presentan una reducción en sus niveles ven reducida su termotolerancia (Malik *et al*, 1999). Algunas sHSPs poseen actividad chaperona, como por ejemplo las proteínas Ps HSP18.1 (de clase I) y Ps HSP17.7 (de clase II) que evitan la agregación de proteínas desnaturalizadas por estrés y potencian su renaturalización (Lee *et al*, 1995 A). Otra función que se ha propuesto para las sHSPs es la de secuestrar y proteger en situaciones de choque térmico los ARNm inactivos transcripcionalmente. Esta hipótesis se basa en los experimentos de cofraccionamiento realizados por Nover *et al*, (1989) donde los gránulos de sHSPs se purificaban junto ARNms que no son traducidos durante un choque térmico. Las sHSPs cloroplásticas podrían estar implicadas en la protección del fotosistema II (Waters *et al*, 1996). La HSP27 de humanos detiene la polimerización de la actina *in vitro* y podría actuar estabilizando los microfilamentos durante el choque térmico y ayudando a su posterior reparación (Arrigo y Landry, 1994). También se han propuesto otras funciones para las proteínas sHSP como la de inhibir las proteasas o proteger contra el estrés

oxidativo provocado por la actividad mitocondrial (revisado en Arrigo y Landry, 1994, Waters *et al*, 1996 y Nover y Scharf, 1997).

### 2.3. Expresión de las sHSP.

El estrés térmico no es el único factor que conduce a una elevada expresión de HSPs. Los tratamientos con análogos de amino ácidos, etanol, metales pesados o arsenito también conducen a la expresión de, al menos, algunas HSPs (revisado en Vierling, 1991). El estrés hídrico provoca acumulación de sHSP de tipo I y II en girasol (Almoguera *et al*, 1993). En respuesta a estrés osmótico también se acumulan ARNm de algunos genes *hsps* y en casos como los del gen de soja *Gm hsp26-A* llegan incluso a alcanzar niveles similares a los observados durante la respuesta a un choque térmico (Czarnecka *et al*, 1984).

Algunas HSPs también se expresan en ausencia de estrés exógeno (Vierling, 1991 y Nagao y Gurley, 1999). En la familia *hsp70* de guisante encontramos un claro ejemplo de genes *HSPs* que se expresan constitutivamente y genes *HSPs* inducibles por un choque térmico (DeRocher y Vierling, 1995). Los ARNm Ps HSP71.2, que son indetectables en hojas no estresadas, se inducen fuertemente en respuesta a choque térmico. En cambio, los ARNm Ps HSP70 se detectan en las hojas no estresadas y su concentración apenas sufre variación en un choque térmico (DeRocher y Vierling, 1995). Otro ejemplo lo encontramos en la familia de genes *hsp90*. En plantas de *Arabidopsis* sin estresar se detecta la acumulación de los ARNm *hsp81-3* y *hsp81-2* (este último en menor concentración) pero apenas se detecta la del ARNm *hsp81-1*. Por el contrario, tras un choque térmico la concentración de los ARNm *hsp81-1* supera a la de los otros dos ARNm (Yabe *et al*, 1994).

La expresión de sHSPs en ausencia de estrés, se ha estudiado con mayor profundidad en animales. En *Drosophila* se ha descrito que, en ausencia de estrés, *Dm hsp27*, *Dm hsp26* y *Dm hsp23*, se acumulan a distintos niveles en determinados tejidos como las células de los ovarios y los oocitos o durante el desarrollo embrionario. La única sHSP de levaduras se expresa durante la meiosis y la formación de la ascospora. En embriones de *Xenopus* sin estrés exógeno se ha detectado la acumulación de la HSP30. En mamíferos, HSP27 y  $\alpha A$  y  $\alpha B$  cristalinos se expresan en ausencia de estrés en distintos tejidos. En el caso de HSP27 se ha asociado esta expresión con cambios en el estado



de diferenciación y proliferación de determinadas líneas celulares (revisado en Arrigo & Landry, 1994).

En la familia de genes *shsp* de plantas se ha observado expresión en ausencia de estrés exógeno, durante la formación de polen (Mascarenhas y Crone, 1996) y el desarrollo embrionario (Waters *et al*, 1996). En la familia génica de las *shsps* se ha determinado, tanto a nivel de acumulación de ARNm (Coca *et al*, 1996) como a nivel de acumulación de proteínas (Hernandez y Vierling, 1993 y Coca *et al*, 1994), que hay miembros que se expresan exclusivamente en respuesta a un choque térmico y otros que lo hacen en respuesta a un choque térmico y durante el desarrollo embrionario. Por análisis tipo Western también se han detectado algunas proteínas sHSP se expresan durante el desarrollo embrionario pero no en hojas sometidas a choque térmico (Hernandez y Vierling, 1993). Este resultado podría ser un artefacto debido a proteólisis parciales o modificaciones postraduccionales de otras sHSPs presentes tanto en semillas como en hojas sometidas a choque térmico. No obstante, de confirmarse la ausencia de acumulación de algunas proteínas sHSP embrionarias en hojas sometidas a choque térmico, ésta se podría deber tanto a una regulación postranscripcional del gen como a la falta de activación del promotor.

Los resultados de los experimentos de transcripción *in vitro* a partir de núcleos (ensayos *run on*) obtenidos en este trabajo sobre el gen de girasol *Ha hsp17.6 G1* muestran por primera vez un gen *shsp* vegetal que se transcribe durante la embriogénesis zigótica pero que no se transcribe en respuesta a un choque térmico (figura 10). De esta forma, en nuestro laboratorio se ha descrito, para la familia génica *shsp* de tipo I de girasol, un miembro que se transcribe en respuesta a choque térmico pero no durante el desarrollo embrionario (*Ha hsp18.6 G2*; figura 10 y Coca *et al*, 1996), otro que se transcribe durante la desecación del embrión pero no en respuesta a choque térmico (*Ha hsp17.6 G1*; figura 10) y un tercero que se transcribe en ambos casos (*Ha hsp17.7 G4*; figura 10; Coca *et al*, 1996 y Almoguera *et al*, 1998).

### **3. Regulación transcripcional de los genes *shsp*.**

#### **3.1. Los elementos en *cis* de respuesta a choque térmico.**

La acumulación rápida de los ARNms de los genes *hsp* en respuesta a un choque térmico se debe principalmente a una fuerte

activación transcripcional. La activación de los genes *hsp* está mediada por la unión de factores transcripcionales de choque térmico (HSFs) a elementos reguladores en *cis* (HSEs) localizados en sus secuencias promotoras. Los HSEs están presentes en los promotores de los genes *hsps* de los distintos organismos estudiados a una distancia de 40 a 270 pb aguas arriba del inicio de la transcripción. En *Drosophila* y levadura se ha establecido que los HSEs se componen de un número variable de repeticiones contiguas del pentanucleótido nGAAn (normalmente mayor de tres), que alternan esta orientación con su inversa (revisado en Fernandes *et al*, 1994 A). Aunque el factor de transcripción de choque térmico (HSF) de *Drosophila* es capaz de unirse *in vitro* a un fragmento de ADN con dos repeticiones del pentanucleótido perfectas, contiguas y con orientación alterna, lo hace con mucha menos afinidad que a un fragmento de ADN con tres repeticiones (Xiao *et al*, 1991). En *Drosophila* y levadura, la posición más importante en los pentanucleótidos nGAAn y nTTCn para la unión del HSF es la segunda y la cuarta (G y C) respectivamente (Fernandes *et al*, 1994 B). En levaduras además, en el promotor del gen *hsp70* se permiten espaciamientos de cinco nucleótidos entre dos repeticiones del pentanucleótido si las dos están en la misma orientación (Amin *et al*, 1988). La unión de los HSFs a los HSEs es cooperativa, de manera que la unión de un trímero de HSFs a un HSE potencia la ocupación de los pentanucleótidos contiguos por un segundo trímero (revisado en Wu, 1995).

En plantas se mantiene las características de los HSEs descritas para animales (Gurley y Key, 1991). En vegetales, para que un trímero de HSFs se una eficientemente a un HSE son necesarios al menos tres pentanucleótidos perfectos y contiguos en la orientación adecuada (Gurley y Key, 1991 y Schöffl *et al*, 1998). Sin embargo, para su función óptima, un HSE debe contener al menos cuatro pentanucleótidos reconocibles, lo que permite la unión cooperativa de dos trímeros de HSFs (Nagao y Gurley, 1999). Como en el caso de *Drosophila*, los estudios sobre el gen de soja *Gm hsp17.5E* han confirmado la importancia de la segunda posición del pentanucleótido nGAAn para la activación transcripcional de dicho gen (Barros *et al*, 1992). Estos estudios demostraron también que las posiciones de los extremos del pentanucleótido nGAAn no se disponen aleatoriamente sino que una A en la primera posición y una G en la última favorecen la transcripción inducida por calor del gen *Gm hsp17.5E*.

### 3.2. Los factores transcripcionales de choque térmico.

Los factores transcripcionales de choque térmico (HSFs) son factores responsables de la activación de los genes *hsp* durante el estrés térmico. Aunque muchos se sintetizan constitutivamente, al menos en plantas hay HSFs que son por sí mismas proteínas inducibles por choque térmico. En las levaduras y *Drosophila* se ha encontrado un único HSF, pero en animales superiores y plantas hay múltiples HSFs. Los tamaños de los múltiples HSFs purificados oscilan entre los 301 y los 833 restos de aas (revisado en Wu, 1995 y en Nover y Scharf, 1997). Esta complejidad en cuanto al tamaño se ve incrementada por el descubrimiento de isoformas generadas por "splicing" alternativo en los HSF1 y HSF2 de ratón (Fiorenza *et al*, 1995). A pesar de la gran variación en el tamaño de los HSFs, éstos mantienen una serie de estructuras comunes. En la región amino terminal de la proteína se encuentran los dominios reponsables de la unión al ADN, de tipo hélice-giro-hélice, y de la trimerización de los HSFs, que están extensamente conservados. En la región carboxilo terminal se hallan otros dominios menos conservados evolutivamente, como el dominio responsable de la transactivación, las secuencias que suprimen la trimerización constitutiva de los HSFs, las secuencias que impiden la transactivación constitutiva del HSF y el dominio de localización nuclear (revisado en Wu, 1995 y en Nover y Scharf, 1997).

Aunque en las levaduras, en condiciones normales de crecimiento, los HSFs están unidos a los HSEs como trímeros transcripcionalmente inactivos, en eucariotas superiores el HSF1 y permanece como monómeros inactivos, no unidos al ADN. Esta regulación negativa de la unión del HSF1 al ADN y de su transactivación requiere interacciones intramoleculares con su región central y su fosforilación constitutiva en residuos críticos de serina. También hay chaperonas moleculares como HSP90 que podrían intervenir en mantener este estado inactivo. En condiciones de estrés, el HSF1 se hiperfosforila, trimeriza (lo cual potencia notablemente su afinidad por los HSEs), se une al ADN y activa la transcripción. Cuando la cantidad de HSPs sintetizadas es suficiente para proteger las células ante el estrés, la transcripción se detiene (revisado en Wu, 1995 y Morimoto, 1998).

El conocimiento sobre las funciones de los distintos HSFs de vertebrados permanece aún incompleto. La diversidad observada en los

HSFs podría proporcionar una cierta redundancia en sus funciones, lo que sería una base adecuada para la especialización de distintos HSFs en distintas señales de estrés y para su acción conjunta con otros factores reguladores de otras respuestas genéticas (revisado en Morimoto, 1998 y en Cotto y Morimoto, 1999). El HSF1 de ratón está relacionado con la respuesta celular a choque térmico: los ratones que no sintetizan HSF1 se desarrollan con normalidad hasta ser adultos pero sus genes de choque térmico no se inducen por estrés (McMillan *et al.*, 1998). Sin embargo, en la respuesta a choque térmico pueden intervenir otros HSFs, ya que las células de ave a las que les falta el HSF3 sufren una severa reducción en la expresión de los genes de choque térmico y pierden su termotolerancia a pesar de expresar normalmente el HSF1 (Tanabe *et al.*, 1998). El HSF4 de humanos parece actuar como represor de la transcripción de los genes *hsp*: la sobreexpresión constitutiva del hHSF4 en células HeLa provoca su unión al ADN y una reducción en la expresión basal de los genes endógenos *hsp70*, *hsp90*, y *hsp27* (Nakai *et al.*, 1997). Por su parte, el HSF2 se ha asociado tradicionalmente a procesos de desarrollo, ya que se activa durante el desarrollo embrionario temprano en ratón, durante la espermatogénesis y por exposición de las células de eritrolucemia humana K562 a hemina (revisado en Morimoto, 1998 y en Cotto y Morimoto, 1999). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la activación del HSF2 es el resultado de la regulación negativa de la maquinaria de degradación proteica dependiente de ubiquitina: la incubación de células de mamífero que expresan el HSF2 con inhibidores específicos de la ruta de degradación por ubiquitinas, producen la activación de la unión del HSF2 al ADN de manera independiente del tipo celular (Mathew *et al.*, 1998).

En plantas se ha encontrado una mayor diversidad de HSFs que en animales (al menos 6 HSFs distintos en soja). En base a comparaciones entre la secuencia de aminoácidos de sus dominios de unión al ADN y de oligomerización, los HSFs vegetales caracterizados se han clasificado en al menos dos clases multigénicas (A y B), que a su vez se subdividen en otras dos subclases (revisado en Nover *et al.*, 1996). En plantas, a diferencia de lo que ocurre en animales, la diversificación de los trímeros de HSFs podría resultar aún más compleja por la posible heteroligomerización entre los distintos HSFs que cohabitan en las células. Hasta la fecha sólo se ha publicado la interacción entre dos HSFs de tomate de la clase A (Lp HSFA1 y Lp HSFA2) para su

importación al núcleo en células de tomate (Scharf *et al*, 1998) pero no se puede descartar que los heterooligómeros formados sean capaces de unirse al ADN y activar la transcripción. La región responsable de esta interacción es el dominio de oligomerización HR-A/B. La región HR-A/B de los HSFs vegetales de clase A contienen una inserción de 21 aas que no está presente ni en los HSFs vegetales de clase B ni en los HSFs animales. Esta inserción podría explicar que no se hayan detectado una interacción entre los HSFs de clase B o los HSFs animales similar a la descrita entre el Lp HSFA1 y el Lp HSFA2 (Scharf *et al*, 1998). Como en el caso de los HSFs animales, la diversificación de los HSFs vegetales podría reflejar una especialización funcional. En Prändl *et al* (1998) se sugiere una especialización funcional de los HSF3 y HSF4 de *Arabidopsis* respecto a la termotolerancia: las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que superproducen At HSF3 sufren un incremento en su termorresistencia basal, pero no las que superproducen At HSF4.

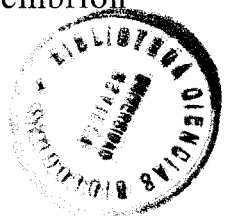
### **3.3. Participación de los HSEs en la regulación embrionaria de genes *shsp*.**

Los análisis por delección de los promotores del gen de girasol *Ha hsp17.7 G4* y del gen de soja *Gm hsp17.3-B*, mostraron que las regiones que contienen sus HSEs son necesarias para la expresión de dichos genes durante la fase de desecación de las semillas (respectivamente, Coca *et al*, 1996 y Prändl y Schöffl, 1996). Los estudios más precisos, por mutagénesis dirigida de las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4*, muestran una evidencia más directa de la implicación de estos elementos en la expresión de dicho gen durante la desecación del embrión: las mutaciones en las dos regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* que impiden específicamente la unión de los HSFs, redujeron drásticamente la activación de este gen durante la fase de desecación del embrión aunque no afectó a su activación en etapas anteriores (Almoguera *et al*, 1998; mutante E). Este resultado demuestra que las regiones con HSEs de este gen son necesarias para su expresión durante la fase de desecación de los embriones y, por lo tanto, participan en ella de HSFs. Por el contrario, en las etapas anteriores no intervienen los HSE.

Fuera de contexto, repeticiones de HSEs sintéticos fusionados a las secuencias de la caja TATA del promotor *CaMV 35S*, son capaces de dirigir la expresión del gen *gus* en semillas de tabaco (Prändl y Schöffl, 1996). En cambio, en este trabajo mostramos que en un promotor

natural como el del gen de girasol *Ha hsp18.6 G2*, con regiones con alta homología con los HSEs, no hay transcripción en embriones de girasol de 20 a 24 dpa (figura 10). Este resultado nos indica que la presencia de HSEs en los promotores de genes *shsp* no es suficiente para su expresión durante el desarrollo embrionario en plantas.

En plantas hay evidencias que indican que los mecanismos de activación de genes *shsp* durante el desarrollo embrionario y en respuesta a choque térmico podrían ser distintos. Mediante hibridaciones tipo Western, con anticuerpos contra *At HSP17.6*, se ha demostrado que las sHSPs que se expresan en las semillas de *Arabidopsis* durante la embriogénesis no se acumulan en cantidades detectables en los mutantes *abi3-6*. Sin embargo, en estos mutantes, la acumulación de estas proteínas en respuesta a choque térmico no ve afectada (Wehmeyer *et al*, 1996). Otra evidencia la encontramos en el estudio de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el gen *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor *At hsp17.4*. En estas plantas se empieza a detectar actividad GUS a los 9 dpa, que va en aumento hasta la desecación del embrión. Sin embargo, la actividad GUS en embriones de 4 dpa sometidos a choque térmico es indistinguible de la encontrada en embriones más maduros sometidos al mismo tratamiento (Wehmeyer y Vierling, 2000). La actividad del promotor *At hsp17.4* también se ha estudiado en mutantes de *Arabidopsis fus3-3*, *lec1-2* y *abi3-6* (afectados en la fase de maduración de los embriones) utilizando el mismo gen quimérico (Wehmeyer y Vierling, 2000). En estos mutantes la actividad GUS es muy reducida (mutantes *fus3-3* y *lec1-2*) o indetectable (*abi3-6*), pero tras someter los embriones a choque térmico, se alcanzan unos niveles de actividad similares a los hallados en las plantas con un fondo genético silvestre sometidas al mismo tratamiento. Estos resultados indican una clara diferencia en la regulación del promotor *At hsp17.4* en respuesta a choque térmico y durante el desarrollo embrionario (Wehmeyer y Vierling, 2000). En el caso del gen *Ha hsp17.7 G4* hay además evidencias de que los mecanismos de activación a través de los HSEs de este gen durante el desarrollo embrionario y en respuesta a choque térmico son distintos. Se han descrito mutaciones que alejan la región con HSEs proximal del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* del consenso para los HSEs, que eliminan su respuesta a choque térmico pero sólo reducen parcialmente su expresión durante la desecación del embrión (Almoguera *et al*, 1998; mutante A).



Las diferencias entre los mecanismos de activación a través de los HSEs, durante el desarrollo embrionario y en respuesta a un choque térmico, podrían deberse a la participación de HSFs distintos en cada caso. Los HSFs implicados en la regulación embrionaria a través de HSEs podrían tener una especificidad por la secuencia de ADN distinta a la de los HSFs implicados en la respuesta a choque térmico. En animales se ha descrito una especialización en las secuencias a las que se unen los HSFs: el mHSF1 se une preferentemente a HSEs más extensos que el mHSF2, probablemente debido a una mayor capacidad para establecer interacciones cooperativas entre trímeros (Kroeger y Morimoto, 1994). En plantas aún no se ha publicado una especialización análoga de los HSFs, pero no puede descartarse dada la multiplicidad de los HSFs vegetales.

Alternativamente y de forma no excluyente, los HSFs podrían unirse a los promotores de genes *shsp* que se expresan en embriones de un modo específico, tal vez mediante interacciones con otros factores transcripcionales embrionarios. Se ha descrito que los HSFs interaccionan con el factor TBP (proteína de unión a la caja TATA) en animales (Lis y Wu, 1993 y Mason y Lis, 1997) y en plantas (Reindl y Schöffl, 1998). Sin embargo, se conocen muy pocos ejemplos de interacción entre HSFs y otros factores transcripcionales, excluidos los componentes generales de la maquinaria basal de transcripción, tanto en animales (Kanei-Ishii *et al*, 1997 y Stephanou *et al*, 1999) como en plantas (Rojas *et al*, 1999). En células de vertebrados CV-1 en proliferación, el factor transcripcional c-Myb es capaz de transactivar el gen *hps70*, a través de sus HSEs en ausencia de estrés térmico (Kanei-Ishii *et al*, 1997). El factor c-Myb, sin embargo no interacciona directamente con el ADN de este promotor sino que forma un complejo con el HSF3 y potencia su trimerización, su transporte al núcleo y su unión al ADN (Kanei-Ishii *et al*, 1997). En plantas, se ha demostrado una activación sinérgica del promotor *Ha hsp17.7 G4* por el HSF de tomate Lp HSFA1 y el factor de *Arabidopsis* ABI3 (descrito anteriormente) mediante experimentos de expresión transitoria con embriones de girasol de 21 dpa (Rojas *et al*, 1999). Como en el caso anterior, el factor ABI3 parece que no se une directamente al ADN, sino que actuaría a través de los HSFs como un coactivador.

En este trabajo hemos clonado y caracterizado el gen de girasol *Ha hsp17.6 G1*, que se transcribe durante la fase de desecación de la embriogénesis pero no en respuesta a un choque térmico (figura 10).

Este gen posee en su región promotora un HSE muy imperfecto y distal (figura 4). Como en el caso del gen *Ha hsp17.7 G4*, las mutaciones que alejan su HSE del consenso reducen drásticamente su transcripción durante la desecación de los embriones (figura 17). De esta forma, los resultados obtenidos con los dos genes *shsp* de tipo I de girasol que se expresan durante la embriogénesis zigótica demuestran que los HSEs son necesarios para la transcripción embrionaria y sugieren que los HSFs pudieran participar de forma general en la regulación de los genes *shsp* durante la fase de desecación del embrión en plantas. El gen *Ha hsp17.6 G1* es el único gen conocido con un HSE funcional durante la desecación del embrión pero que no responde a un choque térmico, lo que indica que, al menos para este gen, los mecanismos de regulación a través de HSEs en respuesta a choque térmico y durante el desarrollo embrionario son diferentes.

En el promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* hay otras secuencias en *cis*, además del HSE, necesarias para su expresión embrionaria. Este resultado indica que para activar al promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesaria la acción de factores presentes en embriones que se unan a estos elementos en *cis* y activen su promotor de forma sinérgica con los HSFs implicados. Este es el primer caso que conocemos en el que los HSFs actúan de forma sinérgica con otros factores transcripcionales que se unen directamente al ADN. De este modo, la diferencia en la activación observada para este promotor durante la embriogénesis y en respuesta a un choque térmico se podría deber a la acción sinérgica de los factores que colaboren con los HSFs.



## **II. MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 1. Material biológico.

### 1.1. Genoteca y vectores.

Hemos utilizado una genoteca de bacteriófagos de ADN genómico de girasol construida en el vector  $\lambda$ GEM11 (Promega), descrita en Coca *et al.*, (1996). La genoteca se construyó mediante una digestión parcial del ADN genómico de girasol con el enzima de restricción *Sau 3A*, y se clonó en los brazos del vector  $\lambda$ GEM11 (Promega), en el sitio de corte del enzima *Xho I*, relleno parcialmente con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, de manera que su extremo protuberante resultase compatible con el extremo liberado por *Sau 3A*.

El bacteriófago M13K07 (Vieira y Messing, 1987) se utilizó como bacteriófago auxiliar en la preparación de ADN monocatenario para la secuenciación.

El plásmido pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene Cloning Systems) se usó para la clonación, secuenciación y obtención de sondas de fragmentos de ADN seleccionados.

El plásmido pBI101 (Jefferson *et al.*, 1987), es un derivado del vector binario de *Agrobacterium* pBin19 (Bevan, 1984) diseñado para poder clonar promotores que dirijan la expresión del gen "delator" *gus* y que aporten su propio sitio de inicio de la traducción. Para ello, el plásmido contiene, tras el sitio de clonación múltiple, el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*) de *E. coli* con la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (*nos*). Existen tres versiones pBI101.1, pBI101.2 y pBI101.3, que permiten la obtención de las tres fases de lectura del gen *gus* respecto al sitio de clonación múltiple. Entre las regiones T<sub>i</sub> de movilización de ADN, necesarias para la transformación de las plantas, contiene además del gen *gus*, el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina a las plantas transformadas. Este plásmido se ha utilizado para la preparación de las fusiones traduccionales del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* al gen *gus*.

### 1.2. Bacterias.

En este trabajo utilizamos la estirpe de *E. coli* XL1-Blue para la transformación y la multiplicación de plásmidos. La estirpe XL1-Blue

tiene un genotipo *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* {F'*proAB lacIq ZDM15Tn10(tetR)*} (Bullock *et al.*, 1987). La estirpe de *E. coli* KW251 se utilizó como bacteria hospedadora del fago  $\lambda$ GEM-11 y tiene un genotipo F<sup>-</sup>, *supE44*, *galK22*, *galT22*, *metB1*, *hsdR2*, *mcrB1*, *mcrA*<sup>-</sup>, *argA81:Tn10*, *recD1014* (Frischauf *et al.*, 1983). Ambas bacterias se cultivaron en **medio LB** a 37°C. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio se suplementó con 50 mg/l de ampicilina o 100 mg/l de kanamicina.

La estirpe de *A. tumefaciens* LBA4404 se empleó para la transformación de discos de hoja de tabaco. Esta estirpe contiene plásmidos Cr (críptico), pAL4404 sobre un fondo cromosómico C58-C9 (Hoekema *et al.*, 1983). El cultivo se realizó a 28°C en **medio YEP** suplementado con 250 mg/l de estreptomicina. Las bacterias transformantes se seleccionaron en **medio YEP** suplementado con 100 mg/l de kanamicina.

**Medio LB:** 10 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l NaCl pH 7,0.

**Medio YEP:** 10 g/l bactopectona, 10 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl pH 7,0.

Para preparar medio sólido se añade 15 g/l de agar bacteriológico.

### 1.3. Material vegetal.

#### 1.3.1. Especies vegetales.

Hemos empleado plantas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Sunweed) procedentes de semillas proporcionadas por Rhone-Poulenc Agrochimie y plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de la variedad Xanthi.

#### 1.3.2. Esterilización de semillas y germinación.

Previamente a la germinación, la superficie de las semillas se esterilizó mediante lavados sucesivos en etanol al 70% (1 minuto), en hipoclorito sódico 2% con una gota de Tritón X-100 (30 minutos) y varios enjuagados en agua destilada estéril.

Las semillas esterilizadas de girasol se colocaron sobre papel de filtro autoclavado y saturado con agua destilada estéril y se incubaron a 25°C en oscuridad.

Las semillas esterilizadas de tabaco silvestre se colocaron en cajas Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), y las de las plantas transgénicas en medio MS con kanamicina a 300  $\mu\text{g/ml}$  (MSK). Se incubaron en cámaras de cultivo con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz, 25°C; 8 h de oscuridad, 20°C).

### **1.3.3. Cultivo de plantas.**

Las plantas de girasol y tabaco se cultivaron en macetas con una mezcla 4:1 de turba y perlita. Las plantas se cultivaron con un régimen de 16 horas de luz a 25°C y 8 horas de oscuridad a 20°C, con una humedad relativa constante del 80%.

## **1.4. Tratamientos del material vegetal.**

Las plantas transgénicas de tabaco que iban a someterse a tratamientos de choque térmico se crecieron hasta alcanzar un tamaño de 15 a 20 cm. Al alcanzar dicho tamaño cada planta se cortó en dos mitades, y ambas se cultivaron de forma que regeneraron la raíz o el tallo perdido. De esta forma se obtuvimos dos plantas clónicas: una de ellas se sometió al correspondiente tratamiento y la otra se utilizó como control.

### **1.4.1. Tratamientos con ácido abscísico.**

Las germínulas de girasol de 3 días después de la imbibición (dpi) se transpasaron a cajas de Petri con papeles de filtro estériles saturados en una solución 100  $\mu\text{M}$  de ABA y se incubaron durante 24 horas. Las germínulas control se mantuvieron en las cajas de Petri con papeles de filtro saturados en agua estéril.

### **1.4.2. Tratamientos de estrés hídrico.**

Los experimentos de estrés hídrico con plantas adultas de girasol se realizaron interrumpiendo el riego de 1 a 4 días, mientras que las plantas controles se regaron diariamente.

### **1.4.3. Tratamientos de estrés térmico.**

Regamos las plantas adultas de tabaco y girasol (de unos 25 cm de altura) antes de empezar cada tratamiento. Sometimos las plantas a tratamientos de choque térmico de 42°C durante 2,5 horas en cámaras

iluminadas y con una humedad relativa del 80%. Debido a la alta humedad, los estomas permanecen cerrados y las plantas reducen su transpiración, por lo que la temperatura de las hojas no suele ser inferior a la ambiental. Inmediatamente tras el tratamiento, recogimos muestras de tallo de unos 5 cm situadas a 4 cm del meristemo apical y muestras de hojas de la misma zona y se congeló con nitrógeno líquido.

Los tratamientos de choque térmico en germínulas de girasol de 4 ó 14 dpi se realizaron a la temperatura indicada en cada experimento durante 2,5 horas, en papel de filtro saturado con agua destilada.

Los tratamientos de choque térmico en germínulas de tabaco de 20 dpi se realizaron a 42°C durante 2,5 horas, en la misma caja de Petri donde se germinaron.

## 2. Escrutinio de una genoteca genómica.

Rastreamos la genoteca genómica de girasol en el bacteriófago  $\lambda$ GEM11 descrita en la sección 1.1 para aislar el clon genómico del ADNc Ha hsp17.6 G1 (Almoguera y Jordano, 1992). En cada rastreo sembramos 16 cajas Petri (de 150 mm de diámetro) con unas 30.000 partículas formadoras de calvas de lisis (pfc) sobre un césped de la bacteria hospedadora KW251.

### 2.1. Propagación de los bacteriófagos.

Inoculamos una colonia de *E. coli* KW251 en medio LB suplementado con 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 0.2% de maltosa e incubamos a 37°C hasta alcanzar una D.O.(600 nm) de 0.6. Mezclamos 500  $\mu$ l del cultivo bacteriano con 500  $\mu$ l de una suspensión de bacteriófagos en **tampón SM**, a la concentración adecuada. Para la preadsorción de los bacteriófagos a las bacterias incubamos la mezcla anterior durante 20-30 minutos a 37°C. Luego añadimos 8 ml de **agarosa de cobertera** a 45-50°C y lo extendimos sobre una caja Petri con medio LB con MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Incubamos las cajas a 37°C hasta que las calvas de lisis alcanzaron 0,5-1 mm de diámetro.

Para las sucesivas rondas de purificación de los bacteriófagos recombinantes empleamos cajas de Petri de 90 mm de diámetro. En las sucesivas rondas de purificación los bacteriófagos recombinantes se

van sembrando a una densidad cada vez menor. Seguimos el mismo procedimiento que con las cajas de Petri de 150 mm de diámetro pero mezclamos 200  $\mu$ l de bacterias con 200  $\mu$ l de bacteriófagos y añadimos 3 ml de agarosa de cobertera.

**Tampón SM:** 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

**Agarosa de cobertera:** 0,6% de agarosa en tampón SM.

## 2.2. Transferencia a membranas de nitrocelulosa del ADN de los bacteriófagos.

Tras crecer las calvas de lisis hasta alcanzar el tamaño adecuado, las enfriamos durante 2 horas a 4°C para endurecer la agarosa. Colocamos la membrana de nitrocelulosa sobre el césped bacteriano con los bacteriófagos, evitando la formación de burbujas. Dejamos adsorber los bacteriófagos durante 3 minutos y perforamos los filtros en varios sitios distribuidos asimétricamente. Estas perforaciones permitirán orientar la autorradiografía del filtro correctamente sobre la caja de Petri. Después de la adsorción retiramos los filtros con pinzas, evitando desprender la agarosa.

El ADN adsorbido sobre las membranas se desnaturaliza sumergiendo el filtro en una solución 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl durante 2 minutos. Luego se sumerge 2 minutos en una solución 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl para su neutralización. Finalmente se lava en SSC x 2 al menos 1 minuto y se dejan secar. Una vez secas las membranas se incuban a 80°C durante 2 horas en vacío, con lo que el ADN se fija irreversiblemente a la membrana.

**SSC x 20:** 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0.

## 2.3. Preparación de sondas radiactivas de ADN.

El marcaje *in vitro* de fragmentos de ADN se realizó por el método de cebado al azar descrito por Feinberg y Volgelstein (1983), usando los *kits* comerciales de Boehringer Mannheim o Pharmacia Biotech, según las instrucciones del fabricante. Las moléculas de ADN se marcaron con 25  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. Después del marcaje eliminamos los nucleótidos no incorporados por cromatografía en minicolumnas de Sephadex G-50.

Para el escrutinio de la genoteca genómica marcamos radiativamente un fragmento de ADN correspondiente al ADNc Ha hsp17.6 (descrito en Almoguera y Jordano, 1992).

#### **2.4. Cromatografía en minicolumnas de Sephadex G-50.**

Montamos las minicolumnas en jeringas de 1 ml de volumen, selladas en su extremo inferior con lana de vidrio y rellenas con Sephadex G-50 previamente hidratado y esterilizado. Las minicolumnas se empaquetaron por centrifugación a 1000 g durante 3 minutos y se equilibraron pasando por la minicolumna 100  $\mu$ l de **TE** o **TEN**. Finalmente añadimos la solución de ácidos nucleicos que deseamos purificar a través de la minicolumna centrifugando en las mismas condiciones.

**TE:** 10 mM TrisHCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8.

**TEN:** 10 mM TrisHCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl.

#### **2.5. Hibridación de las membranas con la sonda.**

Hibridamos las membranas con el ADN de los bacteriófagos fijado con la sonda radiactiva del ADNc Ha hsp17.6 G1. En primer lugar las prehibridamos para bloquear los lugares de unión inespecífica de ADN en la membrana. Para ello, incubamos las membranas más de 2 horas en **solución de prehibridación** a 42°C y con agitación suave. Tras la prehibridación, incubamos las membranas en 25 ml/5 filtros de **solución de hibridación** durante 16-20 horas a 42°C, con agitación suave. Lavamos las membranas en volúmenes grandes (200-300 ml) durante períodos de 20 minutos, una vez en SSC x 2; 0.1% SDS y dos en SSC x 0,2; 0,1% SDS, a 45°C y con agitación suave, evitando que se secan. Dejamos secar las membranas lavadas y les expusimos una película autorradiográfica colocada entre pantallas intensificadoras a -80°C durante el tiempo necesario.

**Solución de prehibridación:** 50% formamida; SSPE x 5; solución de Denhardt x 2 y 0,1% SDS.

**Solución de hibridación:** solución de prehibridación a la que se añade la sonda (al menos 500000 cpm/ml de solución) previamente desnaturalizada a 100°C durante 10 minutos.

**SSPE x20:** 3 M NaCl; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,02 M EDTA, pH 7,4.

**Solución de Denhardt x 50:** 1% ficoll; 1% polivinil pirrolidona y 1% seroalbúmina bovina (BSA).

## **2.6. Selección del clon *Ha hsp17.6 G1*.**

Orientamos la autorradiografía del filtro sobre la caja de Petri mediante las perforaciones realizadas en la sección 2.2. Las calvas que coincidían con las señales detectadas en la película autorradiográfica se aislaron de las cajas de Petri recortando con una pipeta Pasteur la superficie del agar. Eluimos los bacteriófagos en 1 ml de tampón SM saturado con cloroformo y los sembramos en cajas de Petri de 90 mm de diámetro, a una densidad de 200-500 pfc por caja. Volvimos a hibridar y a aislar las calvas de lisis que coincidían con las señales de la hibridación. Repetimos la operación, bajando la densidad de bacteriófagos de las cajas hasta que las calvas de lisis que se aíslan contienen un único tipo de bacteriófago.

## **3. Purificación y análisis de ADN.**

### **3.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano.**

Hemos seguido el método de extracción por lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.* (1989).

### **3.2. Purificación de ADN de cadena sencilla.**

En algunos casos hemos utilizado ADN monocatenario como molde para secuenciar insertos de ADN clonados en el plásmido pbSK<sup>+</sup>. Para ello purificamos ADN de una cadena siguiendo el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989), utilizando como bacteriófago auxiliar M13K07.

### **3.3. Purificación de ADN de bacteriófagos.**

Para la purificación de ADN de bacteriófagos hemos seguido el protocolo descrito por Chisholm (1989).

Propagamos los bacteriófagos como se describió en la sección 2.1. Incubamos las cajas Petri a 37°C hasta que las calvas de lisis eran confluyentes. Recogimos los bacteriófagos eluyéndolos durante 2 horas con 7 ml de SM y en agitación suave. Añadimos 100 µl de cloroformo al eluido para lisar las bacterias y NaCl hasta alcanzar la concentración 1 M, y centrifugamos a 13.000 g durante 20 minutos.



Para precipitar los bacteriófagos añadimos PEG hasta la concentración final del 10%, agitamos vigorosamente, incubamos en hielo 1 hora y centrifugamos a 13.000 g durante 20 minutos. Resuspendimos el sedimento en 500  $\mu$ l de SM e hicimos una extracción con un volumen de cloroformo. Añadimos 50  $\mu$ g de ADNasa I y 50  $\mu$ g de ARNasa A a la fase acuosa e incubamos a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente añadimos 20  $\mu$ l de EDTA 0,5 M pH 8; 5  $\mu$ l de SDS al 20% y 25  $\mu$ g de proteinasa K e incubamos a 65°C durante media hora. Hicimos una extracción con fenol:cloroformo y otra con cloroformo. Precipitamos el ADN con isopropanol y tras lavarlo con etanol 70%, lo secamos y resuspendimos en TE. Opcionalmente, el ADN puede purificarse pasándolo a través de una columna de Sephadex G-50.

### 3.4. Purificación de ADN de plantas.

Para la extracción de ADN total de plantas se ha seguido el método de Dellaporta *et al.* (1985).

Trituramos el material vegetal con nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo fino. Por cada 100 mg de material triturado añadimos 120  $\mu$ l de **tampón de extracción** y 10  $\mu$ l de SDS 20% y homogenizamos con ayuda de un émbolo. Incubamos a 65°C durante 15 minutos.

Añadimos 1/4 de volumen de acetato potásico 5 M e incubamos a 0°C durante 20 minutos. Centrifugamos a 15.000 g durante 20 minutos a 0°C y recogimos el sobrenadante. Hicimos extracciones al sobrenadante con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1), hasta que la interfase quedó limpia.

Precipitamos los ácidos nucleicos con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugamos 5 minutos a 13.000 g. Lavamos el precipitado con etanol al 70%, secamos ligeramente y resuspendimos en 100  $\mu$ L de TE con 40  $\mu$ g/ml de ARNasa A. Incubamos a 37°C durante 30 minutos y realizamos una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1).

Precipitamos el ADN añadiendo acetato potásico a pH 5,2 hasta alcanzar una concentración de 0,3 M y dos volúmenes de etanol absoluto e incubando a -20°C durante 10 min. Centrifugamos a 15.000

g y 4°C durante 30 minutos. Lavamos el precipitado de ADN con etanol al 70%, lo secamos y lo resuspendimos en 40 µl de TE.

**Tampón de extracción:** 100 mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM EDTA pH8,0; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercaptoetanol.

### 3.5. Cuantificación del ADN.

Estimamos la concentración del ADN en solución por su absorbancia a 260 nm, asumiendo que  $D.O.(260nm) = 1$  equivale a 50 µg/ml de ADN. Para verificar la concentración del ADN realizamos una comparación en geles de agarosa con muestras de ADN de concentración conocida.

### 3.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Realizadas según se describe en Sambrook *et al.*, 1989.

### 3.7. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa utilizamos los *kits* comerciales: Agarosa Gel DNA Extraction Kit (Boehringer Mannheim, GmbH) y GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia Biotech GmbH), siguiendo estrictamente las indicaciones de los fabricantes.

### 3.8. Análisis de tipo Southern.

Para detectar secuencias específicas entre fragmentos de ADN separados por electroforesis utilizamos esta técnica, descrita originalmente por Southern (1975).

#### 3.8.1. Digestión de los ADNs.

Para los Souterns con ADN de bacteriófagos digerimos 1 µg de ADN con 20 U de un enzima de restricción (HindIII, EcoRI, SacI, SmaI, XbaI o XhoI), en un volumen de 30 µl durante 3 horas. Finalizada la digestión realizamos una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) y precipitamos el ADN digerido con etanol y acetato sódico. Resuspendimos en 20 µl de tampón TE.

Para los Souterns con ADN genómico de planta digerimos entre 15-20  $\mu\text{g}$  de ADN de tabaco con 20 U de enzima de restricción (en este trabajo se utilizó HindIII), en un volumen de 300  $\mu\text{l}$  durante 4 horas. Finalizada la digestión limpiamos y precipitamos el ADN digerido como en el caso anterior y resuspendimos en 40  $\mu\text{l}$  de tampón TE.

Los fragmentos de ADN digerido se separan por electroforesis a 1 V/cm durante 6 horas para el ADN de bacteriófagos y toda la noche para el ADN genómico, en geles de agarosa al 0,8% en TBE x 0,5 con bromuro de etidio (100  $\mu\text{g/l}$ ). Procesamos el gel y transferimos el ADN a un filtro de nylon.

**TBE x 5:** 445 mM Tris-HCl; 445 mM ácido bórico; 10 mM EDTA pH8,0.

### **3.8.2. Transferencia de ADN desde los geles a membranas de nylon.**

Hemos seguido el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989), de transferencia por capilaridad.

En el caso de ADN genómico, tratamos el gel durante 10 minutos con una solución 0,2 N HCl, para hidrolizar los fragmentos de alto peso molecular, facilitando así la transferencia.

Para fijar el ADN al filtro de nylon dejamos secar los filtros con el ADN y los fijamos con radiación ultravioleta durante 4 min por cada cara.

### **3.8.3. Preparación de las sondas de ADN.**

Los filtros con ADN de bacteriófagos se hibridaron con una sonda radiactiva obtenida a partir de un fragmento de ADN correspondiente al ADNc Ha hsp17.6, descrita en la sección 2.3. Los filtros con ADN genómico de plantas se hibridaron con una sonda radiactiva del gen  $\beta$ -glucuronidasa marcada como se describe en la sección 2.3. El ADN utilizado para esta sonda es un fragmento del gen *gus* obtenido mediante restricción del plasmido pBI101 con los enzimas EcoRI y XbaI.

### **3.8.4. Hibridación con sondas radiactivas.**

Bloqueamos los sitios de unión inespecífica presentes en el filtro bañándolo en un gran volumen de **solución de prehibridación** durante 2 horas a 42°C (al menos 6 horas para los filtros con ADN genómico de plantas). Retiramos la solución y añadimos solución de prehibridación con la sonda radiactiva (aproximadamente 500.000 cpm/ml), previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 100°C. Incubamos a la misma temperatura durante 4 o 6 horas (12-18 horas para ADN genómico de plantas). La incubación con la sonda se lleva a cabo en recipientes de plástico, herméticamente cerrados, usando el mínimo volumen de solución de hibridación que asegure que la membrana permanece constantemente humedecida.

**Solución de prehibridación:** 50% formamida, SSPE x 5, Denhardt 5 x, 0,1% SDS.

### **3.8.5. Lavado de los filtros hibridados.**

Después de la hibridación lavamos la membrana en condiciones muy restrictivas: dos veces durante 20 minutos en SSPE x 1; 0,1% SDS a 45°C, y dos veces en SSPE x 0,1; 0,1% a 65°C. Una vez lavada, la envolvimos en plástico y la expusimos a películas autorradiográficas con pantallas intensificadoras a -80°C.

## **4. Manipulación enzimática del ADN.**

En general hemos seguido los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

### **4.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.**

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron siempre en los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Las manipulaciones posteriores de los productos de la digestión se realizaron tras fenolizar y precipitar el ADN añadiendo acetato sódico hasta 0,3 M y 2-3 volúmenes de etanol e incubando a -20°C durante 30 minutos. Tras centrifugar durante 15 minutos en una microcentrífuga, lavamos el sedimento con etanol al 70%, secamos y resuspendimos en TE.

### **4.2. Defosforilación de extremos 5'.**

Mediante este procedimiento se eliminan los grupos fosfatos en los extremos 5' de los plásmidos que utilizamos como vectores de clonación, con el objetivo de evitar su religamiento.

Después precipitar el ADN digerido con la enzima de restricción adecuada, lo se resuspendimos en Tris-HCl pH 8,3, y añadimos 1/10 del volumen de tampón x 10 para fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim). A continuación, se añade 1-2 U de fosfatasa alcalina e incubamos a 37°C durante 30 minutos. Inactivamos la fosfatasa alcalina añadiendo EDTA hasta 5 mM e incubando a 75°C durante 10 minutos. Posteriormente, realizamos una extracción del ADN con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1), lo precipitamos y lo resuspendimos en TE.

#### **4.3. Generación de extremos romos de ADN.**

Estos métodos se utilizan para permitir la posterior ligación de fragmentos de ADN generados con distintas enzimas de restricción, que producen extremos incompatibles.

Para hacer romos los extremos 5' protuberantes recurrimos al relleno del extremo 3' no protuberante con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989).

Para los extremos 3' protuberantes usamos la ADN polimerasa del bacteriófago T4, que posee una fuerte actividad exonucleasa 3'→5' en ADN monocatenario (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **4.4. Ligación de moléculas de ADN.**

Digerimos previamente el ADN con las enzimas de restricción adecuadas y desfosforilamos los extremos 5' del vector en los casos en los que podía haber religación.

La mezcla de reacción contiene tampón de ligasa x 1, 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 y los fragmentos de ADN a ligar, en un volumen máximo de 20 µl. La relación molar del inserto respecto al vector es de dos. Las ligaciones de extremos cohesivos se incuban a 16°C durante 5 horas; para las de extremos romos incubamos a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Pasado este tiempo,

transformamos células competentes de *E. coli* con la mezcla de ligación sin modificaciones adicionales.

## 5. Transformación de bacterias.

La introducción de ADN en bacterias requiere el tratamiento previo de las células para hacerlas competentes. Las células competentes son transformadas con el ADN adecuado y las células transformantes se seleccionan sembrándolas en un medio con los antibióticos apropiados.

### 5.1. Preparación de células competentes de *E. coli*. Método del RbCl (Hanahan, 1983).

Inoculamos 5 ml de **medio ¥** con una colonia de la estirpe apropiada y lo cultivamos a 37°C hasta alcanzar una D.O. 600nm de 0,3. Con este precultivo, inoculamos 100 ml de medio ¥, precalentado a 37°C, e incubamos con agitación vigorosa (300-350 rpm) hasta una D.O. 600nm de 0,5.

Enfriamos el cultivo en hielo y recogemos las células centrifugando a 2.500 g durante 5 minutos a 4°C. Resuspendimos las células en 30 ml de **solución TFB1** a 0°C y centrifugamos como antes. Resuspendemos las células en 4 ml de **solución TFB2** a 0°C con suavidad y hacemos alícuotas de 0,2 ml que se congelan a -80°C hasta su uso.

**Solución TFB1:** 100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM acetato potásico; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol. El pH se ajusta a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M. Se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C.

**Solución TFB2:** 10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol. Se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C.

**Medio ¥:** 2% bactotripton; 0,5% extracto de levadura; 15 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM KCl. Se ajusta el pH a 7,6 con KOH.

### 5.2. Transformación de *E. coli*.

Añadimos aproximadamente 10 ng de ADN (en un volumen menor de 20 µl), a 200 µl de células competentes e incubamos 20 minutos en hielo, 90 segundos a 42°C y enfriamos inmediatamente con hielo. Añadimos 1 ml de medio LB, incubamos a 37°C durante 1 hora y

extendemos las células en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

### **5.3. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* (Holsters *et al*, 1978).**

Inoculamos 5 ml de medio YEP con una colonia de la estirpe de *A. tumefaciens* apropiada e incubamos a 28°C durante una noche. Utilizamos 2 ml de este cultivo para inocular 80 ml de medio YEP, y lo cultivamos a 28°C hasta una D.O.  $600_{nm}$  entre 0,5 y 1.

Recogemos las células por centrifugación a 3000 g y 4°C durante 10 minutos y las resuspendemos en 1,6 mL de 20 mM CaCl<sub>2</sub> a 0°C. Hacemos alícuotas de 100 µl y las congelamos a -80°C o las usamos inmediatamente.

### **5.4. Transformación de *A. tumefaciens*.**

Añade al menos 1 µg de ADN plasmídico (en un volumen menor de 10 µl) 100 µl de células competentes y las congelamos en nitrógeno líquido. Descongelamos a 37°C durante 5 minutos, y añadimos 1 ml de medio YEP. Incubamos a 28°C con agitación suave durante 3 horas y extendemos las células en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

## **6. Secuenciación de ADN.**

### **6.1. Reacciones de secuenciación.**

Para secuenciar moléculas de ADN seguimos el método basado originalmente en el uso de dideoxinucleótidos que producen paradas al azar en una reacción de polimerización de ADN (Sanger *et al*, 1982).

Realizamos reacciones de secuenciación con ADN monocatenario o bicatenario obtenidos a partir de insertos de ADN clonados en el plásmido pSK<sup>+</sup> o con ADN bicatenario de insertos de ADN clonados en el plásmido pBI101. Para la secuenciación de insertos clonados en el plásmido pSK<sup>+</sup> usamos los cebadores SK (5'-TCTAGAAGTGGATC-3'), KS (5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'), T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') y T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3'), que aparean con secuencias del vector situadas a ambos lados del sitio de clonación múltiple. Para la secuenciación de insertos clonados en el plásmido pBI101 usamos el

cebador GUSIII (5'-ACGCGCTTTCCACCAACGCTG-3'), que aparee con secuencias del gen *gus* contenido en el vector desde la posición +115 a la +94 respecto de su ATG.

Los ADNs moldes para secuenciar se obtuvieron por los métodos descritos en el sección 3, se limpian por cromatografía en columnas de Sephadex G-50 (sección 2.4), se precipitan y se resuspenden en TE. Para cada reacción con ADN bicatenario usamos 5  $\mu$ g de ADN que desnaturalizamos con NaOH 1N en presencia del cebador y neutralizamos con HCl 1N para que aparease el cebador y el ADN.

Para las reacciones de secuenciación utilizamos el *kit* de USB (Sequenase version 2.0) siguiendo los protocolos del fabricante. Marcamos las moléculas de ADN sintetizadas con [ $\alpha^{35}$ S]-dATP, o con [ $\alpha^{33}$ P]-dATP (Amersham).

### **6.2. Electroforesis con geles de poliacrilamida.**

Los productos de la reacción de secuenciación se resolvieron en geles al 4% o al 6% 8 M de acrilamida/bisacrilamida (19:1); urea 8 M; TBE x 1; APS 0,05% y TEMED 0,5  $\mu$ l/ml.

Montamos los geles entre dos placas de vidrio, lavadas cuidadosamente y tratadas con alcohol, de 20 x 50 cm con un gradiente de grosor de 0,2 a 0,4 mm. Una de las placas fue tratada además con Repel-silane (Pharmacia Biotech). Los pocillos se formaron con peines de "dientes de tiburón" de 0,2 mm de grosor. Realizamos la electroforesis a 2750 V, en tampón TBE x 1. Para controlar la migración de los fragmentos generados en la reacción de secuenciación, se adicionan los colorantes azul de bromofenol y xilencianol.

Terminada la electroforesis, separamos las placas y adsorbimos el gel a una hoja de papel Whatman 3MM. A continuación fijamos el gel en una solución 10% ácido acético y 10% de metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente y lo secamos y expusimos a una película autorradiográfica a temperatura ambiente.

### **6.3. Análisis de secuencias asistido por ordenador.**



Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984), ejecutados en un ordenador del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA). Realizamos comparaciones de secuencia con los programas FASTA y BESTFIT.

## 7. Purificación de ARN.

### 7.1. Preparación de ARN total de tejidos vegetales.

Seguimos fundamentalmente el protocolo descrito en (Hall *et al.*, 1978), con ligeras modificaciones.

Trituramos el material en nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo fino y añadimos **tampón de extracción** (300  $\mu$ l/100 mg de material) a 100°C y proteinasa K hasta 0,5 mg/ml. Incubamos la mezcla 1 hora a 37°C en suave agitación. Añadimos KCl hasta una concentración final 50 mM e incubamos 15 minutos en hielo. Centrifugamos 15 minutos a 13.000 g y añadimos LiCl al sobrenadante hasta una concentración final de 2 M. Incubamos a 4°C al menos 2 horas, precipitando así el ARN de forma selectiva. Tras centrifugar 20 minutos a 13.000 g lavamos el sedimento con LiCl 2 M y resuspendimos el precipitado en acetato sódico 0,2 M, retirando el material insoluble (polisacáridos) mediante centrifugación. Realizamos una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) y precipitamos con 2,5 volúmenes de etanol. Finalmente resuspendimos en H<sub>2</sub>O-DEPC estéril y guardamos el ARN extraído a -80°C hasta su uso.

**Tampón de extracción:** 200 mM Tris-HCl pH 9,0; 400 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% SDS.

Nota: para evitar la contaminación con ARNasas, todas las soluciones contienen 0,1% DEPC, el material de plástico se autoclava dos veces y se utilizan guantes en todas las manipulaciones.

### 7.2. Cuantificación de ARN.

La concentración de ARN en soluciones se estima a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que D.O.  $_{260\text{nm}} = 1$  equivale a 40  $\mu$ g/ml de ARN. Para verificar la concentración, las muestras de ARN se comparan en geles de agarosa con otras muestras de concentración conocida.

### 7.3. Electroforesis desnaturalizante de ARN.

Para cuantificar el ARN realizamos electroforesis en geles de agarosa en presencia de formaldehído. Preparamos las muestras de ARN en una solución de **tampón MOPS x 1**; 7% formaldehído y 50% formamida las desnaturalizamos a 65°C durante 15 minutos y les añadimos 0,1 volúmenes de **tampón de carga x 10**. Preparamos geles al 1% de agarosa; MOPS x 1; formaldehído 7% y realizamos la electroforesis en tampón MOPS x 1, aplicando 8 V/cm hasta que el azul de bromofenol recorre las 3/4 partes del gel.

**Tampón MOPS x 10:** 0,2 M MOPS; 80 mM acetato sódico; 10 mM EDTA. Se ajusta a pH 7 con NaOH.

**Tampón de carga x 10:** 50% glicerol; 1 mM EDTA pH 8; 0,25% azul de bromofenol.

### 8. Protección frente a la digestión con ARNasa A.

Con esta técnica podemos detectar, dentro de una población compleja de ARNs, aquél cuya secuencia es totalmente idéntica a la de la ribosonda empleada.

Para ello, hibridamos el extracto de ARN total con la ribosonda radiactiva deseada. Posteriormente, tratamos con ARNasa A, enzima que sólo digiere ARN de cadena sencilla, de forma que los híbridos perfectos ARN/ARN quedan protegidos de la acción enzimática. La hibridación se debe hacer de forma que siempre haya exceso de la ribosonda y hay que optimizar la temperatura de hibridación para estar seguros de que la hibridación de la ribosonda con el ARN correspondiente es completa. Igualmente hay que asegurarse de que la digestión con la ARNasa A es total.

#### 8.1. Preparación de la ribosonda.

Las ribosondas se preparan por transcripción *in vitro* de un ADN en presencia de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-CTP. El ADN se clona en el plásmido pBluescript SK<sup>+</sup> para aprovechar las secuencias promotoras para las ARN polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7 que flanquean su sitio de clonación múltiple.

##### 8.1.1. Transcripción *in vitro*.

En este trabajo realizamos ribosondas de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4*. En el caso del gen *Ha hsp17.6 G1* sintetizamos, a partir del plásmido pSK G1 Sac-Sma (figura 1), una ribosonda de 813 nt que incluye, además de 55 nt procedentes del vector, las secuencias de la hebra no codificante de dicho gen entre los sitios -533 y +225. En el caso del gen *Ha hsp17.7 G4* sintetizamos una ribosonda de 651 nt que incluye 86 nt procedentes del vector y las secuencias de la hebra no codificante de dicho gen entre los sitios -188 y +399 (descrito en Coca *et al*, 1996).

Linearizamos los plásmidos con un enzima de restricción que corta en el extremo del fragmento a marcar para que la transcripción se interrumpa en ese punto (Xho I en el caso del gen *Ha hsp17.6 G1*). Posteriormente realizamos una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1), precipitamos con 0,1 volumen de acetato sódico 3 M y 2 de etanol y lo resuspendemos el precipitado en H<sub>2</sub>O-DEPC hasta una concentración final 0,3 mg/ml.

Mezclamos a temperatura ambiente 6,5 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC; 2 µl de tampón de transcripción x 10 (Boehringer Mannheim); 2 µl de DTT 0,1 M; 24 U de inhibidor de ARNasas (RNase guard®, Pharmacia); 2 µl de una mezcla 10 mM ATP, 10 mM GTP y 10 mM UTP; 1 µl de una solución 0,2 mM CTP; 0,6 µg de ADN del plásmido linearizado; 2,5 µl de [ $\alpha^{32}$ P]-CTP (50 µCi); 10 U de la ARN polimerasa adecuada (Boehringer Mannheim).

Incubamos a 37°C durante una hora. Añadimos 1 µg de ADNasa (libre de ARNasas) e incubamos a 37°C durante 30 minutos para eliminar el ADN. Interrumpimos esta reacción añadiendo 2 µl EDTA 0,5 M pH 8 y 77 µl TEN.

**TEN:** 10 mM TrisHCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl.

### 8.1.2. Purificación de la ribosonda.

Para separar los nucleótidos no incorporados, realizamos una cromatografía en una columna Sephadex G-50 previamente equilibrada en TEN.

Precipitamos la sonda añadiendo 20 µg de ARNt de levadura, acetato sódico hasta 0,3 M y 2 volúmenes de etanol. Incubamos

durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifugamos a 15.000 G durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , secamos el precipitado y lo resuspendimos en 30  $\mu\text{l}$  de **FBL**.

Los fragmentos marcados se separan por tamaño mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, descritos en la sección 6.2. Montamos los geles sobre dos placas de vidrio de 20 x 18 cm con separadores de 1 mm de grosor.

Inmediatamente antes de cargar la sonda en el gel, calentamos la sonda a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. Efectuamos la electroforesis a 250 V hasta que la ribosonda alcance la altura deseada. Entonces separamos una de las placas, envolvemos el gel con papel de plástico y lo exponemos a una película autorradiográfica durante 4 minutos. Para orientar correctamente la película autorradiográfica, colocamos asimétricamente sobre el plástico tres trozos de cinta adhesiva y taladramos tanto la película como la cinta. Una vez localizada sobre la autorradiografía la banda de tamaño adecuado, superponemos las marcas de la película y las de la cinta y recortamos y troceamos la zona del gel donde se halla la ribosonda.

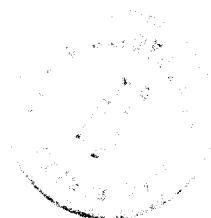
Eluimos la ribosonda en 380  $\mu\text{l}$  de una solución 2 M acetato amónico/0,1 % SDS durante una noche a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación. Eliminamos la acrilamida mediante pulsos de centrifugación y precipitamos la sonda añadiendo 30  $\mu\text{g}$  de ARNt y 900  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto. Tras incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos centrifugamos 15 minutos a 13.000 G, lavamos con etanol 70% y dejamos secar al vacío. Resuspendemos en 25-30  $\mu\text{l}$  de **solución de hibridación** y cuantificamos 1  $\mu\text{l}$  en un contador de centelleo.

**FBL:** 0,1% SDS; 10 mM Tris-HCl pH 7; 97% formamida; 1 mg/ml xilencianol; 1 mg/ml azul de bromofenol.

**Solución de hibridación:** formamida 80%; NaCl 0,4 M; EDTA 1 mM y 40 mM PIPES pH 6,7. Se guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 8.2. Hibridaciones.

Mezclamos 30  $\mu\text{g}$  de ARN total con  $5 \times 10^5$  c.p.m. de ribosonda y 53  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación y lo completamos con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC hasta 60  $\mu\text{l}$ . Para desnaturalizar el ARN calentamos la muestra a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. Dejamos hibridar a  $48^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas.



### 8.3. Digestiones con ARNasa A.

Añadimos 600  $\mu$ l de **tampón de digestión** a la hibridación e incubamos a 30°C durante 30 o 60 min (en este trabajo hemos comprobado que a los 30 min la digestión era total). Para parar la reacción tomamos 330  $\mu$ l de la digestión, añadimos 20  $\mu$ l de SDS 10% y 5  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) e incubamos a 37°C durante 15 minutos. Añadimos 3  $\mu$ l de ARNt (10 mg/ml) e hicimos una extracción con fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) para eliminar las proteínas. Precipitamos el ARN con 2 volúmenes de etanol durante 30 minutos a -70°C y centrifugando después. Finalmente lavamos con etanol absoluto, secamos y resuspendemos en 30  $\mu$ l de FBL.

**Tampón de digestión:** 75  $\mu$ g/ml ARNasa A; 10 mM Tris-HCl pH7,5; 5 mM EDTA pH 8; 300 mM NaCl. Se prepara inmediatamente antes de su uso.

### 8.4. Electroforesis.

El fragmento protegido se resuelve en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (descritos en la sección 8.1.2). Tras la electroforesis colocamos el gel sobre papel Whatman 3MM, lo secamos y lo expusimos a una película autorradiográfica. Para determinar los sitios de iniciación de la transcripción, también resolvemos los productos de la digestión con ARNasaA en geles de secuenciación de poliacrilamida (descritos en la sección 8.1.2) junto con una reacción de secuenciación.

Como marcadores de peso molecular utilizamos la escalera de fragmentos de ADN pBR322/HpaII marcados con  $^{32}$ P. Para ello, digerimos el vector pBR322 con el enzima de restricción HpaII y rellenamos el extremo de ADN protuberante con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E.coli*, utilizando como nucleótidos dGTP y [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP.

### 9. Extensión del cebador (*primer extension*).

Esta técnica permite determinar el extremo 5' de un transcrito de ARN, conociendo parte de su secuencia. La técnica se basa en la capacidad de la retrotranscriptasa de sintetizar una cadena de ADN utilizando como molde una cadena de ARN, hasta llegar a su extremo

5'. Para ello se utiliza como cebador de la enzima un oligonucleótido marcado radiactivamente, complementario de una región del ARN que queremos copiar. El fragmento de ADN sintetizado se analiza en un gen de poliacrilamida junto con una reacción de secuencia del ADN correspondiente al ARN en estudio, que utiliza como cebador el mismo oligonucleótido. De esta forma podemos determinar el nucleótido donde se inicia la transcripción.

### 9.1. Marcaje del oligonucleótido.

El oligonucleótido empleado en este trabajo tiene la secuencia: 5'-GCGCGGGTTCGGTGGAGATGATCCC-3', e hibrida con la secuencia del gen *Ha hsp17.6 G1* entre las posiciones +109 y +85 (a partir del ATG).

Marcamos el oligonucleótido radiactivamente en su extremo 5' por la acción de la enzima polinucleótido kinasa. Para ello mezclamos 0,8 µl del oligonucleótido (20 ng); 0,6 µl Tris-HCl 0,5 M pH 8; 0,5 µl MgCl<sub>2</sub> 120 mM; 1,5 µl DTT 20 mM; 3 µl [ $\gamma$  <sup>32</sup> P]-ATP (30 µCi) y 0,8 µl de polinucleótido kinasa (7,5 U). Incubamos a 37°C durante 30 minutos e inactivamos la enzima por calor, incubando la mezcla de reacción durante 10 minutos a 65°C.

### 9.2. Hibridación del ARN con el cebador.

Para hibridar el oligonucleótido marcado con el ARN correspondiente mezclamos 1,5 µl del oligonucleótido marcado (4 ng); 1,6 µl KCl 2 M; 1,3 µl Tris-HCl 100 mM pH 8,3 y 9,5 µl de ARN total (25 µg). Desnaturalizamos la mezcla a 85°C durante 3 minutos y después incubamos una hora a la temperatura de hibridación (en este caso a 65°C).

### 9.3. Reacción de la retrotranscriptasa.

Mezclamos 3 µl del híbrido oligonucleótido:ARN obtenido en la sección anterior con 5 µl de tampón de retrotranscriptasa 2 x (Pharmacia Biotech); 1 µl H<sub>2</sub>O y 1 µl (200 U) de retrotranscriptasa AMV (Pharmacia Biotech). Incubamos a 42°C durante 90 minutos.

Para parar la reacción añadimos a la mezcla 0,5 µl EDTA 0,5 M pH 8 y 0,5 µl ARNasa A (2,5 µg) e incubamos a 37°C durante 30 minutos. Añadimos 170 µl de TEN e hicimos una extracción con fenol:

cloroformo:IAA (25:24:1). Precipitamos el ADNc obtenido incubando con etanol absoluto durante una hora a 0°C. Centrifugamos 15 minutos a 13.000 G, lavamos con etanol al 70%. Finalmente resuspendimos en 4 µl de FBL.

#### **9.4. Resolución en gel de secuenciación.**

Realizamos reacciones de secuenciación (descritas en la sección 6.1) de un fragmento de ADN genómico que comprende el posible inicio de transcripción (plásmido pSK G1 EcoRI 3.9, figura 1) con el mismo oligonucleótido empleado, sin marcar. Es conveniente hacer las reacciones con un deoxinucleótido trifosfato marcado con  $^{32}\text{P}$  en vez de  $^{35}\text{S}$ , para que el tiempo y las condiciones de exposición requeridos serán similares para la escalera de secuencia y para el ADNc obtenido. Cargamos 4 µl del ADNc obtenido, en un gel de secuenciación al 6% (descrito en la sección 6.2) junto a la escalera de secuencia, después de desnaturalizar las muestras 3 minutos a 85°C.

#### **10. Experimentos de transcripción *in vitro* con núcleos aislados (*run on*).**

Esta técnica se utiliza para determinar la transcripción de ARNm determinados. Para ello se extraen núcleos del tejido deseado en condiciones que minimicen la transcripción y permitan que la ARN polimerasa permanezca unida al ADN. Posteriormente se favorece la continuación de la transcripción en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ . De esta forma, los ARNm que se estaban sintetizando al comenzar la extracción quedan marcados radiactivamente. Tras purificar los ARNs sintetizados, se hibridan con filtros con sondas específicas para los ARNm que tratamos de detectar y los detectamos mediante autorradiografías.

##### **10.1. Purificación de los núcleos.**

En este trabajo extrajimos núcleos de embriones zigóticos de 20 a 24 dpa y de germínulas de 14 dpi sometidas o no a choque térmico. Para ello seguimos el procedimiento (método II) descrito en Luthe y Quatrano (1980) con algunas modificaciones.

Recogimos entre 7 y 10 g de material, lo troceamos y lo dejamos en éter 4 min a 0°C. Retiramos todo el éter y añadimos 50 ml de **tampón Honda** a 0°C. Trituramos el material en un mortero y lo

filtramos por una gasa. Centrifugamos el líquido obtenido (todas las centrifugaciones de la extracción se realizan en un rotor basculante) durante 8 min a 2500 G, a 4°C y retiramos el sobrenadante. Resuspendimos el precipitado en un total de 5 ml de tampón Honda a 0°C, con ayuda de un pincel de pelo de camello.

Cargamos los núcleos resuspendidos en gradientes de **solución de Percoll®** (2 M sacarosa / 80% Percoll / 60% Percoll / 40% Percoll) y centrifugamos durante 30 min a 4080 G, a 4°C. Recogemos la banda con los núcleos (situados entre el tampón 2 M sacarosa y la solución al 80% de Percoll) y le añadimos 10 ml de tampón Honda a 0°C. Centrifugamos los núcleos durante 8 min a 2500 G y a 4°C y retiramos el sobrenadante. Añadimos otros 10 ml de tampón Honda a 0°C y resuspendimos con el pincel. Volvimos a centrifugar y a retirar todo el sobrenadante. Resuspendimos los núcleos en 5 ml de **NRB** a 0°C y centrifugamos 8 min 4000 G, a 4°C. Finalmente, retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 500 µl de NRB a 0°C. Los núcleos se congelan rápidamente a -80°C y se guardan hasta su uso.

**Tampón Honda:** 0,44 M sacarosa; 2,5 % Ficoll® 400 (Pharmacia); 5 % Dextran T40 (Pharmacia); 25 mM Tris HCl pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 % Tritón X-100 y 10 mM β-mercaptoetanol.

**Soluciones de Percoll:** 0,44 M sacarosa; 25 mM Tris HCl pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub> y Percoll® (Pharmacia) al porcentaje indicado.

**NRB:** 50 mM Tris HCl pH 8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM β-mercaptoetanol y glicerol al 20%.

## 10.2. Cuantificación del ADN de la solución de núcleos.

Partimos de dos alícuotas de 10 µl que tratamos en paralelo. Añadimos 290 µl de TE 10:1 pH 8; 100 µl de **solución de lisis** y 2 µl de ARNasa A a 10 mg/ml e incubamos 1 hora a temperatura ambiente. Añadimos 10 µl de proteinasa K a 10 mg/ml e incubamos 1 hora a 37°C. Realizamos una extracción con fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) y otra con cloroformo:IAA (24:1) y precipitamos con 2 volúmenes de etanol absoluto centrifugando 10 min a 15.000 G. Resuspendimos el ADN en 500 µl de TE 1:0.1 pH 8 y medimos la absorbancia a 280 y 260 nm.

**Solución de lisis:** 0,2 M Tris-CIH pH 8; 2 M ClNa; 100 mM EDTA; 2% lauroil sarcosina.



### 10.3. Reacción de transcripción y purificación de los ARN.

En este trabajo seguimos el procedimiento descrito en (Mittler y Zilinskas, 1994) con algunas modificaciones.

Precipitamos los núcleos (unos 110  $\mu$ g de ADN de núcleos), centrifugando durante 8 min a 4000 G, a 4°C. Retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 30  $\mu$ l y añadimos 50  $\mu$ l de **tampón de transcripción**; 3,8  $\mu$ l de RNase guard<sup>®</sup> (Pharmacia) (150 u); 0,5  $\mu$ l de cada nucleótido ATP, CTP, GTP 100 mM; 1  $\mu$ l DTT 100 mM y 7,5  $\mu$ l <sup>32</sup>P-UTP.10 mCi/ml. Se incuba durante 20 min a 25°C.

La reacción se detiene añadiendo 6  $\mu$ l de DNaseI BRL (800 u); 4,5  $\mu$ l Cl<sub>2</sub>Ca 100 mM y 2  $\mu$ l de ARNt 10 mg/ml. Se agita fuertemente y se incuba 45 min a 37°C. Rompemos las células añadiendo 110  $\mu$ l de **tampón de lisis** y 11  $\mu$ l proteinasa K 10 mg/ml. Se agita vigorosamente y se incuba 30 min a 37°C. Tras la incubación añadimos 1,75 ml de 0.5% SDS y 2 ml de fenol, agitamos y centrifugamos 5 min a 2500 G, a temperatura ambiente. Realizamos otra extracción con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y precipitamos el DNA. Para ello añadimos 4 ml de 100% etanol y dejamos 1 hora a -80°C. Centrifugamos 10 min a 4°C y 12000 g y retiramos el sobrenadante.

Resuspendimos el ARN en 100  $\mu$ l de **STE** y añadimos 3,8  $\mu$ l de RNase guard<sup>®</sup> (Pharmacia) (150 u). Purificamos la solución a través de una minicolumna de Sephadex G-50 equilibrada en STE y dejamos en hielo hasta la hibridación.

**Tampón de transcripción:** 100 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 0,9 mM KCl; 2 mM MnCl<sub>2</sub>; 24% de glicerol.

**Tampón de lisis:** 0,1 M Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA; 1 M NaCl; 2% sarcosina de sodio.

**STE:** 10 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA.

### 10.4. Preparación de los filtros para la hibridación.

Los ARN obtenidos en la sección anterior se hibridaron con filtros que contenían fragmentos de ADN que hibridan específicamente con los genes *Ha hsp17.6 G1*, *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2* y el ADNc *Ha ubiS*. Estos fragmentos contienen las secuencias del gen *Ha hsp17.6 G1* entre los sitios de restricción de Dde I (+1442) y Xba I (+1699), del gen

*Ha hsp18.6 G2* entre Hinc II (+1486) y Cla I (+1762), del gen *Ha hsp17.7 G4* entre Sac I (+1399) y Hind III (+1683) y del ADNc *Ha ubiS* entre las posiciones +127 y +1069.

Los fragmentos de ADN de los genes *Ha hsp17.6 G1*, *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2* estaban clonados en los sitios de restricción correspondientes del sitio de clonación múltiple del vector pBluescript SK<sup>+</sup>. El fragmento de ADN del ADNc *Ha ubiS* está clonado en el vector pBluescript SK<sup>+</sup>, como se describe en Almoguera *et al* (1995). Para obtener los fragmentos de ADN realizamos digestiones con enzimas que liberan los insertos de su correspondiente vector. Digerimos 40 µg de los tres primeros plásmidos y 9,2 µg del plásmido del ADNc de la ubiquitina. Realizamos una extracción con fenol:cloroformo:IAA (25:24:1), precipitamos los ADNs y resuspendimos en 40 ml de TE 1:0,1.

Realizamos una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en 0,5 x TBE a 50 V con 10 µg de la digestión de los tres primeros plásmidos (0,8 µg de inserto) y con 2,3 µg para el último (0,6 µg de inserto). Tras la electroforesis recortamos la zona del gen que contiene los fragmentos de ADN liberados del vector pBluescript SK<sup>+</sup> y los transferimos a un filtro de nylon (descrito en la sección 3.8.2.).

### 10.5. Hibridación y detección.

Prehibridamos los filtros en una caja de Petri de 5 cm de diámetro con 5 ml de solución de prehibridación, a 45°C y agitación durante unas 7 horas.

Desnaturalizamos toda la sonda de ARN obtenida en la sección 10.2 calentándola a 85°C durante 10 min y colocándola en hielo. Añadimos 1,3 ml de la solución de prehibridación para obtener la solución de hibridación. Incubamos los filtros prehibridados con la solución de hibridación durante unas 50 horas a 45°C en agitación.

Tras la hibridación lavamos el filtro dos veces en 50 ml de una solución 1 x SSPE y 0,1% SDS durante 10 min a 45°C y en agitación. Realizamos otro lavado en 50 ml de solución 1 x SSPE y 0,1% SDS de 15 min a 65°C y en agitación. Envolvimos el filtro en film transparente y lo expusimos con una autoradiografía a -80°C.

**Solución de prehibridación:** 50% formamida; 5 x SSPE; 5% solución de Denhardt; 1% SDS; 25 mg/ml de ARNt.

## 11. Experimentos de retardo de bandas.

### 11.1. Preparación de los fragmentos de ADN.

En este trabajo realizamos experimentos de retardo de bandas con fragmentos de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* desde la posición -126 a la posición +50, que incluye su HSE (tanto en la versión silvestre como en la versión mutada pHSE, descrita en la sección 12 y en la figura 16) y un fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.7 G4* desde la posición -188 a la posición +80 que también incluye sus HSEs. Los fragmentos de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* con las versiones silvestre y mutada del HSE se obtuvieron respectivamente mediante digestión de los plásmidos pSK G1 HdIII 0.17 (figura 1) y pSK G1(m) Xho-Sty::GUS (descrito en la sección 12.4) con la enzima Hind III. El fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.7 G4* se obtuvo como se describe en Almoguera *et al* (1998). Los fragmentos de ADN se marcaron rellenando sus extremos cohesivos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, utilizando para ello el nucleótido marcado [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP.

Para los experimentos de competición utilizamos los mismos fragmentos sin marcar radiactivamente y un oligonucleótido sintético de doble cadena con HSEs (descrito en Hübel y Schöffl, 1994). Como control negativo utilizamos un fragmento de ADN de 445 pb del vector pBluescript SK<sup>+</sup> purificado tras digerir con Pvu II.

### 11.2. Reacción de unión del hHSF1 a los fragmentos de ADN.

Las reacciones de unión tienen lugar durante 15 minutos, a 20°C, en 12  $\mu$ l tampón 10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,05 mM EDTA; 120 mM NaCl y 6% de glicerol. Para las reacciones mostradas en la figura 5 cada reacción llevaba 1 ng de fragmento marcado; 1,8  $\mu$ g de poli(dI-dC) (Pharmacia Biotech Inc.) y 2  $\mu$ g de un extracto de proteínas obtenido de células de *E. coli* BL21 que expresan el HSF1 humano a partir del plásmido pHu HSFM1 (Rabindram *et al*, 1991). Las reacciones mostradas en la figura 16 se diferencian en que cada reacción llevaba 4  $\mu$ g de poli(dI-dC) y cantidades crecientes del extracto de proteínas obtenido (indicado en la figura).

Para los experimentos de competición añadimos en cada reacción un exceso 50 veces molar del fragmento de ADN competidor respecto al fragmento marcado radiactivamente.

### **11.3. Electroforesis y detección.**

Tras la reacción de unión se añade 1  $\mu$ l de tampón LB y se carga todo en un gel al 1,2% de agarosa en TBE 0,5 x, sin bromuro de etidio. La electroforesis se realiza en tampón TBE 0,5 x a 80V hasta que el azul de bromofenol ha avanzado 4,5 cm. Secamos el gen entre papel de filtro durante 1 hora y en un secador de geles durante otra hora. Una vez seco exponemos la película autorradiográfica.

### **12. Mutagénesis dirigida por PCR.**

En este trabajo hemos realizado dos mutagénesis dirigidas mediante PCR para modificar la secuencia del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*. Para ello hemos empleado el método del "megaprimer" descrito por Chen y Przybyla (1994). En este método se usan dos oligonucleótidos (P1 y P2) que flanquean el sitio que se desea mutar, y un tercer oligonucleótido que es el que contiene las mutaciones que se desean introducir. Para la amplificación se utiliza la *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene), por su baja tasa de error y porque no tiene actividad transferasa terminal. Se realizan dos reacciones de PCR. En la primera se emplean el oligonucleótido que introduce las mutaciones y uno de los que flanquean el sitio a mutar (P1). El producto de esta PCR es un "megaprimer", que junto con el otro oligonucleótido que flanquea el sitio a mutar (P2), se emplea en la segunda reacción de PCR.

#### **12.1 Construcción del plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS.**

Los fragmentos de ADN mutagenizados del gen *Ha hsp17.6 G1* los clonamos en el plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS. Para construir este plásmido cortamos el plásmido -1486::GUS (descrito en la sección 13.1.1) con las enzimas de restricción Xho I y Eco RI. Purificamos el fragmento de ADN que contiene el fragmento del gen *Ha hsp17.6 G1* desde la posición -533 hasta la +121 fusionados al gen *gus*. Insertamos este fragmento dentro del vector pBluescriptSK<sup>+</sup> digerido con las mismas enzimas de restricción.

#### **12.2 Síntesis del "megaprimer".**

La síntesis del megaprimer se realizó empleando, como ADN molde, el plásmido pSK G1 HdIII 0,17 (figura 1). Para introducir las mutaciones mHSE y pHSE se utilizaron respectivamente los oligonucleótidos G1mut6 con la secuencia 5' GTCCAtATAAGTACAtAATATTTCAAtAACACTACTACG 3' (las mutaciones introducidas están en minúsculas) y G1mut7 con la secuencia 5' GTCCAGAAaAGTACAGAATATTctAGAACA ACTACTACG 3', que hibridan con las secuencias del gen *Ha hsp17.6 G1*, entre las posiciones -101 y -63. El otro oligonucleótido empleado en la reacción fue el SK, cuya secuencia 5'-TCTAGAACTAGTGGATC-3', hibrida con secuencias del sitio de clonación múltiple del vector pBluescriptSK<sup>+</sup>, aguas abajo del inserto.

Para la reacción de PCR mezclamos 50 ng de ADN del plásmido pSK G1 HdIII 0,17 con 5 µl tampón Pfu 10 x (Stratagene); 5 µl de una mezcla 2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 1 µl de una solución 25 µM de cada uno de los oligonucleótidos; H<sub>2</sub>O hasta 49 µl y 1 µl (2,5 U) de Pfu ADN polimerasa (Stratagene).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con el siguiente programa:

Un ciclo: 95°C, 5 min; 48°C, 1 min; 72°C, 1 min.

30 ciclos: 95°C, 1 min; 48°C, 1 min; 72°C, 1 min.

Un ciclo: 10 min a 72°C.

El producto de la PCR fue un fragmento de ADN de 206 pb, que se purificó en un gel al 1,6% de agarosa y se empleó como megaprimer en la siguiente amplificación por PCR.

### 12.3 La segunda PCR.

En la segunda PCR se empleó como molde el mismo plásmido y como oligonucleótidos el megaprimer sintetizado en la primera PCR y el oligonucleótido KS, cuya secuencia 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3', hibrida con secuencias del sitio de clonación múltiple del vector pBluescriptSK<sup>+</sup>, aguas arriba del inserto.

La reacción de PCR fue idéntica a la anterior pero se la temperatura de hibridación de la PCR fue 52°C en lugar de 48°C. El producto de la PCR fue un fragmento de ADN de 242 pb.

## 12.4 Introducción de los fragmentos de ADN mutagenizados en el plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS.

Digerimos el producto de la segunda PCR correspondiente a cada una de las mutagénesis realizadas con el enzima de restricción Hind III y purificamos el fragmento de ADN de 175 pb que incluye las secuencias mutadas. Los fragmentos purificados se ligaron al plásmido pSK G1 Xho-Sty::GUS previamente digerido con Hind III y desfosforilado. Comprobamos la presencia de este inserto en la orientación adecuada mediante PCR (descrito en la sección 14.1). Secuenciamos el fragmento amplificado por PCR para comprobar que únicamente se habían introducido las mutaciones deseadas. Para ello empleamos el oligonucleótido GUSIII, de secuencia 5'-ACGCGCTTCCCACCAACGCTG-3', que hibrida con la del gen *gus* entre las posiciones +115 y +94 (a partir del ATG). De esta forma obtuvimos los plásmidos pSK G1(m) Xho-Sty::GUS y pSK G1(p) Xho-Sty::GUS con las versiones mutadas del HSE.

## 13. Transformación de plantas de tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

En este trabajo hemos transformado plantas de tabaco con distintas fusiones traduccionales del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* al gen que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*). Para ello hemos utilizado el método de transformación de plantas de tabaco descrito por Horsch *et al* (1985).

### 13.1. Plásmidos para la transformación de plantas de tabaco.

#### 13.1.1. Construcción quimérica -1486::GUS.

Esta construcción contiene la región del gen *Ha hsp17.6 G1* comprendida entre los sitios de restricción de Eco RI (posición -1486 respecto al sitio 1 de inicio de la transcripción) y Sty I (posición +121) fusionada en fase con el gen *gus*. Para ello realizamos una digestión parcial del plásmido pSK G1 EcoRI 3.9 (ver figura 1) con el enzima de restricción Sty I y rellenamos sus extremos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Posteriormente digerimos los fragmentos rellenados con el enzima de restricción Sal I y purificamos la banda de 1619 pb. Introdujimos el fragmento obtenido en el plásmido pBI 101.2

digerido con Sal I y Sma I. Para asegurarnos de que los dos genes fusionados estaban en fase secuenciamos la zona de unión utilizando como cebador el GUSIII (descrito en la sección 6).

### **13.1.2. Construcción quimérica -533::*GUS*.**

Esta construcción contiene la región del gen *Ha hsp17.6 G1* comprendida entre los sitios de restricción de XhoI (posición -533) y Sty I (posición +121) fusionada en fase con el gen *gus*. Para obtener esta construcción digerimos el plásmido -1486::*GUS* con los enzimas de restricción Xho I y Sal I y religamos.

### **13.1.3. Construcción quimérica -126::*GUS*.**

Esta construcción contiene la región del gen *Ha hsp17.6 G1* comprendida entre los sitios de restricción de Hind III (posición -126) y Sty I (posición +121) fusionada en fase con el gen *gus*. Para realizar esta construcción digerimos el plásmido -1486::*GUS* con el enzima de restricción Hind III y purificamos el vector. Posteriormente introdujimos el fragmento del gen *Ha hsp17.6 G1* desde el sitio de restricción de Hind III (posición -126) a Hind III (posición +49) obtenido por digestión del plásmido pSK G1 HdIII 0.17 (figura 1) con el enzima de restricción Hind III. Comprobamos la presencia de este inserto en la orientación adecuada mediante PCR (descrito en la sección 14.1).

### **13.1.4. Construcciones quiméricas -1486(m)::*GUS* y -1486(p)::*GUS*.**

Estas construcciones contienen la región del gen *Ha hsp17.6 G1* comprendida entre los sitios de restricción de Eco RI (posición -1486) y Sty I (posición +121), con versiones mutadas de su HSE, fusionadas en fase con el gen *gus*. Para realizar esta construcción digerimos los plásmidos pSK G1(m) Xho-Sty::*GUS* y pSK G1(p) Xho-Sty::*GUS* con las enzimas de restricción Xho I y Eco RI y purificamos respectivamente, los fragmentos de ADN G1(m) Xho-Sty::*GUS* y G1(p) Xho-Sty::*GUS*, de 2804 pb. Insertamos los fragmentos G1(m) Xho-Sty::*GUS* y G1(p) Xho-Sty::*GUS* en el plásmido -1486::*GUS* tras digerirlo con Eco RI y Xho I y eliminar el fragmento de 2804 pb liberado. De esta manera obtuvimos los plásmidos -1486(m)::*GUS* y -1486(p)::*GUS*, respectivamente.

### 13.2. Preparación de las células de *A. tumefaciens*.

Inoculamos una colonia de *A. tumefaciens*, portadora de la construcción a introducir en plantas de tabaco, en 50 ml de **medio M9** suplementado con 100 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de estreptomycin. Cultivamos a 28°C durante 48 horas en agitación. Recogimos las células centrifugando a 1.500 G durante 20 minutos y resuspendimos en 25 ml de **medio MS** sin antibióticos.

**Medio M9** (medio mínimo de cultivo de bacterias): A 750 ml de H<sub>2</sub>O estéril se añaden: 200 ml sales M9 x 5; 2 ml MgSO<sub>4</sub> 1M; 20 ml sacarosa 20%; 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> 1M. Se agita rápidamente y se completa con agua hasta 1 l. Todas las soluciones deben estar estériles por autoclavado salvo la de sacarosa que se esteriliza por filtración.

**Sales M9 x 5:** 34 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 g/l NaCl; 5 g/l NH<sub>4</sub>Cl.

**Medio MS:** 100 ml/l Macronutrientes MS x 10; 10 ml/l Micronutrientes MS x 100; 10 ml Vitaminas MS x 100; 5 ml/l Solución de hierro MS x 200; 30 g/l sacarosa; 0,1 g/l mio-inositol. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l agar (Difco).

**Macronutrientes MS x 10:** 16,5 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 19 g/l KNO<sub>3</sub>; 4,4 g/l CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O; 3,7 g/l MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 1,7 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Micronutrientes MS x 100:** 0,62 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,23 g/l MnSO<sub>4</sub>-4H<sub>2</sub>O; 0,86 g/l ZnSO<sub>4</sub>-4H<sub>2</sub>O; 0,083 g/l KI; 0,025 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O; 0,0025 g/l CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O; 0,0025 g/l CoCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O.

**Vitaminas MS x 100:** 0,1 g/l ácido nicotínico; 0,1 g/l piridoxina HCl; 0,02 g/l tiamina-HCl.

**Solución de hierro MS x 200:** 7,46 g/l Na<sub>2</sub>EDTA; 5,56 g/l FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O. Se disuelve el Na<sub>2</sub>EDTA en agua, se añade el FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O y se calienta a 100°C durante 2 o 3 minutos. Se conserva en botellas ámbar a 4°C.

### 13.3. Transformación de discos de hoja de tabaco.

Para la transformación se requieren plantas silvestres de tabaco, de uno o dos meses de edad, crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad. Se cortan las hojas en discos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, eliminando el nervio central. Los discos de hoja se sumergen en el cultivo de *A. tumefaciens* resuspendido en MS durante 10 minutos. Se seca el exceso de medio de los discos, se colocan en cajas de **medio TR** con el haz hacia abajo y se incuban tres días en cámara de cultivo para que ocurra la infección de *A. tumefaciens*.



El cuarto día, los discos de hoja se traspasan a medio TR con 250 mg/l de cefotaxina (para eliminar las bacterias) y 150 mg/l de kanamicina (para seleccionar brotes transgénicos). A los 15-20 días empiezan a proliferar los callos y posteriormente brotes de plantas.

**Medio TR:** 100 ml/l Macronutrientes MS x 10; 10 ml/l Micronutrientes MS x 100; 10 ml/l Vitaminas MS x 100; 5 ml/l Solución de hierro MS x 200; 30 g/l sacarosa; 0,1 g/l de Mio-Inositol; 1 mg/l 6-Benzil-aminopurina (6BA); 0,1 mg/l ácido naftaleno acético (NAA). Se ajusta el pH a 5,6 con NaOH 1M. Para medio sólido se añade 8 g/l de agar (Difco).

#### **13.4. Selección de transformantes y enraizamiento.**

Los brotes obtenidos de los discos de hoja se cortan y se traspasan a contenedores Magenta con medio MS con kanamicina 150 mg/l y carbenicilina 250 mg/l. Los brotes transformados deben ser capaces de enraizar en este medio selectivo con kanamicina.

Mantuvimos las plantas en cultivo *in vitro* en cámaras hasta que alcanzaron una altura de 5-15 cm, las traspasamos a macetas con tierra. Para aclimatarlas al cambio de humedad las cubrimos con bolsas de plástico. Las cultivamos en una cámara de cultivo hasta su desarrollo completo.

#### **14. Comprobación de la presencia del transgén en las plantas de tabaco transformadas.**

Analizamos las plantas de tabaco para comprobar si eran transgénicas y determinar cuántas copias del transgen tenían integradas en su genomio. Para ello utilizamos las técnicas de PCR e hibridaciones tipo Southern.

##### **14.1. PCR de ADN genómico de plantas.**

Comprobamos la presencia en el genomio de las plantas de tabaco resistentes a kanamicina de un fragmento interno del ADN transferido por *A. tumefaciens*. Para ello utilizamos ADN genómico de estas plantas como molde para amplificar mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

En las reacciones de amplificación se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos GUS I, de secuencia, 5'-

GATTTACGGGTTGGGGTTTCT-3', que hibrida con la del gen *gus* entre las posiciones +37 y +15 (a partir del ATG) y G1oli5, de secuencia, 5'-CTCTATCTGTCCAGATAAG-3', que hibrida con las secuencias del gen *Ha hsp17.6 G1* entre las posiciones -110 y -91.

#### 14.1.1. Reacciones de PCR.

Para la reacción de PCR mezclamos 100 ng de ADN de la planta a analizar con 5  $\mu$ l tampón PCR 10 x (Pharmacia Biotech); 5  $\mu$ l de una mezcla 2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 1  $\mu$ l de una solución 20  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos; H<sub>2</sub>O hasta 49  $\mu$ l y 1,5 U de Taq polimerasa (Pharmacia Biotech).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con el siguiente programa:

Un ciclo: 95°C, 5 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min.

30 ciclos: 95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min.

Un ciclo: 10 min a 72°C.

#### 14.1.2. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR.

Las reacciones de amplificación se analizaron por electroforesis en geles al 1.6% de agarosa (descrito en la sección 3.6), comprobando el tamaño del fragmento amplificado mediante la comparación con otros fragmentos de ADN de tamaño conocido.

#### 14.2. Análisis de las plantas transformadas mediante hibridaciones tipo Southern.

Analizamos el número de copias de los transgenes transferidos por *A. tumefaciens* en el genomio de las plantas de tabaco resistentes a kanamicina. Para ello realizamos hibridaciones tipo Southern del ADN genómico de las plantas a analizar con una sonda radiactiva del gen *gus*, como se describe en la sección 4.7.

#### 15. Análisis de la actividad $\beta$ -glucuronidasa de las plantas transgénicas.

Realizamos ensayos de la actividad GUS de las plantas transgénicas obtenidas tanto histoquímicos, para localizar la actividad GUS, como fluorimétricos para cuantificarla.

### 15.1. Detección histoquímica de la actividad GUS.

Este protocolo fue descrito inicialmente por Jefferson (1987). El protocolo se basa en la capacidad de la  $\beta$ -glucuronidasa para utilizar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc), que es incoloro, y transformarlo en dicloro-dibromoíndigo (ClBr-índigo), que es de color azul intenso e insoluble. Este compuesto final precipita inmediatamente tras su formación, lo que nos permite localizar dónde se está dando la reacción.

Tras la recolección, diseccionamos los embriones de tabaco de la testa y el endospermo con la ayuda de aguja y pinzas. Recogemos los endospermos y los embriones en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7. Sustituimos este tampón por **tampón de reacción**, infiltramos unos segundos con vacío e incubamos a 25°C en oscuridad durante 16 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se para la reacción y se fija la tinción del material. Para ello incubamos durante 10 minutos a temperatura ambiente en **tampón de fijación**. Finalmente, incubamos 2 minutos en etanol al 50%, y otros 2 minutos en etanol al 70%. El material se conserva en etanol al 70% durante meses sin cambios apreciables.

**Tampón de reacción:** 1 mM X-Gluc; 50 mM fosfato sódico pH 7; 10 mM EDTA; 0,1 mM ferrocianida de potasio; 0,1 mM ferricianida de potasio; 0,1% tritón X-100.

El X-Gluc se prepara en una solución 10 mM en N'N'-dimetilformamida y se conserva a - 20°C.

**Tampón de fijación:** 10% formaldehído, 20% de etanol y 5 % ácido acético.

### 15.2. Cuantificación de la actividad GUS por fluorimetría.

Este procedimiento descrito inicialmente por Jefferson *et al.* (1987) se basa en la hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucurónido (MUG) por la enzima GUS. Esta enzima transforma el MUG en ácido glucurónido y MU. El producto MU es fluorescente, con un máximo de excitación a 365 nm y un máximo de emisión a 455 nm y alcanza su máxima fluorescencia cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La lectura del fluorímetro nos indicará la cantidad de MU

formado y, por lo tanto, la actividad GUS presente en la muestra analizada.

### **15.2.1. Extracción de proteínas.**

El material, recolectado y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido, se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Trituramos el material en  $\text{N}_2$  líquido con un mortero hasta convertirlo en un polvo fino y lo homogenizamos con un volumen de **tampón de extracción**. Eliminamos el material insoluble centrifugando las muestras a 13.000 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y recogiendo el sobrenadante. Determina la concentración de proteínas mediante el método Bradford. Las muestras se pueden conservar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante períodos de horas o a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante períodos más largos.

**Tampón de extracción:** 50 mM tampón fosfato sódico pH 7; 10 mM EDTA pH 8; 0,1% SDS, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% tritón X-100.

### **15.2.2. Cuantificación de las proteínas de los extractos.**

Determinamos la concentración de proteínas de los extractos mediante el método descrito por Bradford (1976).

### **14.2.3. Reacciones fluorimétricas.**

Mezclamos 5  $\mu\text{l}$  de cada extracto de proteínas con 175  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción y preincubamos la mezcla hasta que alcanza los  $37^{\circ}\text{C}$ . La reacción se inicia añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de solución 10 mM MUG disuelta en tampón de extracción y agitando. Las reacciones se llevan a cabo durante 30 y 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para cada muestra. Cuando ha transcurrido el tiempo de reacción deseado, añadimos 0,8 ml de 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , para parar la reacción.

### **15.2.4. Medidas fluorimétricas.**

Las medidas fluorimétricas se han tomado con un fluorímetro TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments). Este aparato excita a una longitud de onda de 365 nm y lee a 455 nm.

Para medir utilizamos todo el producto de la reacción fluorimétrica. Para las medidas excesivamente altas diluimos las muestras en tampón 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Para saber la concentración de MU que corresponde a la medida obtenida con el fluorímetro se prepara una recta patrón diluyendo: 0, 2, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 nM de 4-MU en 0,8 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M y se añade tampón de extracción hasta 1 ml.

Nota: El producto 4-MU (Sigma) se disuelve en DMSO y se añade Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M, hasta alcanzar una concentración 1  $\mu$ M de 4-MU. Esta solución se puede conservar 4°C en oscuridad por unos días. A partir de ella se prepara la recta patrón cada vez que se vayan a medir muestras.

### 15.3. Análisis estadístico de los datos.

La actividad GUS se mide como pmoles MU/ mg proteína x minuto. Las distribuciones de los valores de actividad GUS determinados para las plantas transgénicas portadoras de las distintas construcciones fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa Statview v4.1 (Abacus Concepts, Inc.). Los datos fueron transformados logarítmicamente para obtener distribuciones normalizadas (Nap *et al.*, 1993). La normalidad de las distribuciones transformadas fue analizada usando el test de Shapiro-Wilk, asumiendo la normalidad para un valor  $P > 0,94$ , siendo P el estadístico Shapiro-Wilk. Adicionalmente, la distribución de los valores residuales del ANOVA se examinó para verificar su normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Usando el test de Student-Newman-Keuls, se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori* del efecto de cada gen quimérico en el total de la varianza observada. El nivel de significación considerado fue  $P \leq 0,05$ .

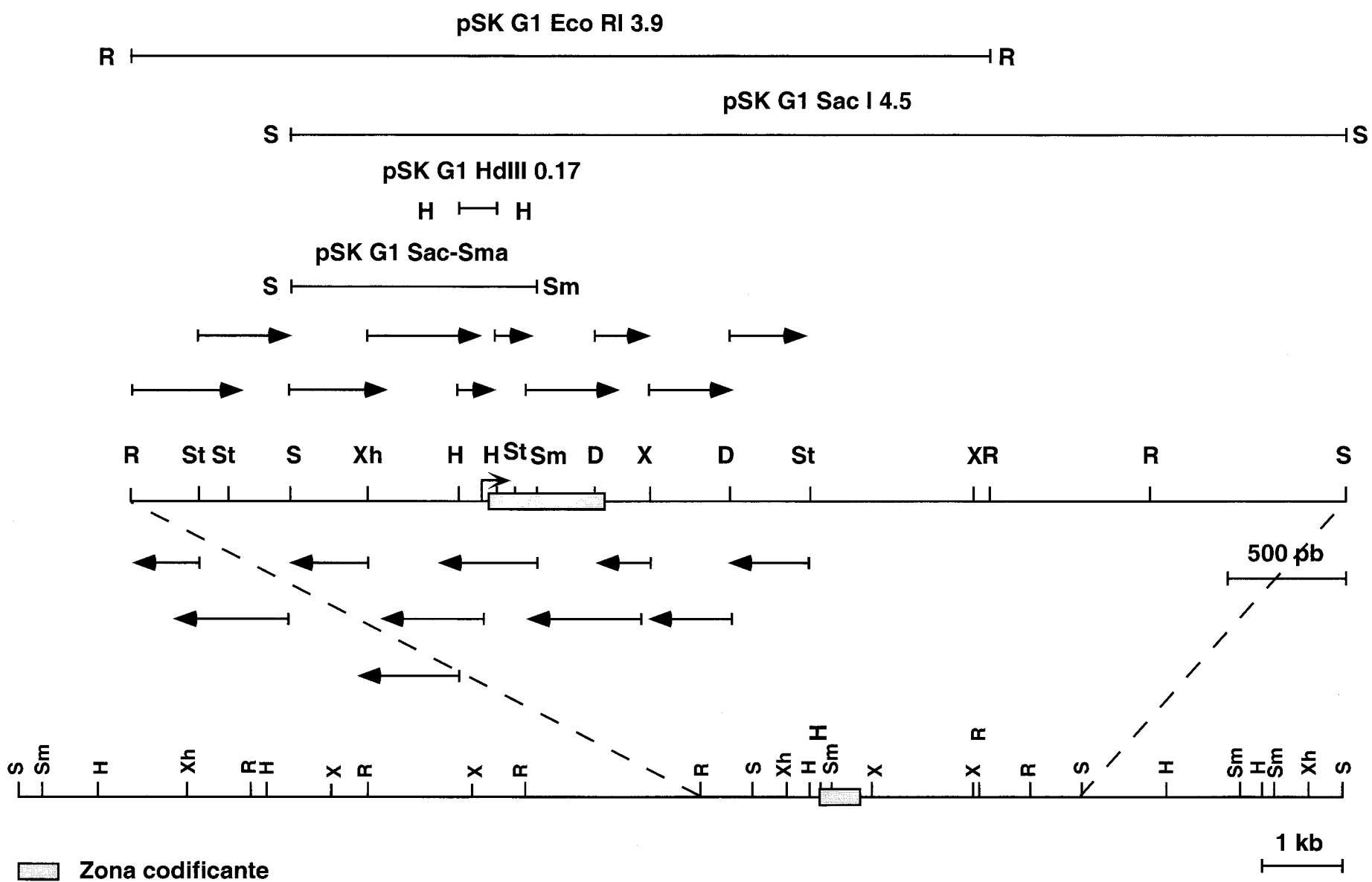
### **III. RESULTADOS**

### 1. Clonación, secuenciación y determinación del inicio de la transcripción del gen *Ha hsp17.6 G1*.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se rastreó una genoteca de ADNc de semillas secas de girasol, por hibridación diferencial. En el rastreo se aislaron varios clones para los que se detectaba una fuerte hibridación con una sonda de ARN de semillas secas y no se detectaba hibridación con una sonda de ARN de germínulas (Almoguera y Jordano, 1992). Uno de estos clones, denominado *Ha hsp17.6*, mostró una homología alta con los genes de choque térmico de bajo peso molecular (*shsp*) de tipo I. Mediante hibridaciones tipo Northern se demostró la acumulación de ARNs muy homólogos al ARNm *Ha hsp17.6* en embriones, desde los 10 días posteriores a la antesis (dpa) hasta la completa desecación de la semilla, pero no en germínulas de 3 días posteriores a la imbibición (dpi). Sin embargo, tratamientos con la hormona vegetal ABA, o de estrés térmico u osmótico provocaban una leve acumulación de ARNs muy homólogos al ARNm *Ha hsp17.6* en dichas germínulas (Almoguera y Jordano, 1992).

En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la regulación de genes durante el desarrollo embrionario, por lo que decidimos estudiar las secuencias de ADN implicadas en la regulación del clon genómico correspondiente al ADNc *Ha hsp17.6*. Para ello aislamos dicho clon rastreando la genoteca genómica de girasol descrita en Coca *et al.* (1996) con una sonda del ADNc *Ha hsp17.6* completo (ver materiales y métodos). Tras rastrear  $9 \times 10^5$  pfc hallamos una calva de lisis que hibridaba fuertemente con la sonda utilizada y la purificamos hasta la homogeneidad mediante otras dos rondas de rastreo. Hicimos un mapa de los sitios de restricción del ADN del bacteriófago aislado (figura 1) y determinamos los fragmentos de restricción que hibridaban con la sonda del ADNc *Ha hsp17.6* mediante hibridaciones tipo Southern (ver materiales y métodos).

Subclonamos un fragmento de restricción de ADN del clon genómico aislado EcoRI-EcoRI de 3,9 Kb y otro SacI-SacI de 4,5 Kb que hibridaban con la sonda del ADNc *Ha hsp17.6*, en el vector pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene Cloning Systems). Secuenciamos en ambas cadenas la pauta abierta de lectura correspondiente al ADNc *Ha hsp17.6*, 1521 pb de secuencias 5' flanqueantes y 918 pb de secuencias 3' flanqueantes (ver las figuras 1 y 2). Comprobamos que la región de ADN secuenciada





**Figura 1. Mapas de restricción y secuenciación del clon *Ha hsp17.6 G1*.**

Parte inferior: esquema de las secuencias genómicas de girasol clonadas por hibridación con la sonda del ADNc *Ha hsp17.6*. Parte central: esquema de la región de ADN del gen subclonada en el plásmido pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene Cloning Systems). Parte superior: esquema de los plásmidos construidos con distintas regiones del clon, de importancia en este trabajo y sus respectivos nombres. Las flechas sobre y bajo la secuencia indican la dirección y longitud de las reacciones de secuenciación realizadas. La flecha en el esquema central indica el inicio de la transcripción. Los sitios de restricción indicados son: D = DdeI, H = HindIII, R = EcoRI, S = SacI, Sm = SmaI, St = StyI, X = XbaI y Xh = XhoI.

del clon aislado contenía la secuencia exacta del ADNc *Ha hsp17.6*. El análisis de esta secuencia mostró que el clon genómico correspondiente al ADNc *Ha hsp17.6* carece de intrones, como ocurre con los otros dos genes *shsp* de tipo I de girasol secuenciados hasta la fecha (Coca *et al*, 1996). La secuencia determinada se denominó *Ha hsp17.6 G1* y está disponible en las bases de datos "GenBank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank" con el número de acceso Z95153.

Determinamos el sitio de inicio de la transcripción mediante experimentos de extensión del cebador y de protección frente a la digestión con ribonucleasa A. Ambos métodos presentan problemas técnicos diferentes, por lo que la confirmación de los sitios de inicio con las dos técnicas añade fiabilidad al resultado obtenido. Para los experimentos de extensión del cebador utilizamos un oligonucleótido de 25 nt de la cadena no codificante del ADNc *Ha hsp17.6* (descrito en materiales y métodos y figura 3, panel C) y extractos de ARN total de embriones maduros de girasol. Mediante esta técnica detectamos dos señales correspondientes a dos sitios de iniciación de la transcripción situados a 35 y 43 pb hacia el extremo 5' del inicio de la traducción, respectivamente (figura 3, panel A). Para los experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A utilizamos una ribosonda de 758 nt correspondiente a la cadena de ADN no codificante del gen *Ha hsp17.6 G1* entre los sitios de restricción SmaI y XhoI (descrita en materiales y métodos y en la figura 3, panel D). Tras hibridar esta ribosonda con los mismos extractos de ARN del experimento de extensión del cebador digerimos con ribonucleasa A (detalles en materiales y métodos). Mediante esta técnica detectamos dos señales de igual intensidad correspondientes a los sitios de iniciación de la transcripción determinados por la técnica de extensión del cebador (figura 3, panel B). El hecho de que ambas señales tengan

-1486 GAATTCCTACTAGCGGTAGGTGCTTCTCCCAACTCTTGCCAAAATCGATCACACATGTCCTAAGCATGCTTCTAG  
 GGTTTGGATGTTGCGTTCAGACTGCCCATCCGTTTGGGATGATAAGCGGTGCTCATGTCTAATCGTGAGCCAAA  
 -1336 GGATCTGTGCATAGCTTGGCCACAACFCAGAAGTAAACCGGGCGTCTCGATCGGAAATAATGGAGGTGGCACCCC  
 GTGCCTGGACACTACTTCCCTTAAAGTAAATGTCTGCCAAGGTAGAGAACTTTTCTGTTTCTTTGATAGCCAAAA  
 -1186 GTGTGCAGACTTGGTCAATCGATCTACTATCACCCAAATAGTGTCAATTTACTCGTTGGGATCTAGGTAGGCCAGT  
 AACGAAATCCATGGAAATTTGCTCCCATTTCCATTTCCGGATCTCTGGTTGTTGGAGTAGGCCCGCTGGTTCTTT  
 -1036 ATACTCAGTCTTACTCTCGCGCAAGTCAAACATTTGCTGACATATGCTGCTATGTGGGCTTTCATGCCAGGCGA  
 CCAATATGTAGTCTTFAAGTCATGGTACATCTTATCCGAACCAGGATGTACTAAGTAACGGGACTTATGGGCTTC  
 -886 GTCCATCACGAGCTCGCGTAACTTCCATAAAGGGGAACCCATATGCGCCCGGTTACATAGTAAGCGCCGCTTTC  
 TTTTGTTCACACCCTGCTCTCGATCCTAATAGGGACTCAGCCCTGATGTTCTCTGGTTTCAATGCTTCAACCTGA  
 -736 GCGCCTCGTATCTGAGTAGGGAGGTAGACTGGATGGTAAGTTGTAGTGCTCGCACGCGCTTGGGTGTAGTGTCC  
 TTTTGGCTGAGGGCGTCTGCCACGACGTTGGCTTTGTCCGGATGGTACTTGTATGGCGCATTCGTAATATTCAAG  
 -586 AGTTCGAGCCATCGACGTTGTCGTATGTTAATTTCTTTTGTCTGAAGATATGCTCGAGACTCATGTGATCGGTG  
 TAAATGGTGCACCTGGTACCGTACAGGTAATGTCTCCATATCTTAAAGAGCAAAAACCACTGCTCCTAGTTCCAAG  
 -436 TCGTGCATAGTGTGTTTCTTTCGTGAGTCTTAAAGTTGTGAGAGCGTAAGCAATATTTCAAACAGGAAAACT  
 AGACGCGGGTCCATCGTAACGCGCGGGTCTTAGATCAAATTTTATCTATGTTTACGTTTTCGGTTTAAATTTCTT  
 -286 CGCATTAACACCGCAACTTCAGTGTGCGGTGATCGCTGACAGTAGTGTGGCATTAGTGTGCTCGCCCCGCGCAACGCG  
 GGGTGTTTAATAATAGTTATATAAAAAATAAACATTTATAAACGATATATACTAAGAGTTCCACATAATAATCC

-136 GTAGAAAAAAGCTTATTCTCTATCTGTCCAGATAAGTACAGAAATATTTCAGAACACTACTACGTTGGCAATAT

-61 CCAACAGAAGCCACCTCAACACTTCCCTCCTATAAAATACCACCATTTCATATCCACTCACACAACACATTAACACT  
 2 1

+15 CCAACTCAAAAACATTCACCATGTCAATCATTCCAAGCTTTTTTACCAGCAAAAGAAGCAACATATTCGACCCA  
 M S I I P S F F T S K R S N I F D P

+90 TTCTCCCTAGACACATGGGACCCGTTCCAAGGGATCATCTCCACCGAACCCGCGCGGAAACCGCAGCGATCGTG  
 F S L D T W D P F Q G I I S T E P A R E T A A I V

+165 AACCGGAGAATCGACTGGAAAGAGACGCCCGAGGCGCACGTGTTAAAAGCCGACTTACCCGGGATGAAGAAGGAA  
 N A R I D W K E T P E A H V L K A D L P G M K K E

+240 GAGGTGAAGGTGGAAGTGAAGACGGGAGGGTGTTCAGATAAGTGGAGAGAGGTGTAGAGAGCAGGAGGAGAAG  
 E V K V E V E D G R V L Q I S G E R C R E Q E E K

+315 GATGACACGTGGCATAGGGTTGAGAGGAGTAGTGGGAAGTTTATTAGGCGGTTTTCGGTTGCCGGAGAATGCGAAG  
 D D T W H R V E R S S G K F I R R F R L P E N A K

+390 ATGGATGAGGTGAAGGCGATGATGGAGAACGGTGTGTTGACGGTGGTTGTGCCTAAGGAGGAGGAGGAGAAGAAG  
 M D E V K A M M E N G V L T V V V P K E E E E K K

+465 CCGATGGTGAAGGCTATTGATATTTCTGGGTAGGTTTGTGTACAGGGGTAGGGGTGCTCCACTTTTTCATCATTAC  
 P M V K A I D I S G \*

CGTGACGCCCCGACCCGCTTATGTGAGGCTGGGAGCTTTGTTTTGCATGTTGTAATGAAATAAACGTAATAGGTT  
 +615 CGTGGTGTTTGAGGTGGGGTTTGTATGTATGATTTATGTATATATGTATGTTTGCCTGAATAAAAGGTTGTGTT  
 ATATTTGTATCTAGATTAGATTAGATGTTGATTTATGTAGTAAAGTGAAGGAAGAAGATTTGTATTAATATAGTA

+765 ATTAGTATAATATAATAACAAGGAAAAATGATTTTATTCGTCAAACGTAACATTTTAAATATAAAATCTAAAGTAA  
 AGTAAATGAACACACTTTAAGTTATATAAAATATATGTTGAAAAATATGTGAAAATAGTATTTTTCACAAATA

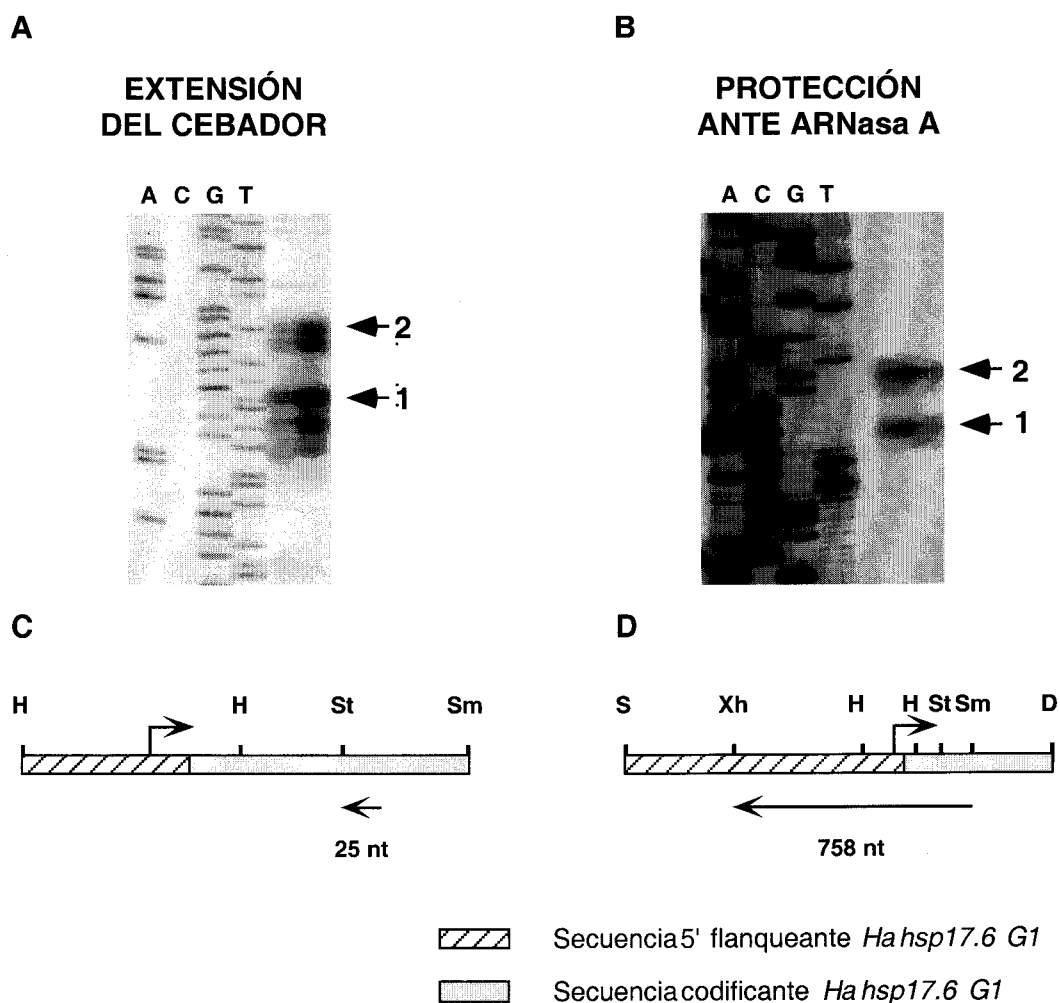
+915 TAGGAAAAATGATTTTTCCTATTTCCGACTAAAAATAAATAAATAAATAAAGCGGGTTTATGTATTTATTTGT  
 GGGTTTATGTTCTATGTTGCAAGCTTCGCAACGAACTAAACCAGTCTAAACGGAGCTAAGATGAATGAGATAT

+1065 TGATGCTCAAAGTTGGGTGTTTGAACATTTCGATGCTGAAACTAAAGGAAAAGTAGCACCTTGTCCACATAGGA  
 GGAGAGATAGAACTTAAATAGATATTTAAGGTGGAACCTCCATCCGCACCTAACCTTGCACCCGACGCGCGGC

+1215 CGCGGCGTGGGCGATGAGGCGCAATGTGGCGCTTTGATGGCGCACGCTCGCATCGCCGCGAGCCGCTTGAGAGCC  
 GCCTTTGTATTTTGTATCGCGCGCGTGGTGGAGCACAAATGGTTGCAAGGACCAAGTGGTGGGTGATGCGCGGC

+1365 ATGACGTGGCAGTCACTGATGCGCGCGAGTACACATGGCACGGA

**Figura 2. Secuencia del gen *Ha hsp17.6 G1*.** Secuencia de nucleótidos del gen *Ha hsp17.6 G1* desde la posición -1486 hasta la +1412 respecto del sitio 1 de inicio de la transcripción. Los dos sitios (1 y 2) de inicio de transcripción están indicados con una flecha. La caja TATA más probable está subrayada y el posible HSE indicado por un corchete. Los núcleos de las repeticiones que componen el HSE se indican con segmentos sobre su secuencia y los nucleótidos que se ajustan a la secuencia consenso llevan un punto encima. Las repeticiones que se ajustan perfectamente a dicho consenso están además subrayadas. Bajo la secuencia codificante aparece su traducción a aminoácidos. El final de la traducción se marca con un asterisco.



**Figura 3. Determinación del inicio de la transcripción.** Experimentos de extensión del cebador (panel A) y de protección frente a la digestión con la ribonucleasa A (panel B). Los carriles A, C, G y T corresponden a una reacción de secuenciación de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1*. Las flechas de los paneles A y B indican los sitios 1 y 2 de inicio de transcripción detectados. El esquema C corresponde al experimento de extensión del cebador: la flecha bajo el esquema indica el tamaño y el lugar donde hibrida el cebador utilizado. El esquema D corresponde al experimento de protección frente a la digestión con ribonucleasa A:

la flecha bajo el esquema indica el lugar donde hibrida la ribosonda empleada. Las flechas sobre los esquemas indican la posición de los sitios de inicio de transcripción determinados. Los sitios de restricción indicados son los indicados en la figura 1.

la misma intensidad indica que los ARNm producidos a partir de los dos sitios de iniciación de la transcripción se deben acumular al mismo nivel, al menos en las muestras analizadas. Las secuencias de ADN que flanquean los sitios de inicio de la transcripción determinados (figura 2) se aproximan al consenso para plantas superiores CTCATCA (Joshi, 1987). El entorno del más cercano al ATG se ajusta mejor a este consenso por lo que lo elegimos como posición +1 para numerar la secuencia (figura 2). La presencia de una secuencia (TCCTATAAATAC) que se ajusta al consenso en plantas de la caja TATA (Joshi, 1987) a 23 y 31 pb aguas arriba de los sitios de inicio de la transcripción, apoya los resultados obtenidos experimentalmente.

La iniciación de la transcripción a partir de los sitios determinados experimentalmente genera unos ARNm con una región 5' no traducida de 35 y 43 nt, para los sitios 1 y 2 respectivamente (ver figuras 2 y 4). En ambos casos la longitud de esta región es especialmente corta en comparación con otros genes *shsp* de plantas superiores (Joshi y Nguyen, 1995), incluidos los otros dos genes *shsp* de girasol de tipo I anteriormente clonados (figura 4). Este hecho podría conferir a los ARNm del gen *Ha hsp17.6 G1* una estabilidad y/o traducibilidad diferente de la de otros genes *shsp* (Joshi y Nguyen, 1995).

## **2. El gen *Ha hsp17.6 G1* contiene un HSE imperfecto capaz de unirse al hHSF1 *in vitro*.**

Una de las características de los genes *shsp* de los distintos organismos estudiados es la presencia de elementos en *cis* de respuesta a choque térmico (HSE) entre 40 y 270 pb aguas arriba del inicio de la transcripción. Los HSEs están compuestos por un número variable de repeticiones contiguas del pentanucleótido nGAAn (usualmente mayor de 3), que alternan esta orientación con su inversa (Fernandes *et al*, 1994 A). El factor de transcripción de choque térmico (HSF) de *Drosophila* es capaz de unirse *in vitro* a un fragmento de ADN con dos repeticiones del pentanucleótido perfectas, contiguas y con orientación alterna aunque con mucha menos afinidad que a un fragmento de ADN

### *Ha hsp17.6 G1*

-177 AAAACATTTATAAACGATATATACTAAGAGTTCCACATAATAATCCGTAGAAAAAAAAAGCTTATTCTCTA -108

-107 TCTGTCCAGATAAGTACAGAAATATTTTCAGAACACTACTACGTTGGCAATATCCAACAGAAGCCACCTCAA -38

-37 CACTTCCCTCC**TATAAA**TACCACCATTTCATATCCACTCACACAACACATTAACACTCACAACCTCAAAAAC +33

+34 ATTCACCATGTCAATCATTCCAAGCTTTTTTACCAGCAAAAAGAAGCAACATATTCGACCCATTCTCCCTA +103

M S I I P S F F T S K R S N I F D P F S L

2 1

### *Ha hsp17.7 G4*

-122 CCTCTGGAACCTTTTCAGAAATATCCATATCCATTTCTTCAAGCTTCAAGACAATCCTAGAAATTACTCAC -51

-52 TCTCCCCTTCTTCCCATCT**TATAAA**TGCCACCCCCAATCACATCCATCTCTCAGACAACACACTTCACAA +18

+19 CATTGAAAGCAAGCATTCATCATTTCATAAACACCCCAACAAAAATATTAAGTTACCAACCATGTTCGATCA +88

M S I I

+89 TTCCAAGCTTCTTTACCGGTAACGGAAGCAACATATTCGACCCATTCTCCAGCGAAATCTGGGACCCCTT +158

P S F F T G N G S N I F D P F S S E I W D P

### *Ha hsp18.6 G2*

-114 AGTATAGAAATATTCAGAAATCAACATAACCCAATTCCAAAATAACCATCCAGAACATTCAAGACAGTTT -45

-44 CCAAACCCCTTAT**TATAAA**ACCACAACAACAACCACCCTCCATTTCATCAACAAAACATCAGTTTCCGATTA +26

+27 CTTCAATTCGTTTTTCGCTCAATCAATCACTAAAACAAATGTCGATCATTCCAAATTTCTTCGGCCGAGA +96

M S I I P N F F G R R

+97 CGAACAAACTGCTTCGACCCCTTCTCTCTAGA +128

R T N C F D P F S L

**Figura 4. Secuencias proximales de los genes de girasol *shsp* de tipo I.** Secuencias de nucleótidos que flanquean el sitio de inicio de la transcripción de los genes *Ha hsp17.6 G1*, *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2*. Las secuencias están numeradas a partir del sitio de inicio de la transcripción (sitio 1 para el gen *Ha hsp17.6 G1*). Los sitios de iniciación de la transcripción están indicados con una flecha. Las cajas TATA más probables están escritas en negrita y los HSEs indicados por un corchete (I para la región con HSEs proximal y II para la distal en los dos últimos genes). Los núcleos de las repeticiones que componen los HSEs se indican con segmentos sobre la secuencia y los nucleótidos que se ajustan a la secuencia consenso llevan un punto encima. Las repeticiones que se ajustan perfectamente a dicho

consenso están además subrayadas. Bajo la secuencia codificante aparece su traducción a aminoácidos.

con tres repeticiones (Xiao *et al*, 1991). En plantas, para que un HSF se una eficientemente a un HSE son necesarios al menos tres pentanucleótidos perfectos y contiguos en la orientación adecuada (Gurley y Key, 1991 y Schöffl *et al*, 1998). En *Drosophila* y levadura, la posición más importante en los pentanucleótidos nGAAn y nTTCn para la unión del HSF es la segunda y la cuarta respectivamente (Fernandes *et al*, 1994 B). Los estudios sobre el gen de soja *Gm hsp17.5E* han confirmado la importancia de esta posición para la activación transcripcional de dicho gen en esta planta (Barros *et al*, 1992). Estos estudios demostraron también que la presencia de una A en la primera posición del pentanucleótido nGAAn y una G en la última favorece la transcripción inducida por calor del gen *Gm hsp17.5E*.

En los estudios asistidos por ordenador de las secuencias de la región promotora proximal del gen *Ha hsp17.6 G1* no se encontraron secuencias que se ajustasen perfectamente al consenso para los HSEs descritas anteriormente. No obstante, 50 pb aguas arriba de la caja TATA del gen *Ha hsp17.6 G1* aparecen tres repeticiones contiguas del pentanucleótido nGAAn que alternan esta orientación con su inversa (figuras 2 y 4). De estas tres repeticiones, la central no se ajusta al consenso en su posición más importante (nTTTn en lugar de nTTCn). Esta desviación del consenso podría tener efectos negativos tanto en la unión del HSF a este HSE como en la activación transcripcional del gen *Ha hsp17.6 G1*. Aguas arriba de estas repeticiones se hallan otras dos repeticiones imperfectas (nGTCcaGATn en lugar de nTTCtaGAAn), a una distancia de cinco nucleótidos. El espacio entre estas últimas y las demás repeticiones se podría considerar como un espaciamiento o como una repetición muy imperfecta (nGTAn en lugar de nTTCn).

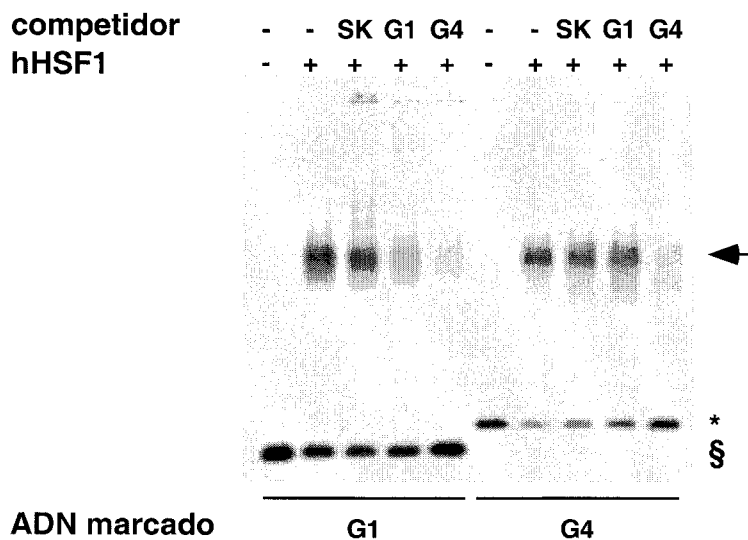
En los dos genes de girasol homólogos al *Ha hsp17.6 G1* previamente clonados (*Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2*) se había detectado la presencia de dos regiones con HSEs complejas en la zona proximal del promotor (Coca *et al*, 1996 y figura 4). El único posible HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* está situado a una distancia de la caja TATA de 50 pb, más parecida a la de las regiones con HSEs distales de los otros dos genes de girasol citados (63 pb para ambos) que a la de las proximales (21 pb para *Ha hsp17.7 G4* y 13 pb para *Ha hsp18.6 G2*). Esta diferencia en la distancia entre la caja TATA y el posible HSE del

gen *Ha hsp17.6 G1* con respecto a las regiones con HSEs proximales de los otros genes *shsp* de tipo I de girasol estudiados (figura 4), podría afectar a su posible regulación a través de HSFs.

En resumen, el gen *Ha hsp17.6 G1* tiene un posible HSE muy imperfecto debido tanto a su gran distancia con respecto a la caja TATA como al bajo número de repeticiones del pentanucleótido nGAAn en la orientación adecuada, de las que sólo dos, no contiguas, son perfectas (figuras 2 y 4). El hecho de que el posible HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* tenga estas características hace cuestionable que tenga un papel en la regulación de dicho gen. Como primera aproximación para tratar de determinar si este HSE podría participar en dicha regulación estudiamos su capacidad para unir *in vitro* el HSF1 de humanos (hHSF1). Para ello realizamos experimentos de cambio en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN. Marcamos radiactivamente un fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* (desde el sitio -126 al +50) que incluye el posible HSE y otro fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.7 G4* (desde el sitio -188 al +80) que incluye sus dos regiones con HSEs, más complejas y extensas (ver materiales y métodos). Tras incubar los ADNs marcados con extractos de proteínas de bacterias que superproducen hHSF1 (Rabindran *et al*, 1991), realizamos una electroforesis para ver el retraso en la movilidad del ADN marcado debido a la unión del hHSF1. También estimamos la afinidad relativa de la unión de los fragmentos de ADN de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* mediante experimentos de competición. Para ello incubamos cada uno de los ADNs marcados con los extractos de proteínas de bacterias que superproducen hHSF1 y un exceso molar de 50 veces de los mismos fragmentos de ADN sin marcar de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* (ver materiales y métodos).

Estos experimentos mostraron que el fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* marcado era capaz de unir hHSF1 en las condiciones ensayadas (figura 5). Esta unión era específica pues la señal correspondiente al complejo hHSF1/ADN marcado no se redujo al añadir un exceso de competidor inespecífico (un fragmento de ADN del vector pBluescript SK, descrito en materiales y métodos). El mismo exceso molar de los fragmentos de ADN sin marcar de los genes *Ha hsp17.6 G1* o *Ha hsp17.7 G4* redujo en cambio la señal correspondiente al complejo hHSF1/ADN marcado. Sin embargo, la unión *in vitro* del fragmento de ADN marcado del gen *Ha hsp17.7 G4* al hHSF1 no se vio

afectada por un exceso molar de 50 veces del fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* (figura 5).



**Figura 5. Unión del hHSF1 a la región 5' proximal del gen *Ha hsp17.6 G1*.** Experimentos de unión *in vitro* del hHSF1 a un fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* que incluye su posible HSE (carriles G1) y a un fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.7 G4* que incluye sus HSEs (carriles G4). El símbolo § indica la distancia en el gel de electroforesis a la que migra el fragmento de ADN G1 sin unir proteínas y el símbolo \* la correspondiente para el fragmento de ADN G4. La flecha indica la distancia a la que migran los fragmentos de ADN unidos al hHSF1. La presencia (+) o ausencia (-) de hHSF1 en la reacción de unión se indica sobre cada carril, así como la presencia de un ADN competidor en las reacciones de unión. Los competidores G1 y G4 corresponden a los fragmentos de ADN G1 y G4 sin marcar, respectivamente. El competidor SK corresponde a un fragmento de ADN del vector pBluescript SK<sup>+</sup> de 445 pb.

En resumen, en los análisis de secuencia de la región 5' proximal del gen *Ha hsp17.6 G1* hemos detectado un posible HSE. Este HSE es defectuoso tanto por su bajo número de repeticiones perfectas del pentanucleótido nGAAn contiguas en la orientación adecuada, como por su distancia con respecto a la caja TATA. Sin embargo, los experimentos realizados mostraron que el fragmento de ADN con el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* utilizado es capaz de unirse específicamente al hHSF1 *in vitro* aunque con una afinidad más baja que la del fragmento de ADN que incluye las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* (figura 5).

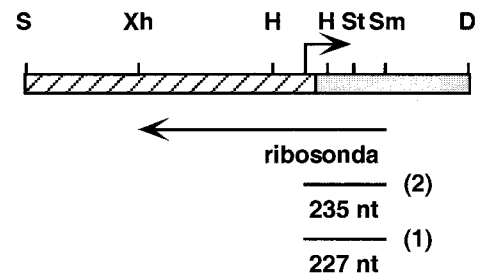
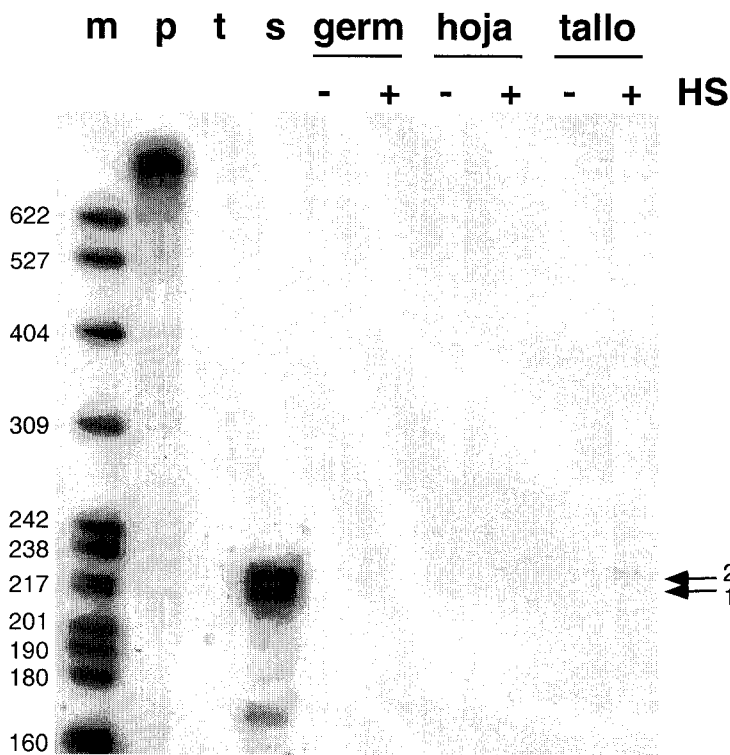


### **3. Los ARNms Ha hsp17.6 G1 se acumulan durante la embriogénesis, pero no en tejidos vegetativos en respuesta a estrés térmico o hídrico.**

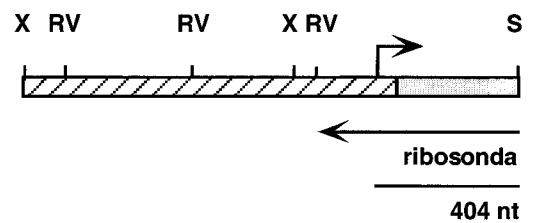
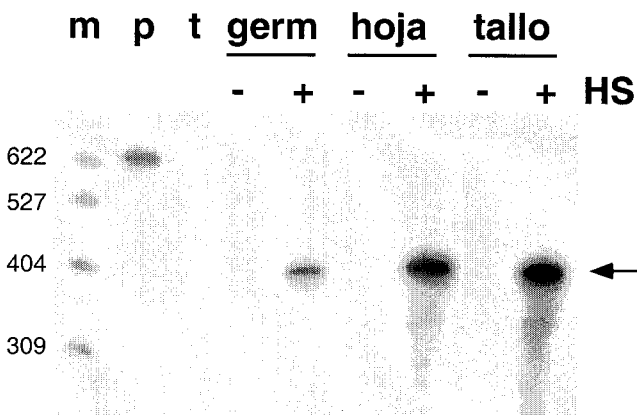
El hecho de que el HSE imperfecto del gen *Ha hsp17.6 G1* sea capaz de unirse al hHSF1 *in vitro* no garantiza que intervenga en la activación de dicho gen en respuesta a un choque térmico. Por esta razón decidimos estudiar la acumulación de los ARNm del gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol tras someter las plantas a tratamientos de choque térmico.

Los experimentos previos con germínulas de girasol habían mostrado acumulación de ARNms que hibridan con la sonda del ADNc *Ha hsp17.6* en respuesta a choques térmicos de 2 h 30 min a 37 o 42°C (Almoguera y Jordano, 1992). Sin embargo, debido a la gran conservación entre los distintos genes de *shsp* de tipo I de plantas no podíamos descartar que la hibridación detectada no se debiese a los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* sino al ARNm de otros genes con alta homología. De hecho, se había demostrado la acumulación por tratamientos de choque térmico de los ARNms de girasol *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2*, muy homólogos a los ARNms *Ha hsp17.6 G1*, mediante experimentos de protección frente a la digestión con la ribonucleasa A (Coca *et al.*, 1996).



Para detectar la presencia de los ARNs del gen *Ha hsp17.6* sin interferencias de genes homólogos realizamos experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A. La ribonucleasa A es capaz de digerir el ARN monocatenario que se forma por desapareamientos en híbridos de ARN de incluso un nucleótido y, por lo tanto, nos permite distinguir la presencia de moléculas de ARN que hibridan sin ningún desapareamiento con una ribosonda determinada. Para detectar el ARNm *Ha hsp17.6 G1* utilizamos una ribosonda de 758 nt de la cadena de ADN no codificante del gen *Ha hsp17.6 G1* entre los sitios de restricción *SmaI* (+226) y *XhoI* (-533) (figura 6, esquema superior). Analizamos extractos de ARN total de germínulas y plantas adultas de girasol (tallos y hojas por separado) sometidas a tratamientos de 2 h 30 min a 25°C o a 42°C. Como control de que el tratamiento a 42°C activaba la respuesta a choque térmico estudiamos también la acumulación de ARNm del gen *Ha hsp17.7 G4*, inducible por choque térmico (Coca *et al.*, 1996). Para ello hibridamos los mismos



**Ha hsp 17.6 G1**



**Ha hsp 17.7 G4**

 Secuencia 5' flanqueante  
 Secuencia codificante

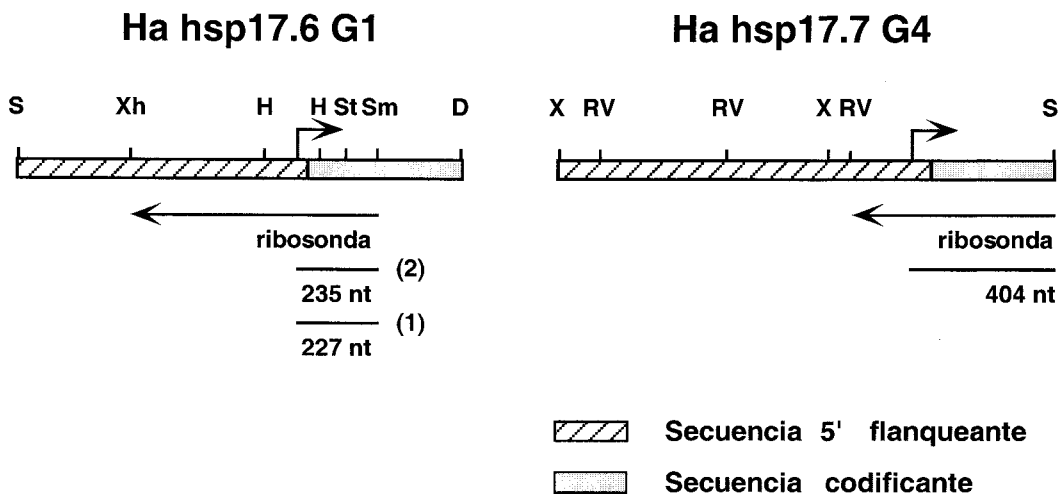
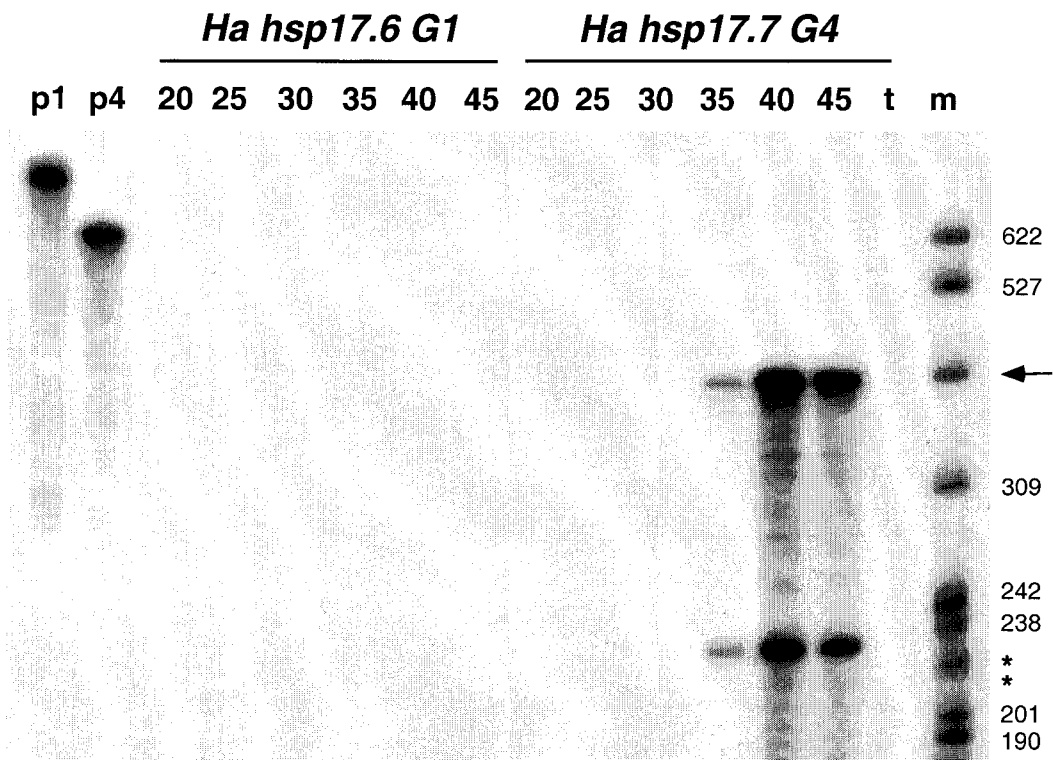
**Figura 6. Ausencia de acumulación del ARNm Ha hsp17.6 G1 en germínulas y plantas adultas sometidas a choque térmico.** Experimentos de protección frente a la digestión con la ribonucleasa A con muestras de ARN total extraídos de germínulas de 14 dpi (germ) y de hojas y tallos de plantas adultas tratadas (+) o no (-) durante 2 h 30 min a 42°C (HS). El panel superior corresponde a las hibridaciones de las muestras de ARN con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* y el inferior a las hibridaciones de los mismos ARNs con la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4*. El carril "s" corresponde a la hibridación con ARN total de semillas secas de girasol y los carriles "t" a la hibridación con ARNt de levadura. Los carriles "p" muestran las ribosondas sin digerir. Los carriles "m" corresponden al marcador de peso molecular (ADN del plásmido pBR322 digerido con HpaII) y a su izquierda se indica el tamaño de las bandas en nt. Las flechas junto a las autorradiografías indican la distancia a la que migran las bandas correspondientes a los fragmentos de ARN protegidos. La autorradiografía superior corresponde a una exposición de 4 días y la inferior a 20 h. A la derecha se muestran esquemas de los genes y las ribosondas empleadas (flechas bajo las secuencias) así como los fragmentos protegidos tras la digestión (segmentos bajo las flechas). Las flechas sobre las secuencias indican los sitios de iniciación de la transcripción. Los sitios de restricción indicados son: D=DdeI, H=HindIII, RV=EcoRV, S=SacI, Sm=SmaI, St=StyI, X=XbaI y Xh=XhoI.

extractos de ARN con una ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* (figura 6, esquema inferior).

Los experimentos de protección frente a la ribonucleasa A con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* y extractos de ARN total de germínulas y plantas adultas sometidas a choque térmico se muestran en la figura 6 (panel superior). No detectamos acumulación de ARNm *Ha hsp17.6 G1* en respuesta a los choques térmicos ensayados pero sí en un extracto de ARN total de semillas no estresadas. En cambio, en los experimentos realizados con los mismos extractos de ARN y la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* obtuvimos unas fuertes señales con los extractos de ARN del material sometido a choque térmico. Este resultado muestra que los tratamientos de choque térmico ensayados provocan la acumulación del ARNm *Ha hsp17.7 G4* pero no del ARNm *Ha hsp17.6 G1*.

El hecho de que el ARNm *Ha hsp17.6 G1* no se acumule en respuesta a los tratamientos de choque térmico ensayados se podría deber a que la temperatura utilizada no fuese la adecuada para la inducción de este gen. Para descartar esta posibilidad sometimos germínulas de girasol de 4 dpi a choques térmicos de 2h 30 min a distintas temperaturas (desde 25°C a 45°C). Hibridamos los extractos

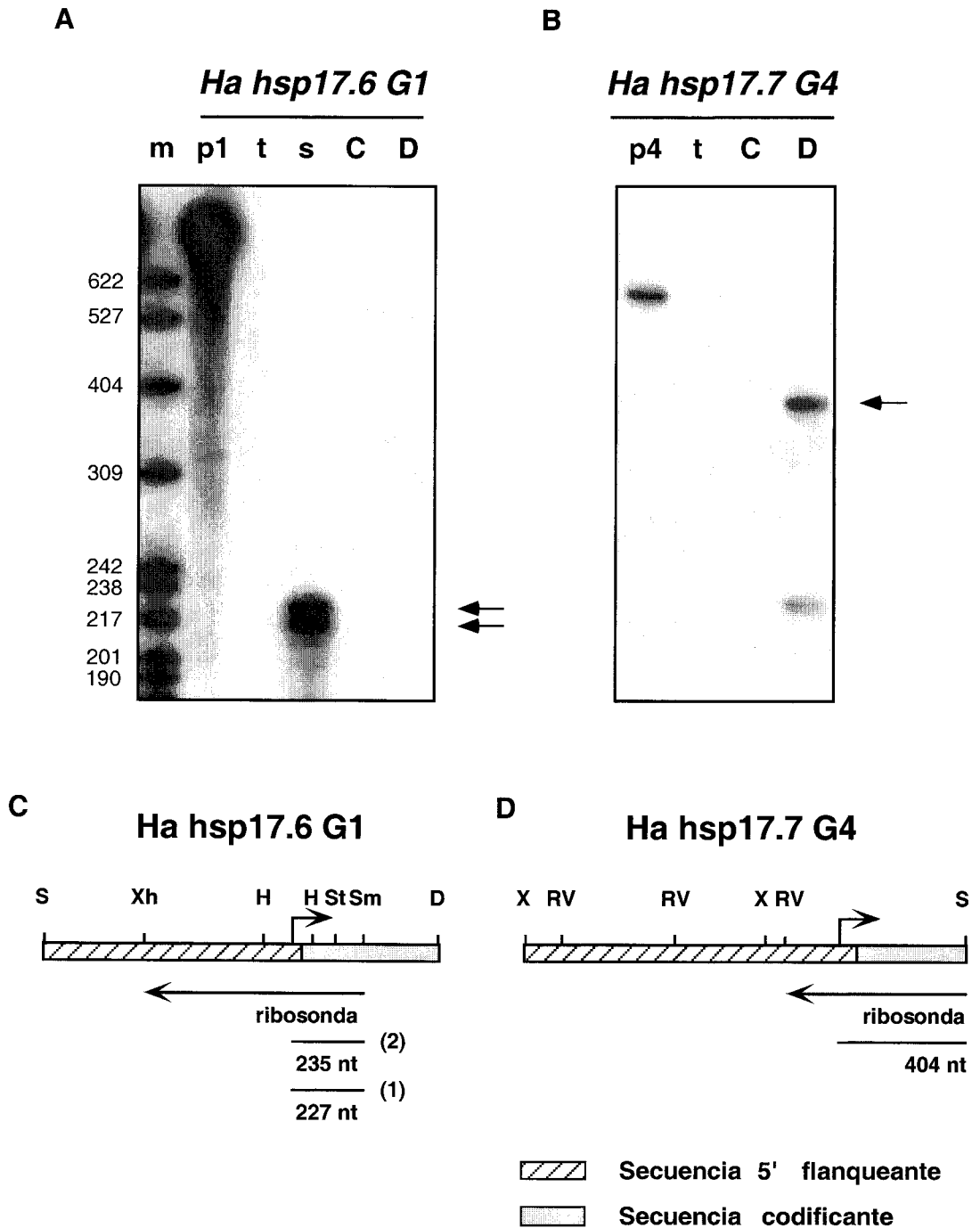
de ARN total obtenidos de estas muestras con las ribosondas de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* (figura 7, esquemas). Las hibridaciones con la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* (figura 7) mostraron una acumulación de los ARNm *Ha hsp17.7 G4* apreciable a los 35°C, máxima a los 40°C y que decaía ligeramente a los 45°C. En cambio, en las hibridaciones con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* con los mismos extractos de ARN, no detectamos acumulación del ARNm *Ha hsp17.6 G1* a ninguna de las temperaturas ensayadas ni siquiera tras exposiciones más largas de las autorradiografías (figura 7).



**Figura 7. Ausencia de acumulación del ARNm Ha hsp17.6 G1 en girasol en respuesta a choques térmicos a distintas temperaturas.** Experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A de muestras de ARN total extraídas de germínulas de girasol de 4 dpi sometidas a tratamientos de 2 h 30 min a 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 °C (temperatura indicada sobre los carriles). Las muestras se hibridaron con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* o del gen *Ha hsp17.7 G4* (indicado sobre los carriles). Los carriles "p1 y p4" muestran las ribosondas sin digerir de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* respectivamente. La flecha indica la distancia a la que migra la banda correspondiente a los fragmentos de ARN protegidos por la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* y los asteriscos la distancia a la que migrarían las bandas protegidas por la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1*. En la parte inferior se muestran esquemas de los genes y las ribosondas utilizadas (flechas bajo las secuencias) así como los fragmentos protegidos tras la digestión (segmentos bajo las flechas). Las flechas sobre las secuencias indican los sitios de iniciación de la transcripción. Para el resto de las leyendas ver la figura 6.

En plantas de girasol sometidas a estrés hídrico por desecación se habían detectado ARNs con alta homología al ADNc *Ha hsp17.6* mediante hibridaciones tipo Northern (Almoguera *et al*, 1993). Para distinguir entre si la señal observada en estos experimentos se debía a los ARNs *Ha hsp17.6 G1* o a otros ARNs con alta homología realizamos experimentos de protección frente a la digestión de la ribonucleasa A con extractos de ARN total de plantas sometidas a estrés hídrico por desecación (ver materiales y métodos). En estos experimentos utilizamos las ribosondas de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* descritas (figura 8, esquemas) y extractos de ARN total de muestras de tallos de plantas adultas de girasol sometidas a estrés hídrico. Las hibridaciones de estos extractos de ARN con la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* confirmaron la acumulación de sus ARNms en tallos en respuesta al tratamiento de estrés hídrico ensayado (figura 8, panel B y Coca *et al*, 1996). En cambio, las hibridaciones de los mismos extractos con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* mostraron que el ARNm *Ha hsp17.6 G1* no se acumulaba en tallos en respuesta a este tratamiento (figura 8, panel A).

El ADNc *Ha hsp17.6* se aisló a partir de una genoteca de ADNc de semillas, lo que indicaba que el gen *Ha hsp17.6 G1* se debía expresar durante la embriogénesis zigótica del girasol en ausencia de estrés. En Coca *et al* (1996) se había demostrado la acumulación de los ARNms del gen *Ha hsp17.7 G4*, homólogo al gen *Ha hsp17.6 G1*, en embriones de girasol de 18 y 24 dpa y su desaparición tras la germinación,



**Figura 8.** Ausencia de acumulación del ARNm *Ha hsp17.6 G1* en plantas adultas de girasol sometidas a estrés hídrico. Experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A de muestras de ARN total extraídas de los tallos de plantas adultas de girasol sometidas (D) o no (C) a estrés hídrico por desecación. El panel A corresponde al resultado de las hibridaciones de las muestras de ARN con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* y el panel B a las hibridaciones con la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4*. El carril "s" corresponde a la hibridación con ARN total de semillas secas de girasol. Los carriles "p1 y p4" muestran respectivamente las ribosondas de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7*

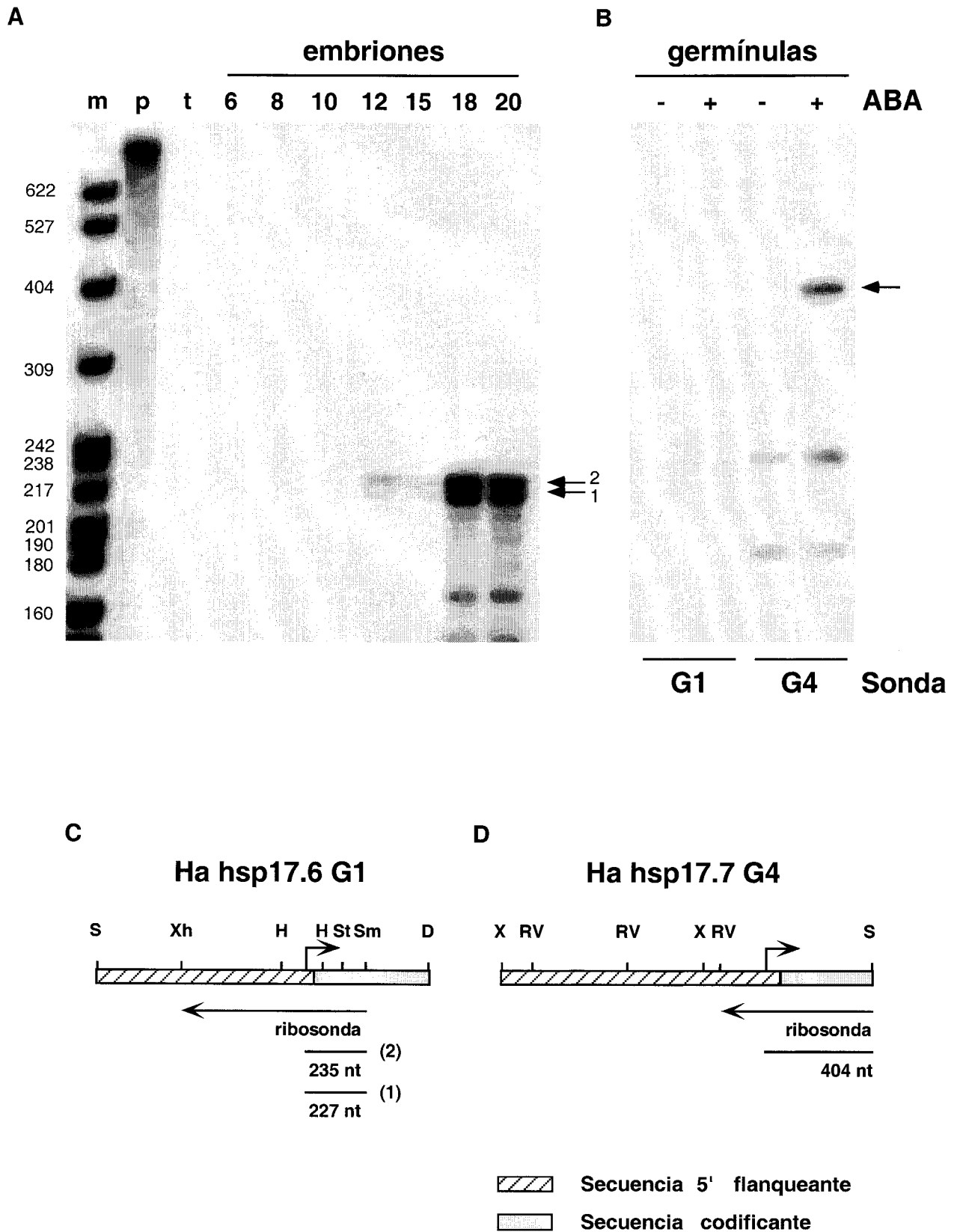
*G4* sin digerir. Las flechas junto a las autorradiografías indican la posición de las bandas correspondientes a los fragmentos de ARN protegidos. La exposición del panel A corresponde a 6 días y la del B a 12 h. Los paneles C y D muestran esquemas de los genes y las ribosondas utilizadas (flechas bajo las secuencias) así como los fragmentos protegidos tras la digestión (segmentos bajo las flechas). Las flechas sobre las secuencias indican los sitios de iniciación de la transcripción. Para el resto de las leyendas ver la figura 6.

mediante experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A. Por ello, dedicamos estudiar con más detalle el patrón de acumulación de los ARNm *Ha hsp17.6 G1* durante el desarrollo embrionario y la germinación del girasol.

Realizamos experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A con extractos de ARN total de germínulas y embriones de girasol cultivados en condiciones de humedad y temperatura controladas. Las hibridaciones de estos extractos con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* (figura 9, panel C) mostraron que el ARNm *Ha hsp17.6 G1* se empezaba a acumular levemente entre los 12 y 15 dpa para alcanzar su nivel máximo a los 18 dpa (figura 9, panel A). El nivel alcanzado a los 18 dpa se mantenía hasta el final de la embriogénesis (figura 9, panel A). Por consiguiente, la acumulación del ARNm *Ha hsp17.6 G1* coincidió con la fase de desecación de la embriogénesis. El ARNm *Ha hsp17.6 G1* desaparece tras la germinación y no se detecta a los 4 dpi (figura 9, panel B).

También se había demostrado que en germínulas de girasol de 3 dpi, tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de ABA provocaban la acumulación de ARN de genes con alta homología al ADNc *Ha hsp17.6* (Almoguera y Jordano, 1992). Por ello estudiamos también el posible efecto de la hormona vegetal ABA sobre el patrón de acumulación del ARNm *Ha hsp17.6 G1*. Hibridamos extractos de ARN total de germínulas de 4 dpi tratadas o no con ABA con las ribosondas de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* descritas (figura 9, paneles C y D respectivamente). Las hibridaciones con la ribosonda del gen *Ha hsp17.7 G4* confirmaron la acumulación del ARNm *Hsp17.7 G4* en estas germínulas en respuesta al tratamiento aplicado (figura 9, panel B y Coca *et al.*, 1996). En cambio, en las hibridaciones con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* no detectamos acumulación de ARNm *Ha hsp17.6 G1* (figura 9, panel B).

Los resultados obtenidos (figuras 6, 7, 8 y 9) mostraron un patrón de acumulación de los ARNm del gen *Ha hsp17.6 G1* que carecía de precedentes entre los demás genes *shsp* de plantas estudiados hasta el



**Figura 9.** Acumulación del ARNm Ha hsp17.6 G1 durante la embriogénesis del girasol y en sus germínulas. Experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A con muestras de ARN total extraídas de embriones de girasol de 6, 8, 10, 12, 15, 18 y 20 dpa (edades indicadas sobre los carriles) y germínulas de 4 dpi



sometidas (+) o no (-) a tratamientos con ABA. Los extractos de ARN total de embriones (panel A) se hibridaron con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1*. Las muestras de germínulas (panel B) se hibridaron con la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* (carriles G1) o del gen *Ha hsp17.7 G4* (carriles G4). El carril "p" muestra la ribosonda del gen *Ha hsp17.6 G1* sin digerir. Los paneles C y D muestran esquemas de los genes y las ribosondas utilizadas (flechas bajo las secuencias) así como los fragmentos protegidos tras la digestión (segmentos bajo las flechas). Las flechas sobre las secuencias indican los sitios de iniciación de la transcripción. Para el resto de las leyendas ver la figura 6.

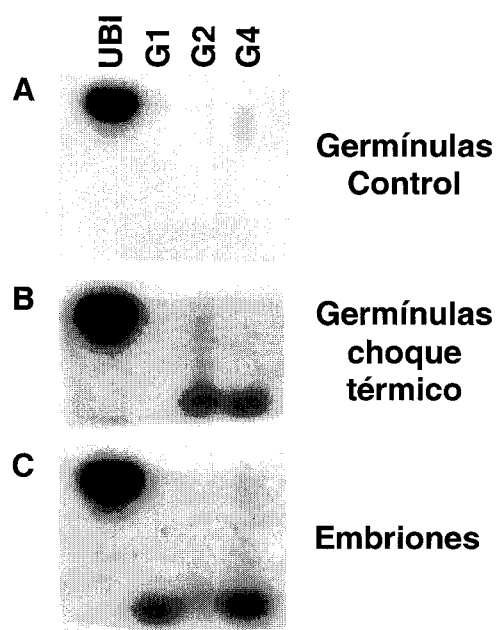
momento. En contra de lo que ocurre con otros genes *shsp*, los ARNms *Ha hsp17.6 G1* no se acumularon por los tratamientos de choque térmico ensayados ni a distintas temperaturas ni en distintos estadios del desarrollo (germínulas o plantas adultas) (figuras 6 y 7). Tampoco detectamos acumulación de los ARNms *Ha hsp17.6 G1* en respuesta a estrés hídrico por desecación (figura 8) o a tratamientos con ABA (figura 9, panel B). Sin embargo, los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* se acumularon claramente durante la fase de desecación de la embriogénesis y se dejaron de detectar poco después de la germinación (figura 9).

#### **4. El gen *Ha hsp17.6 G1* no se transcribe en respuesta a choque térmico en germínulas.**

Mediante los experimentos de protección frente a la digestión con ribonucleasa A determinamos la ausencia de acumulación de los ARNm *Ha hsp17.6 G1* bajo las condiciones de choque térmico ensayadas (figuras 6 y 7). Sin embargo, no podíamos asegurar que el gen *Ha hsp17.6 G1* no se transcribiese bajo dichas condiciones. Alternativamente el gen *Ha hsp17.6 G1* se podría transcribir en respuesta a los tratamientos de choque térmico pero sus ARNms podrían ser tan inestables que no se llegasen a acumular hasta niveles detectables por las técnicas empleadas.

Para distinguir entre estas dos posibilidades realizamos experimentos de transcripción *in vitro* con núcleos aislados. Recolectamos embriones de girasol de 20 a 24 dpa y germínulas de 14 dpi tratadas 40 min a 25°C o a 40°C para aislar los núcleos. Las extracciones de núcleos se realizaron a 0°C para minimizar la transcripción durante el proceso de extracción (ver materiales y métodos). Posteriormente favorecimos la continuación de la

transcripción de los ARNs en presencia de  $P^{32}\alpha$ UTP, para que éstos quedasen marcados radiactivamente (materiales y métodos). Tras purificar los ARNs los hibridamos con filtros que contenían sondas específicas para los genes *Ha hsp17.6 G1*, *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2* (descritas en materiales y métodos). Para controlar la actividad de la ARN polimerasa II incluimos en los filtros una sonda del ADNc *Ha ubiS* que hibridaba con genes de poliubiquitina de girasol (ver materiales y métodos). Los ARNs con los que hibridaba dicha sonda se acumulan a altos niveles bajo todas las condiciones experimentales ensayadas (Almoguera *et al*, 1995).



**Figura 10.** Experimentos de transcripción *in vitro* con núcleos aislados. Purificamos los ARNs transcritos en núcleos aislados de germínulas de girasol de 14 dpi, tratadas durante 40 min a 25°C (panel A) o a 40°C (panel B) y de embriones de 20-24 dpa (panel C). Estos ARNs se hibridaron con filtros que contienen sondas específicas para los genes *Ha hsp17.6 G1* (G1), *Ha hsp18.6 G2* (G2) y *Ha hsp17.7 G4* (G4) y una sonda del gen de poliubiquitina de girasol *Ha ubiS* (UBI).

En los experimentos de transcripción *in vitro* con núcleos aislados de embriones sin estresar detectamos una clara señal debida a la transcripción de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* y sólo una ligera señal debida a la del gen *Ha hsp18.6 G2* (figura 10, panel C). En cambio, con los núcleos aislados de germínulas de 14 dpi sin estresar no detectamos la transcripción de ninguno de estos genes (figura 10, panel A). La fuerte señal obtenida en este experimento con la sonda del

ADNc Ha ubiS nos indicó que la ausencia de transcripción de los tres genes mencionados no se debía a la inactivación de la ARN polimerasa II. Los experimentos realizados con núcleos aislados de germínulas de 14 dpi tratadas 40 min a 40°C mostraron una clara señal correspondiente a la transcripción de los genes *Ha hsp17.7 G4* y *Ha hsp18.6 G2* (figura 10, panel B). Sin embargo, en estos experimentos no detectamos ninguna señal correspondiente a la transcripción del gen *Ha hsp17.6 G1* (figura 10, panel B), lo que demuestra que este gen no se transcribe en germínulas tras el tratamiento de choque térmico.

Confirmamos así que el patrón de acumulación de los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* carece de precedentes entre los demás genes *shsp* de planta estudiados. En contra de lo que ocurre con los demás genes *shsp*, el gen *Ha hsp17.6 G1* no se transcribe por los tratamientos de choque térmico ensayados en germínulas (figura 10, panel B). Sin embargo, los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* se transcriben claramente durante la fase de desecación de la embriogénesis (figura 10, panel C) y dejan de hacerlo poco después de la germinación (figura 10, panel A).

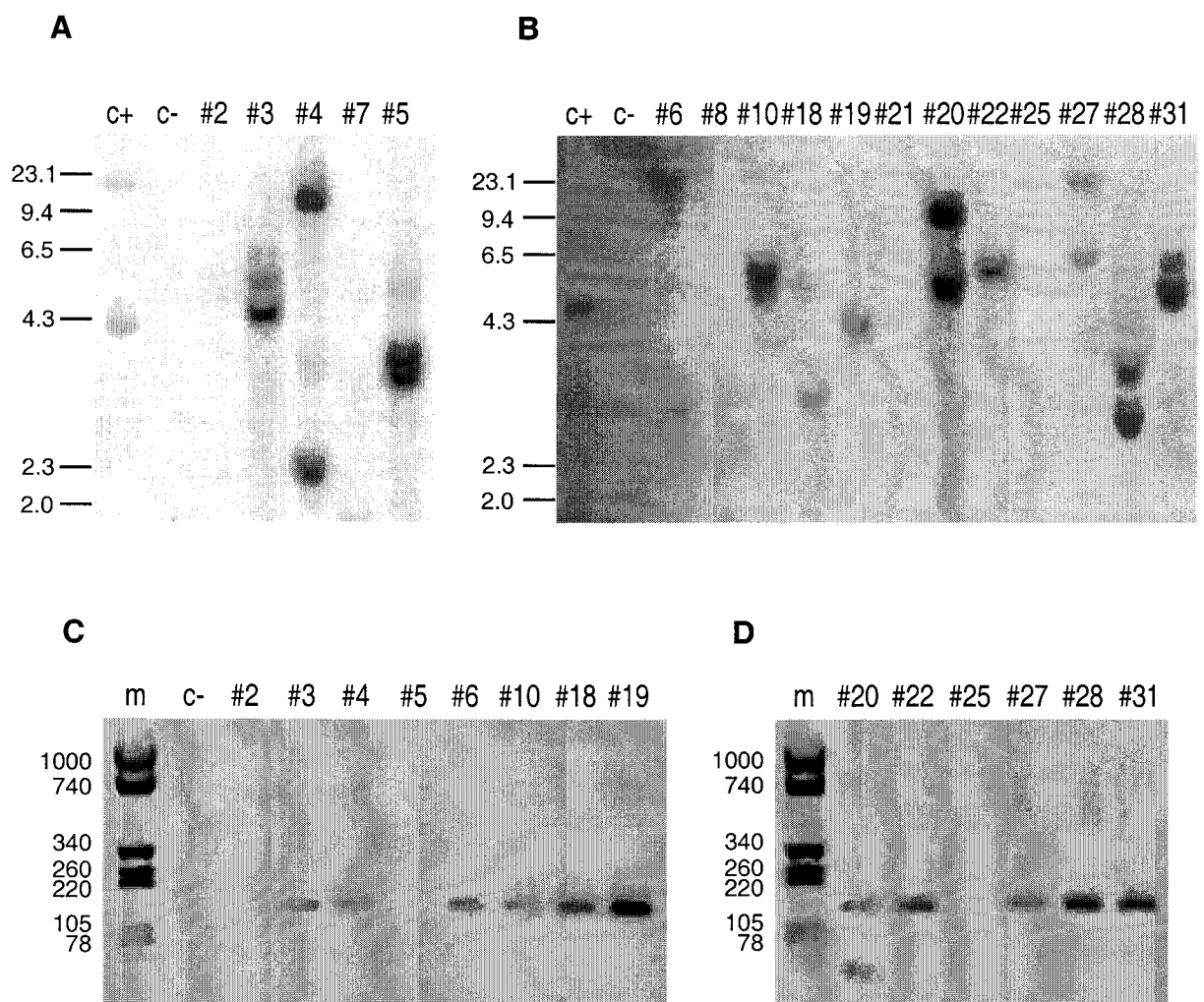
### **5. El gen quimérico -1486::GUS reproduce en plantas transgénicas de tabaco el patrón de expresión del gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol.**

Como se demostró en apartados anteriores, el gen *Ha hsp17.6 G1* no se transcribe por los tratamientos de choque térmico ensayados en germínulas (figura 10, panel B). Tampoco detectamos acumulación de sus ARNms en respuesta a los choques térmicos ensayados en distintos estadios del desarrollo o distintos órganos (figuras 6 y 7). Sin embargo, los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* se transcriben durante la fase de desecación de la embriogénesis (figura 10, panel C) y dejan de hacerlo poco después de la germinación (figura 10, panel A). Este patrón de expresión carecía de precedentes entre los genes *shsp* de planta por lo que nos propusimos analizar los elementos reguladores en *cis* responsables de dicha expresión.

Para estudiar los elementos reguladores en *cis* implicados en la regulación del gen *Ha hsp 17.6 G1* decidimos realizar fusiones traduccionales, de versiones modificadas del promotor de dicho, gen al gen delator *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa). Construimos fusiones traduccionales en lugar de transcripcionales porque en los últimos años se han descrito muchos casos en los que las secuencias transcritas participan



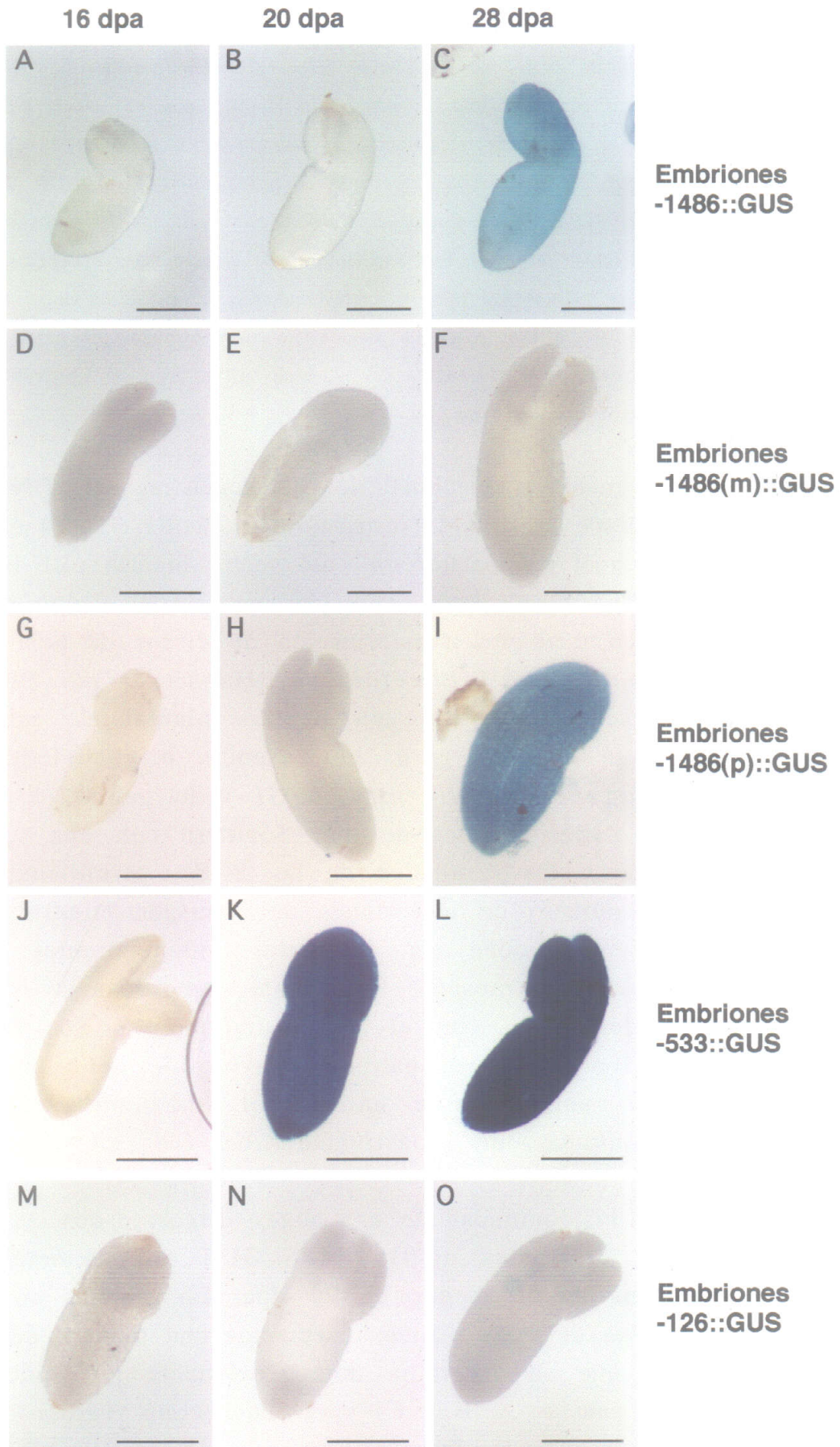
en la regulación de la expresión de genes en plantas (Taylor, 1997). Elegimos el gen *gus* como delator porque su actividad es muy fácil de cuantificar mediante reacciones fluorimétricas y de localizar en tejidos mediante ensayos histoquímicos. Decidimos introducir estos genes quiméricos tabaco por las dificultades técnicas que conlleva la regeneración de plantas de girasol a partir de células transformadas. Previamente se había demostrado que una fusión traduccional del gen de girasol *Ha hsp17.7 G4* al gen *gus* reproducía en tabaco el patrón de expresión observado para el gen *Ha hsp17.7 G4* en girasol (Coca *et al*, 1996). No obstante, en primer lugar comprobamos que la región del promotor del gen *Ha hsp 17.6 G1* que queríamos estudiar, fusionada al gen delator *gus*, reproducía en tabaco el patrón de expresión observado para el gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol.

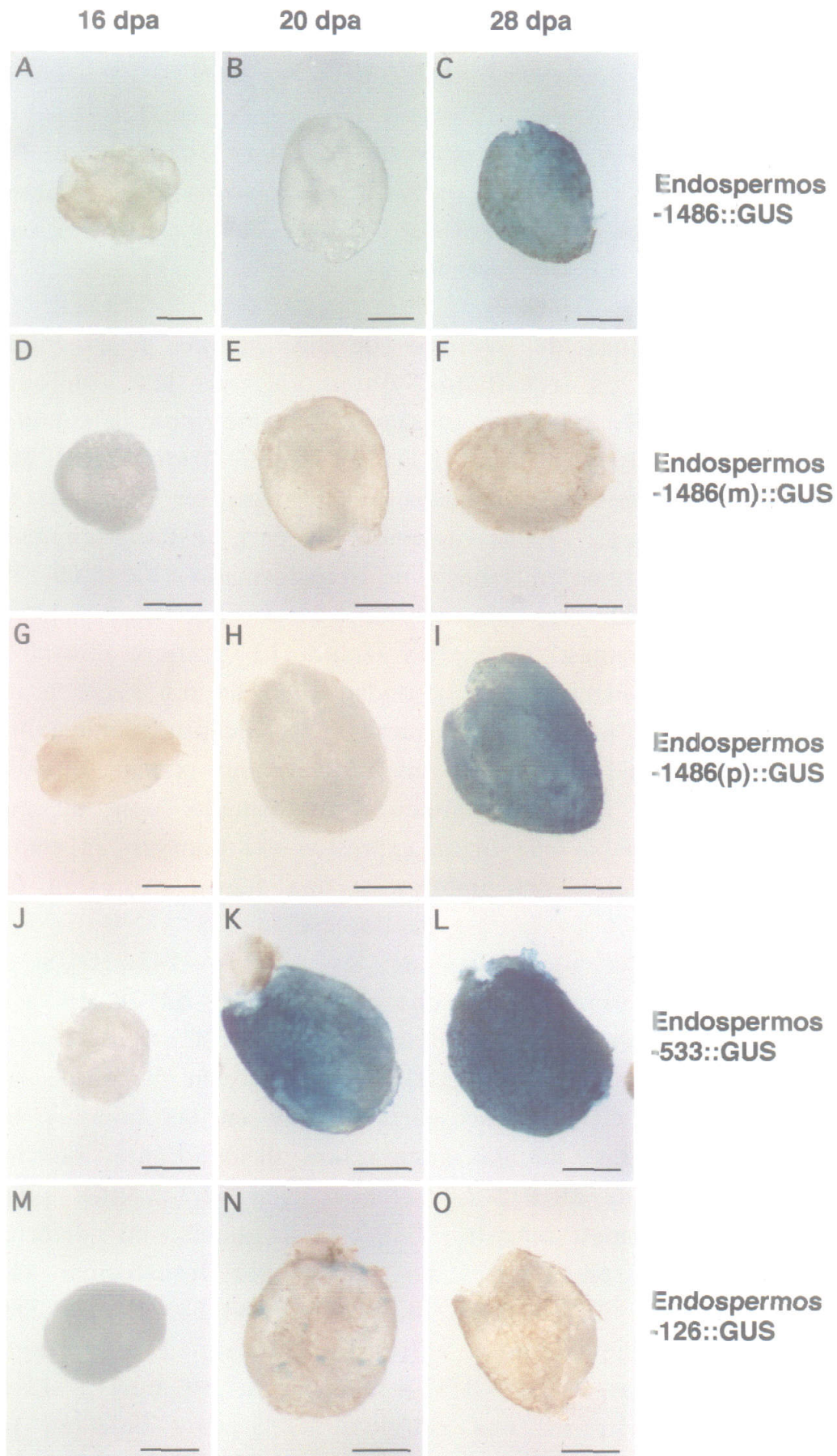


**Figura 11. Determinación de la presencia del transgén -1486::GUS y su número de copias en plantas de tabaco.** Los paneles A y B corresponden a ejemplos de hibridaciones de tipo Southern de ADNs de las plantas de tabaco transformadas con el gen quimérico -1486::GUS, digeridos con la enzima de restricción HindIII, con una sonda del gen *gus*. Sobre cada carril figura el número correspondiente a cada planta. Como control negativo (C-) se utilizó ADN de tabaco no transformado y como control positivo (C+) ADN de un plásmido con dicho gen -1486::GUS. A la izquierda de los paneles A y B aparece el tamaño en Kb del marcador de peso molecular utilizado. Los paneles C y D corresponden a experimentos de PCR con el ADN de estas plantas (su número correspondiente figura sobre cada carril). Como control negativo (C-) se utilizó ADN de tabaco no transformado. El carril "m" corresponde al marcador de peso molecular (ADN del plásmido pBluescript SK digerido con Sau 3A) y a su izquierda aparece su tamaño en pb.

Construimos una fusión traduccional de las secuencias de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1*, desde el sitio de restricción de EcoRI (-1486) al de StyI (+121), en fase con el gen delator *gus* del vector binario pBI 101.2 (Jefferson *et al.*, 1987). Introdujimos este gen quimérico, denominado -1486::GUS, en tabaco mediante transformación de discos de hoja por infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.*, 1985). Determinamos la presencia del transgén en las plantas de tabaco transformadas mediante PCR (figura 11) usando oligonucleótidos específicos del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* y del gen *GUS* (ver materiales y métodos). Hibridaciones de tipo Southern con una sonda del gen *GUS* confirmaron los resultados de las PCRs, permitiéndonos además determinar el número de inserciones del transgén (figura 11). De esta forma obtuvimos doce transformantes independientes con entre una y tres copias del transgén. Finalmente comprobamos si las plantas transgénicas de tabaco con el gen quimérico -1486::GUS (plantas -1486::GUS) reproducían el patrón de expresión del gen *Ha hsp17.6 G1*, descrito anteriormente en girasol, mediante ensayos fluorimétricos e histoquímicos de la actividad GUS (ver materiales y métodos).

En las tinciones histoquímicas de embriones diseccionados de las plantas transgénicas originales (T0) -1486::GUS no detectamos actividad GUS en semillas de menos de 24 dpa. En cambio en las semillas de 24 y 28 dpa de estas plantas detectamos una tinción, debida a la actividad GUS, que se distribuía homogéneamente por todo el embrión (Figura 12.1, paneles A, B y C) y el endospermo (Figura 12.2, paneles A, B y C). Los ensayos fluorimétricos, de mayor sensibilidad,



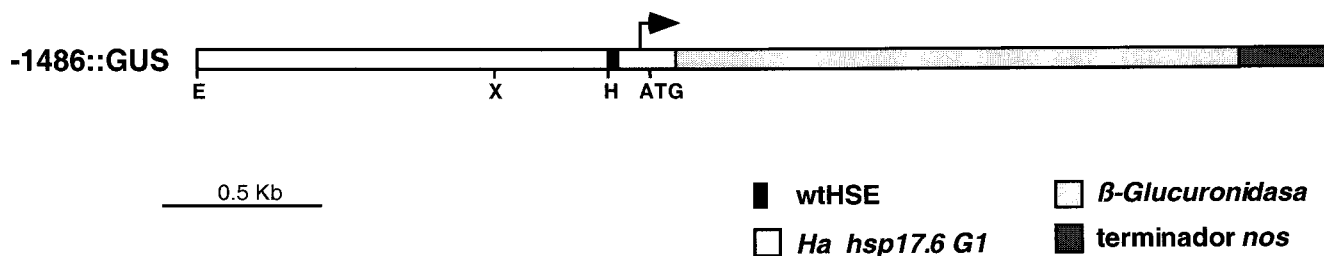
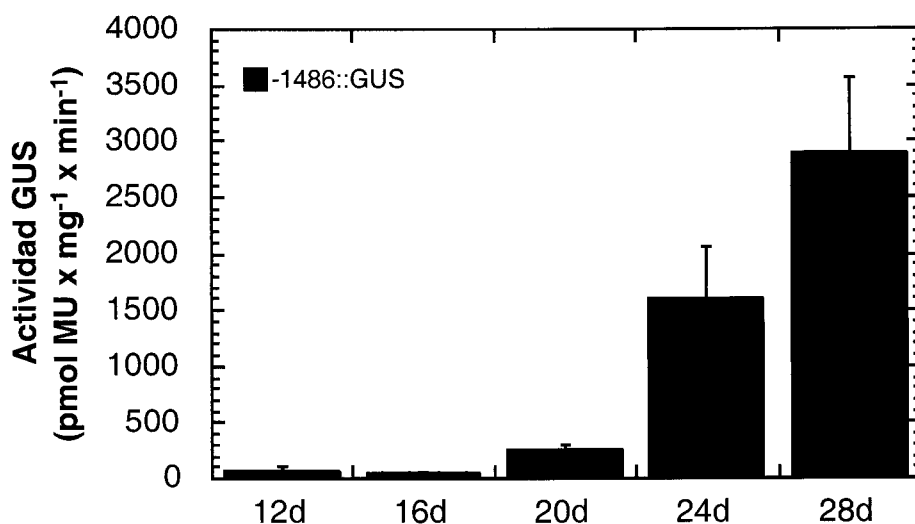


**Figura 12. Tinciones histoquímicas durante el desarrollo embrionario de las plantas transgénicas.** Localización de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en embriones (12.1) y endospermos (12.2) diseccionados de semillas de 16, 20 y 28 dpa. Se analizaron embriones de dos cápsulas de al menos 8 plantas transformantes originales para las construcciones -1486::GUS (paneles A, B y C), -1486(m)::GUS (D, E y F), -1486(p)::GUS (G, H e I), -533::GUS (J, K y L) y -126::GUS (M, N y O). Hemos seleccionado fotografías de material representativo para cada edad y tipo de planta. El tiempo de tinción es de 16 h a 25°C en todos los casos. Las barras de escala corresponden a 300  $\mu$ m.

con extractos de proteínas de semillas de las plantas transgénicas -1486::GUS apoyaron los resultados obtenidos en las tinciones histoquímicas (figura 13). En estos ensayos fluorimétricos detectamos una actividad GUS a los 16 y 20 dpa ( $31,1 \pm 23,9$  y  $239 \pm 66,2$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente), demasiado baja para ser detectada en los ensayos histoquímicos. Estas actividades eran estadísticamente superiores a las encontradas en tabaco no transformado ( $F= 5,69$ ,  $P= 0,02$  y  $F=15,96$ ,  $P= 0,002$ , respectivamente). Los ensayos fluorimétricos de las semillas de las plantas -1486::GUS (figura 13, gráfica) mostraron también que había un aumento de la actividad GUS de 6.6 veces a los 24 dpa ( $1585 \pm 479$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ ) y se alcanzaba el máximo de actividad a los 28 dpa ( $2880 \pm 679$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ ). Estos experimentos mostraron que en tabaco transformado con el gen quimérico -1486::GUS había una ligera expresión del transgén en etapas tempranas de la maduración del embrión y una fuerte expresión del mismo por todo el embrión en la fase de desecación.

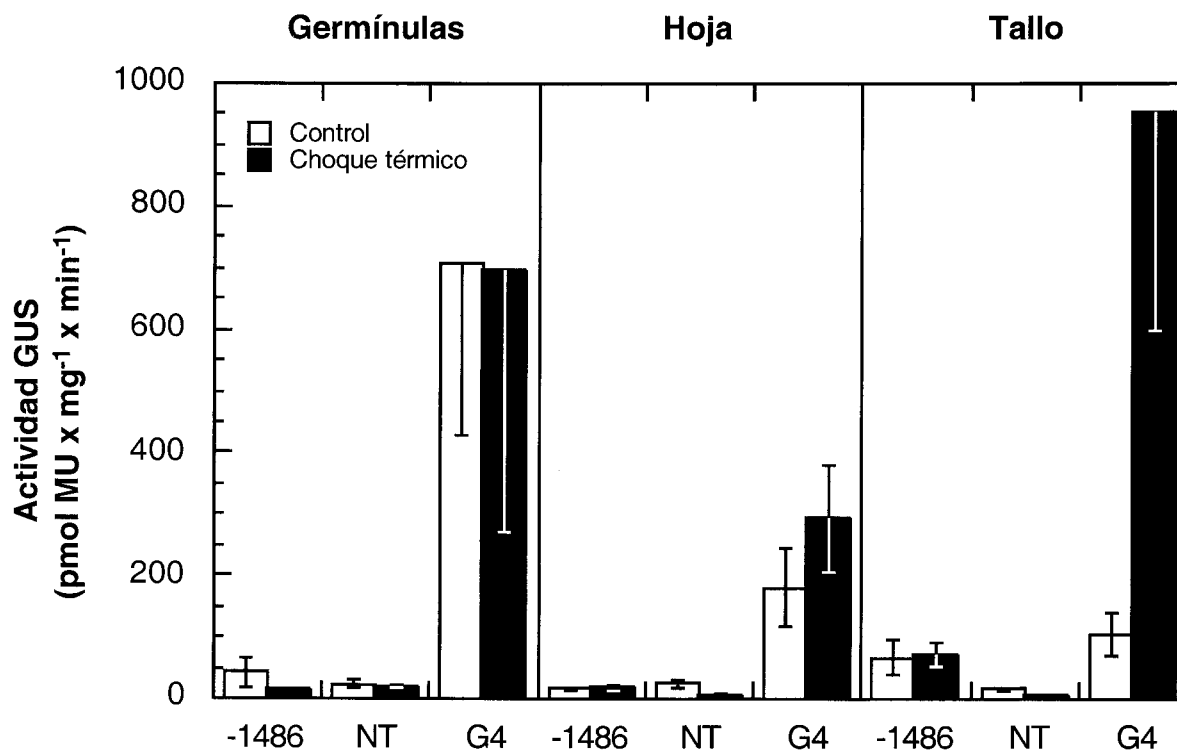
Para estudiar la actividad GUS de las plantas -1486::GUS en respuesta a un choque térmico sometimos a germínulas de 20 dpi y a plantas adultas a tratamientos de 2 h 30 min a 25 o 42°C. Los ensayos fluorimétricos con plantas -1486::GUS sin estresar (figura 14) mostraron una actividad GUS en las germínulas y en las hojas y los tallos de plantas adultas de la generación descendiente de los transformantes T0 (T1) de  $10,3 \pm 2,4$ ;  $15,6 \pm 3,1$  y  $67,3 \pm 29,1$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  respectivamente. Estas actividades no diferían estadísticamente de las encontradas en tabaco sin transformar ( $F= 0,002$ ,  $P= 0,968$ ;  $F= 0,734$ ,  $P= 0,393$  y  $F=1,28$ ,  $P= 0,259$ , respectivamente para germínulas, tallos y hojas). Los ensayos fluorimétricos con plantas -1486::GUS tratadas 2 h 30 min a 42°C (figura 14) también mostraron una actividad GUS muy baja en las germínulas y en hojas y tallos de plantas adultas ( $11,7 \pm 2,7$ ;  $18,7 \pm 3,9$





**Figura 13. Ensayos fluorimétricos de actividad GUS durante el desarrollo embrionario de las plantas transgénicas -1486::GUS.** Analizamos la actividad GUS en embriones de 12, 16, 20, 24 y 28 dpa de 12 transformantes originales de las plantas -1486::GUS (edad indicada bajo las columnas). Realizamos al menos dos extractos de proteínas correspondientes, cada uno, a embriones de dos o más cápsulas de cada planta transgénica analizada. En la figura se muestran las medias de las actividades GUS medidas en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. La barra que aparece sobre cada medida representa su error estándar. Bajo la gráfica se muestra un esquema de la construcción -1486::GUS. La flecha indica el inicio de la transcripción del gen *Ha hsp17.6 G1* y el ATG su inicio de la traducción. La región de su HSE (wtHSE) se indica mediante un cuadrado negro. Los sitios de restricción indicados son: H=HindIII, E=EcoRI, y X=XhoI.

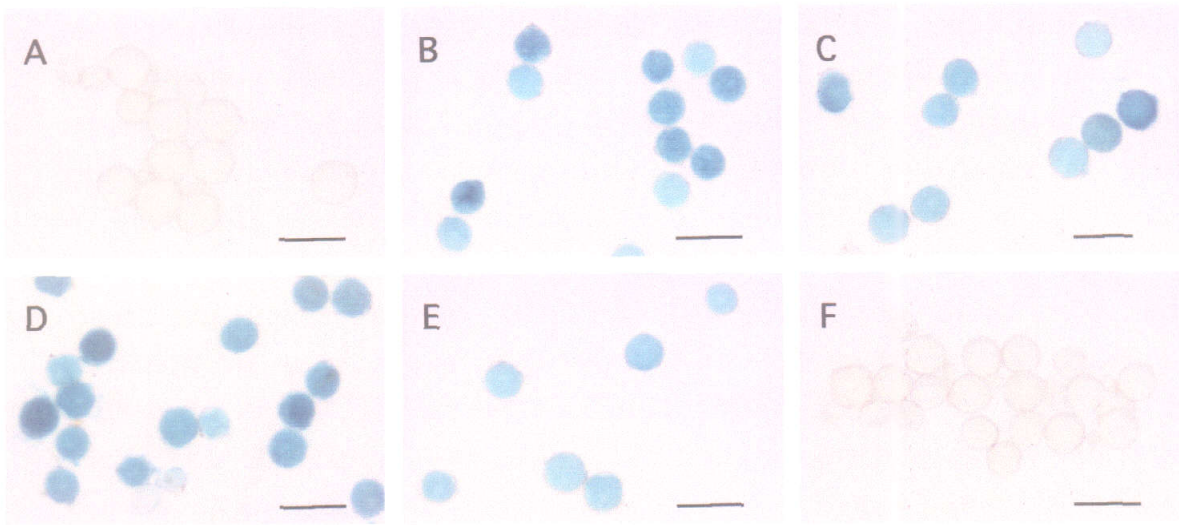
y  $70,2 \pm 19,7$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> respectivamente). Estas actividades GUS no diferían significativamente de las observadas en ausencia de estrés térmico (F= 0,061, P= 0,807; F= 0,188, P= 0,665 y F=1,208, P= 0,273, respectivamente para germínulas, tallos y hojas). Estos experimentos mostraron que en las plantas de tabaco -1486::GUS no hay actividad GUS significativamente distinta de la encontrada en



**Figura 14. Experimentos de choque térmico con germínulas y plantas adultas -1486::GUS.** Sometime germínulas de 20 dpa y plantas de 2 meses a tratamientos de 2 h 30 min a 42°C (choque térmico) o a 25°C (control). Se analizaron aproximadamente 100 germínulas T1, descendientes de 5 plantas transformantes originales (T0) para la construcción -1486::GUS (-1486), un número equivalente de germínulas descendientes de 3 transformantes T0 para la fusión traduccional Ha hsp17.7 G4::GUS (G4) (Coca *et al.*, 1996) y germínulas de plantas de tabaco sin transformar (NT). Analizamos las hojas y los tallos de tres plantas T1 adultas descendientes de 5 plantas transformantes T0 para la construcción -1486::GUS (-1486), 5 descendientes T1 de 3 plantas T0 para la fusión traduccional Ha hsp17.7 G4::GUS (G4) y de 6 plantas de tabaco sin transformar (NT). En la figura se muestran las medias de las actividades GUS medidas en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Las barras que aparecen sobre cada medida representan su error estándar.

tabaco sin transformar ni en las germínulas ni en los tallos o las hojas de las plantas adultas ni siquiera tras un tratamiento de 2 h 30 min a 42°C.

Los ensayos histoquímicos con el polen maduro de las plantas -1486::GUS de la generación T0 mostraron una clara actividad GUS (figura 15). Esta actividad se debía al transgén pues en los ensayos histoquímicos con el polen de las plantas sin transformar no detectamos esta tinción (figura 15, comparar los paneles A y B). Los



**Figura 15.** Tinciones histoquímicas de granos de polen maduro de las plantas transgénicas de tabaco de la generación T0. Detección histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en gránulos de polen. Se analizó el polen de 11 plantas -1486::GUS (panel B), 13 plantas -1486(m)::GUS (panel C), 18 plantas -1486(p)::GUS (panel D), 14 plantas -533::GUS (panel E), 11 plantas -126::GUS (panel F) y de plantas de tabaco sin transformar (panel A). Hemos seleccionado fotografías de material representativo para cada construcción. Las barras de escala corresponden a 40  $\mu$ m.

ensayos fluorimétricos cuantificaron esta actividad GUS de las plantas -1486::GUS en una media de  $1361 \pm 296$  pmol MU  $\times$  mg<sup>-1</sup>  $\times$  min<sup>-1</sup>.

En resumen, los análisis de las plantas transgénicas de tabaco -1486::GUS mostraron una actividad GUS alta durante la fase de desecación del embrión (figura 13). Las tinciones histoquímicas mostraron que la actividad GUS se distribuía uniformemente en los embriones y los endospermos diseccionados de estas plantas (figura 12.1 y 12.2, paneles A, B y C). Por lo tanto, la actividad GUS obtenida con los embriones de las plantas -1486::GUS (figura 13) concuerda con el patrón de acumulación de los ARNms del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la fase de desecación del embrión en girasol (figura 9, panel A). La ausencia de actividad GUS en las germínulas y en los tallos y las hojas de las plantas adultas -1486::GUS tratadas o no 2 h 30 min a 42°C (figura 14), también concuerda con la falta de transcripción del gen *Ha hsp17.6 G1* en las germínulas de girasol sometidas o no a choque térmico (figura 10, paneles A y B) y con la falta de acumulación de sus ARNms en las plantas adultas de girasol en respuesta a un choque térmico (figura 6, panel superior). Por lo tanto, el gen quimérico

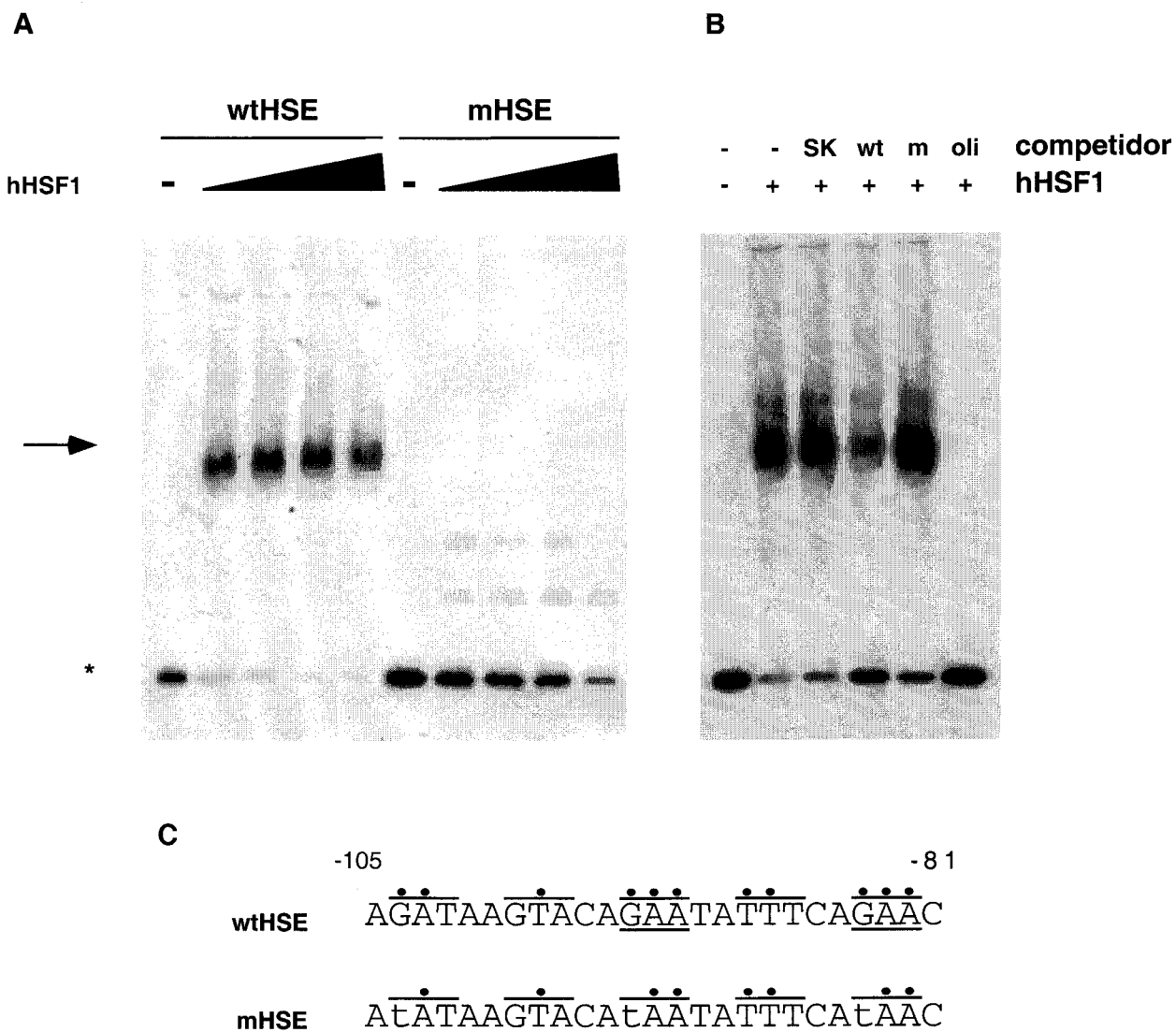
-1486::GUS reproduce en tabaco el patrón de expresión observado para el gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol. De esta forma podemos concluir que el sistema heterólogo de tabaco utilizado en nuestros experimentos reproduce la expresión durante la embriogénesis zigótica de los dos genes de *shsp* de girasol estudiados en nuestro laboratorio: *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* (Coca *et al*, 1996).

En polen se ha observado actividad GUS con dos genes quiméricos que contienen la región promotora de distintos genes *shsp* de tipo I de girasol: *Ha hsp17.6 G1::GUS* y *Ha hsp17.7 G4::GUS* (Coca *et al*, 1996). Esta actividad GUS pudiera reflejar una activación natural de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* en polen de girasol. De hecho existen múltiples precedentes de expresión de genes *shsp* en polen (Mascarenhas, 1996). Sin embargo, no podemos descartar que la actividad GUS observada sea una expresión ectópica del gen quimérico en tabaco debida al uso del gen GUS como delator (discutido en Uknes *et al*, 1993).

#### **6. El HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesario para la expresión del gen quimérico -1486::GUS en embriones de tabaco transgénico.**

Para estudiar las regiones del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* implicadas en su regulación realizamos deleciones de la región 5' flanqueante o modificamos el posible HSE. Estas modificaciones del gen *Ha hsp17.6 G1* se hicieron a partir del gen quimérico -1486::GUS y se analizaron en plantas transgénicas de tabaco. Como el gen quimérico -1486::GUS reprodujo en tabaco el patrón de expresión observado para el gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol, los resultados obtenidos con las modificaciones de la construcción -1486::GUS debieran reflejar lo que ocurriría con las mismas modificaciones en el gen *Ha hsp17.6 G1* en girasol.

Para determinar la importancia del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* en la regulación de dicho gen introdujimos tres mutaciones puntuales (cambiamos la G por una T) en las segundas posiciones de los pentanucleótidos nGAAn (ver figura 16, esquema). Unas mutaciones análogas a las aquí descritas redujeron drásticamente la activación del gen delator GUS, bajo el control del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* durante la fase de desecación del desarrollo embrionario (Almoguera *et al*, 1998).



**Figura 16. Efecto de la mutación del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* sobre la unión del hHSF1.** El panel A muestra los experimentos de unión *in vitro* del hHSF1 a un fragmento de ADN de 175 pb del gen *Ha hsp17.6 G1* que incluye su HSE (wtHSE) o una versión mutada del mismo (mHSE). Las reacciones se realizaron sin un extracto con hHSE1 (-) o con cantidades crecientes de dicho extracto (2, 4, 5 y 10  $\mu$ g de extracto), indicado sobre el gel como triángulos. El símbolo \* indica la posición en el gel de los ADNs no unidos a proteínas. El panel B muestra los experimentos de competición con 2  $\mu$ g de extracto con hHSF1 (carriles +) o sin dicho extracto (carril -) y un exceso de fragmentos de ADN sin marcar. Los carriles "wt" y "m" corresponden a la competición con los fragmentos de ADN con la versión silvestre (wtHSE) o mutada (mHSE) del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* respectivamente y el carril "SK" con un fragmento de ADN del vector pBluescript SK<sup>+</sup> de 445 pb. El carril "oli" corresponde a la competición con un oligonucleótido que incluye un HSE sintético (Hübel y Schöffl, 1994). La autorradiografía del panel A corresponde a una exposición de 20 h y la del panel B a una exposición de 2 días. En la parte inferior de la figura se representa un esquema del wtHSE

entre las posiciones -105 y -81 y la zona correspondiente del mHSE. Los símbolos de este esquema están descritos en la figura 4.

En primer lugar, comprobamos que las mutaciones introducidas interferían en la unión del hHSF1 al HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* mediante experimentos de cambio en la movilidad electroforética de un fragmento de ADN (ver el apartado 2). Para ello marcamos radiactivamente un fragmento de ADN del gen *Ha hsp17.6 G1* (desde el sitio -126 al +50) que incluye su HSE (wtHSE) y el mismo fragmento con las mutaciones introducidas (mHSE). Tras incubar *in vitro* estos fragmentos de ADN marcados radiactivamente con un extracto de bacterias que superproducen hHSF1 (Rabindran *et al*, 1991) estudiamos el retraso en la movilidad electroforética del ADN (ver materiales y métodos). El retraso en la movilidad electroforética del fragmento de ADN con el wtHSE mostró su unión al hHSF1, como previamente se había demostrado (figuras 5 y 16, panel A). Sin embargo, en los ensayos con el fragmento de ADN con el mHSE no detectamos bandas correspondientes al complejo hHSF1/ADN marcado incluso con las mayores cantidades de extracto de hHSF1 ensayadas (figura 16 panel A). La banda correspondiente al complejo hHSF1/ADN wtHSE marcado se redujo notablemente en intensidad al competir con un exceso molar de 50 veces del mismo fragmento de ADN sin marcar o con el mismo exceso de un oligonucleótido (Hübel y Schöffl, 1994) que incluye un HSE sintético que se ajusta muy bien al consenso (figura 16, panel B). Sin embargo, la intensidad de la banda correspondiente al complejo hHSF1/ADN wtHSE marcado no se redujo al competir con el mismo exceso del fragmento de ADN que incluye el mHSE sin marcar (figura 16, panel B). Estos datos demostraron que el hHSF1 se une *in vitro* al fragmento del gen *Ha hsp17.6 G1* a través del HSE y que las mutaciones introducidas eliminan esta unión.

Una vez comprobado el efecto negativo de las mutaciones introducidas en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* sobre su unión al hHSF1 (figura 16) sustituimos, en el gen quimérico -1486::GUS, dicho HSE por su versión mutada (mHSE) (ver materiales y métodos y figura 17, panel C). Introdujimos este nuevo gen quimérico, denominado -1486(m)::GUS, en tabaco por transformación de discos de hoja por infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al*, 1985) y obtuvimos las plantas -1486(m)::GUS. Determinamos la presencia del transgén -1486(m)::GUS y su número de copias mediante PCR e

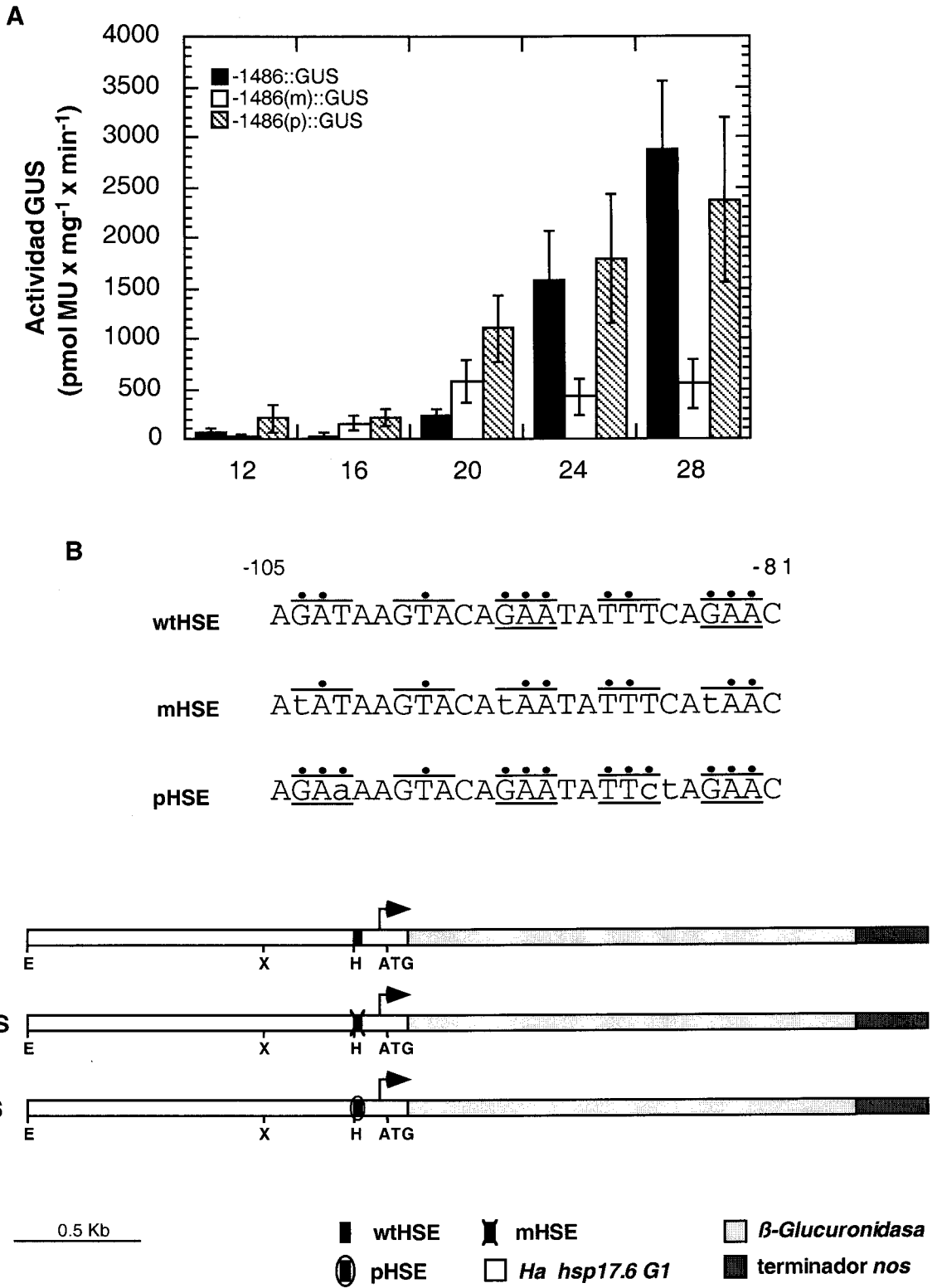


Figura 17. Ensayos fluorimétricos comparativos de la actividad GUS de las plantas transgénicas -1486::GUS, -1486(m)::GUS y -1486(p)::GUS durante el desarrollo embrionario. Analizamos la actividad GUS en embriones de 12, 16, 20, 24 y

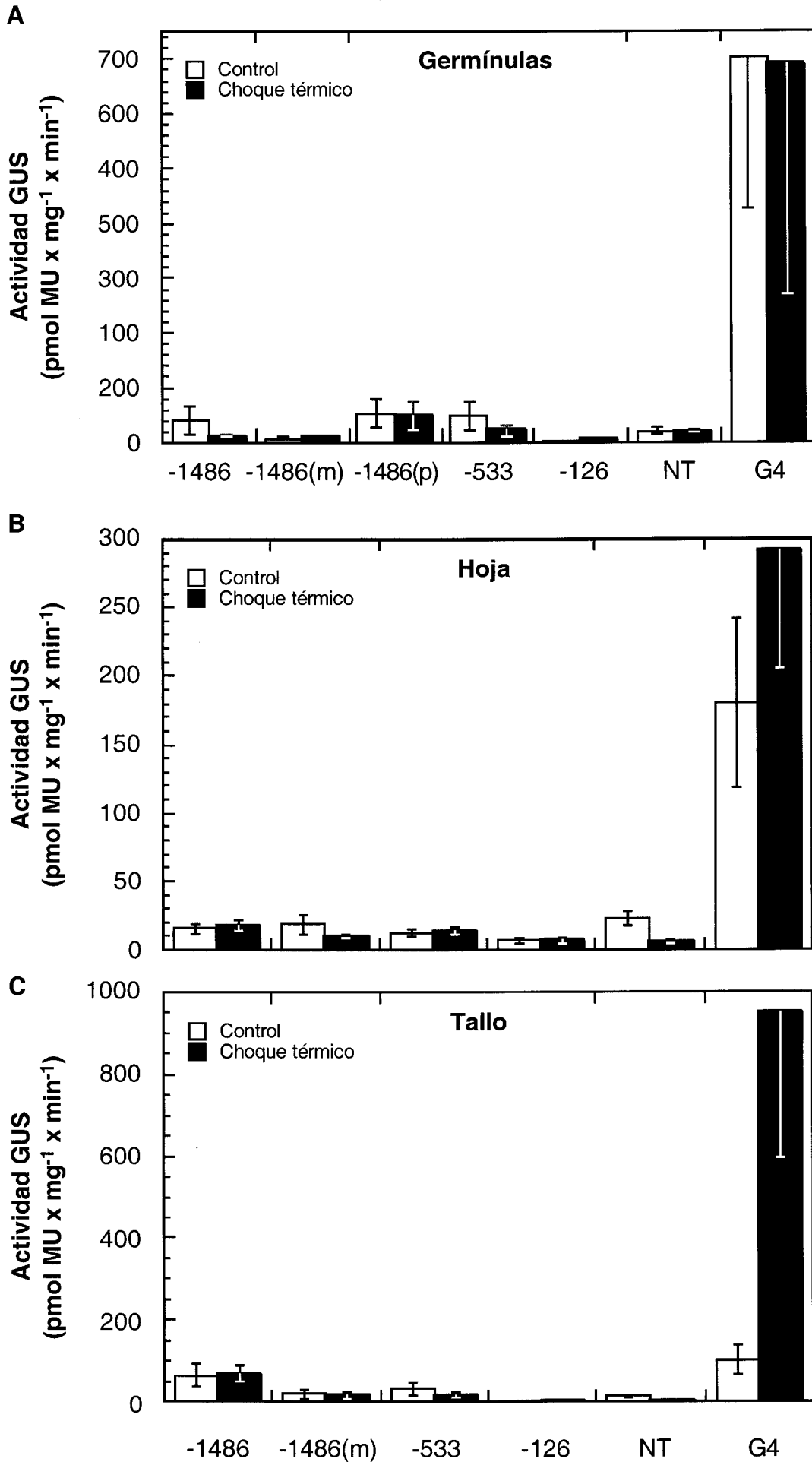
28 dpa (edades indicadas bajo las columnas). Analizamos 12 plantas de la construcción -1486::GUS, 13 de la -1486(m)::GUS y 14 de la -1486(p)::GUS. Realizamos al menos dos extractos de proteínas correspondientes, cada uno, a embriones de dos cápsulas de cada planta transgénica T0 analizada. En el panel A se muestran las medias de las actividades GUS en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. La barra que aparece sobre cada medida representa su error estándar. En el panel B se representa un esquema del wtHSE entre las posiciones -105 y -81 y la zona correspondiente del mHSE y del pHSE. Las mutaciones introducidas están escritas con minúsculas y el resto de los símbolos están descritos en la figura 4. El panel C muestra un esquema de los genes quiméricos ensayados y sus símbolos están descritos en la figura 13.

hibridaciones tipo Southern como se describió en el apartado anterior (datos no mostrados). Analizamos trece transformantes independientes que tenían entre una y tres copias del transgén *-1486(m)::GUS*. Finalmente analizamos el patrón de expresión del gen quimérico *-1486(m)::GUS* en las plantas de tabaco -1486(m)::GUS mediante ensayos fluorimétricos e histoquímicos de la actividad GUS.

En las tinciones histoquímicas de semillas diseccionadas de los transformantes originales (T0) de las plantas -1486(m)::GUS no detectamos actividad GUS en embriones diseccionados (figura 12.1, paneles D, E y F) o endospermos (figura 12.2, paneles D, E y F), a ninguna de las edades ensayadas. En cambio, en los ensayos fluorimétricos (figura 17, panel A) detectamos en las semillas de 16 y 20 dpa una actividad GUS de  $158,75 \pm 67,886$  y  $578,16 \pm 206,08$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, respectivamente. Dichas actividades no difieren significativamente de la hallada en las semillas correspondientes de las plantas -1486::GUS (F= 1,93, P= 0,17 y F= 0,48, P= 0,49, respectivamente). Sin embargo, en las semillas de 24 dpa y 28 dpa, los niveles de actividad GUS de las plantas -1486(m)::GUS ( $419,28 \pm 185,82$  y  $551,85 \pm 246,35$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, respectivamente) fueron significativamente menores que los de las plantas -1486::GUS (F= 9,97, P= 0,002 para 24 dpa y F= 18,79, P= 0,001, para 28 dpa). Por lo tanto, en las plantas -1486(m)::GUS no se detecta el aumento en la actividad GUS durante la fase de desecación del embrión observado en las plantas -1486::GUS.

Los ensayos fluorimétricos con las germínulas de 20 dpi y con las hojas y los tallos de plantas adultas -1486(m)::GUS de la generación T1 (descendientes de la T0) sin estresar (figura 18) mostraron una actividad GUS ( $10,3 \pm 2,4$ ;  $19,3 \pm 7,3$  y  $19,9 \pm 12,2$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x





**Figura 18. Experimentos de choque térmico con germínulas y con plantas transgénicas adultas.** Sometimos las germínulas de 20 dpa y las plantas adultas de 2 meses a tratamientos de 2 h 30 min a 42°C (choque térmico) o 25°C (control). Se analizaron aproximadamente 100 germínulas T1 descendientes de 5 plantas T0 (panel A) para las construcciones -1486::GUS (-1486), -1486(m)::GUS [-1486(m)], -1486(p)::GUS [-1486(p)], -533::GUS (-533) y -126::GUS (-126), un número equivalente de germínulas T1 de 3 plantas T0 para la fusión traduccional *Ha hsp17.7 G4::GUS* (G4) (Coca *et al*, 1996) y germínulas de plantas de tabaco sin transformar (NT). Analizamos también hojas (panel B) y tallos (panel C) de 3 plantas adultas T1, descendientes de 5 plantas T0 de las construcciones -1486::GUS (-1486), -1486(m)::GUS [-1486(m)], -533::GUS (-533) y -126::GUS (-126), de 3 plantas T0 de la fusión traduccional *Ha hsp17.7 G4::GUS* (G4) y 6 plantas de tabaco sin transformar (NT). En la figura se muestran las medias de las actividades GUS medidas en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Las barras que aparecen sobre cada medida representan su error estándar.

min<sup>-1</sup> respectivamente) que no difiere estadísticamente de la encontrada en tabaco sin transformar (F= 0,003, P= 0,959; F= 1,158, P= 0,283 y F=1,709, P= 0,193, respectivamente). Por otra parte, la actividad obtenida en los ensayos fluorimétricos con las germínulas y con las hojas y los tallos de las plantas -1486(m)::GUS adultas de la generación T1 tratadas 2 h 30 min a 42°C (figura 18) (11,7 ± 2,7; 10,7 ± 1,6 y 17,3 ± 7,8 pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> respectivamente) no difería significativamente de la hallada en las plantas -1486(m)::GUS sin estresar (F= 0,001, P= 0,99; F= 0,378, P= 0,539 y F=0,442, P= 0,507, respectivamente). Estos experimentos mostraron que en las plantas de tabaco -1486(m)::GUS no hay una actividad GUS significativamente distinta de la del tabaco sin transformar ni en las germínulas ni en los tallos y las hojas de plantas adultas tanto en condiciones normales de crecimiento como tras un tratamiento de 2 h 30 min a 42°C.

En los ensayos histoquímicos con polen maduro de la generación T0 no detectamos diferencias en la tinción entre las plantas -1486(m)::GUS y -1486::GUS (figura 15, comparar el panel B con el C). Los ensayos fluorimétricos de polen maduro de plantas -1486(m)::GUS (figura 19) mostraron una actividad GUS de 2057 ± 410 pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> que no difería significativamente de la obtenida con polen maduro de plantas -1486::GUS (F= 0,14, P= 0,908).

En resumen, los resultados obtenidos con las plantas -1486(m)::GUS mostraron que el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesario para activar su transcripción durante la fase de desecación de la embriogénesis (figura 17). Sin embargo, las mutaciones

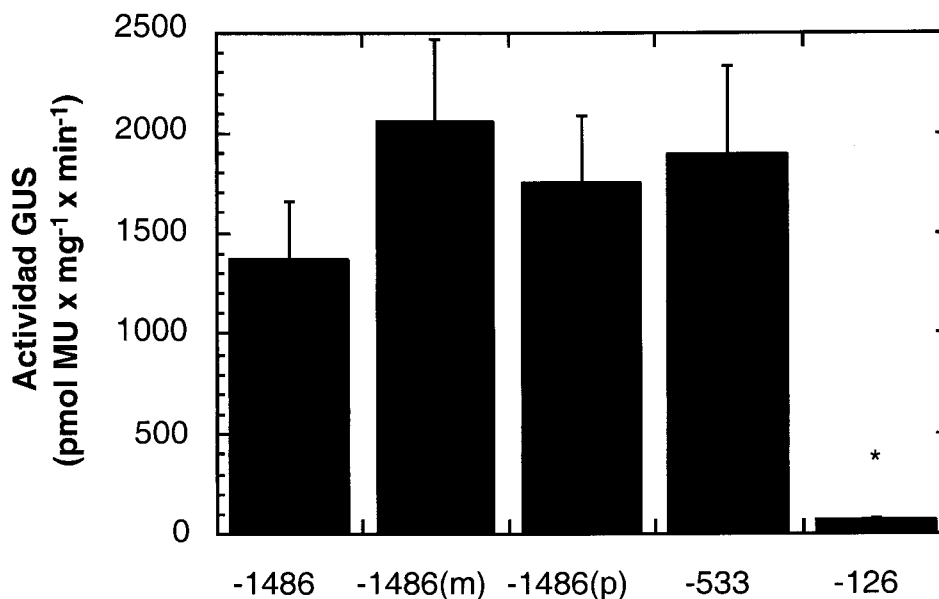


Figura 19. Ensayos fluorimétricos de la actividad GUS en el polen de las plantas transgénicas. Se analizó la actividad GUS en 11 plantas T0 de la construcción -1486::GUS (-1486), 13 de la -1486(m)::GUS [-1486(m)], 18 de la -1486(p)::GUS [-1486(p)], 14 de la -533::GUS (-533) y 11 de la -126::GUS (-126). En la figura se muestran las medias de las actividades GUS medidas en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. La barra que aparece sobre cada medida representa su error estándar. El asterisco indica que la diferencia respecto al valor -126 es estadísticamente significativa.

introducidas en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* no son suficientes para modificar la expresión del gen quimérico -1486::GUS en polen maduro (figura 19).

Dada la importancia del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* en la expresión embrionaria decidimos estudiar el efecto de otras mutaciones sobre este elemento. Previamente, Barros *et al* (1992) habían estudiado por mutagénesis dirigida la región del HSE proximal del gen de soja *Gm hsp17.5E*. Este HSE se compone de cinco repeticiones del pentanucleótido nGAAn en la orientación adecuada, de las que sólo la tercera y cuarta son perfectas. Con las mutaciones que ajustaban la segunda repetición (nTACn) del HSE al consenso (nTTCn) se obtuvo el doble de acumulación del ARNm *Gm hsp17.5E* en respuesta a un choque térmico. Sin embargo, mutaciones en el HSE que hacían perfectas la primera y quinta repetición del pentanucleótido no mostraron efecto alguno sobre la acumulación de este ARNm en respuesta a un choque térmico. De esta forma, Barros *et al*, (1992) sugieren que la termoinducibilidad no es una simple función aditiva del

número de repeticiones perfectas del pentanucleótido de sus HSEs. Sin embargo, no se han realizado experimentos similares para estudiar el efecto de mutaciones análogas durante el desarrollo embrionario de plantas. Por lo tanto, decidimos realizar tres mutaciones puntuales que ajustaban las secuencias de las repeticiones del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* (figura 17, panel B) a su consenso (Barros *et al.*, 1992). Sustituimos en la construcción -1486::GUS dicho HSE por la nueva versión mutada (pHSE) y obtuvimos el gen quimérico -1486(p)::GUS (ver materiales y métodos y figura 17, panel C). Introdujimos este nuevo gen en tabaco y analizamos el número de copias del transgén como se realizó con las construcciones anteriores (datos no mostrados). Obtuvimos 14 transformantes independientes con entre una y tres copias del transgén -1486(p)::GUS y estudiamos su patrón de expresión mediante ensayos fluorimétricos e histoquímicos de la actividad GUS.

Las tinciones histoquímicas de las semillas diseccionadas de las plantas -1486(p)::GUS de la generación T0 mostraron un resultado similar al obtenido con las de las plantas -1486::GUS, tanto en embriones (figura 12.1: comparar paneles A, B y C con los paneles G, H e I) como en endospermos (figura 12.2: comparar paneles A, B y C con los paneles G, H e I). En los ensayos fluorimétricos con semillas de plantas -1486(p)::GUS, (figura 17, panel A) detectamos actividad GUS a los 12, 16, 20, 24 y 28 dpa (respectivamente,  $204,06 \pm 146$ ,  $217,76 \pm 79,9$ ,  $1099 \pm 336$ ,  $1785 \pm 639$  y  $2373 \pm 810$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). Las actividades detectadas en los ensayos con semillas de 12, 24 y 28 dpi de plantas -1486(p)::GUS no diferían significativamente de las detectadas con los embriones de esas mismas edades de plantas -1486::GUS (F= 0,069, P= 0,792; F= 0,05, P= 0,82 y F= 1,66, P= 0,199, respectivamente). Sin embargo, en semillas de 16 y 20 dpa los niveles de actividad GUS de las plantas -1486(p)::GUS mostraron un aumento, respecto a los observados en las plantas -1486::GUS, de 7 y 4,6 veces respectivamente, significativo estadísticamente (F= 4,24, P= 0,041 y F= 5,36, P= 0,022), aunque no difieren estadísticamente de los obtenidos con las plantas -1486(m)::GUS (F= 1,79, P= 0,183 para 16 dpa y F= 2,63, P= 0,107 para 20 dpa)

Los ensayos fluorimétricos con germínulas de 20 dpi de las plantas -1486(p)::GUS sin estresar (figura 18, panel A) mostraron una actividad GUS de  $55,3 \pm 24,4$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> que no difería significativamente de la hallada en germínulas de 20 dpi de tabaco sin transformar (F= 0,053, P= 0,819). En los ensayos fluorimétricos con

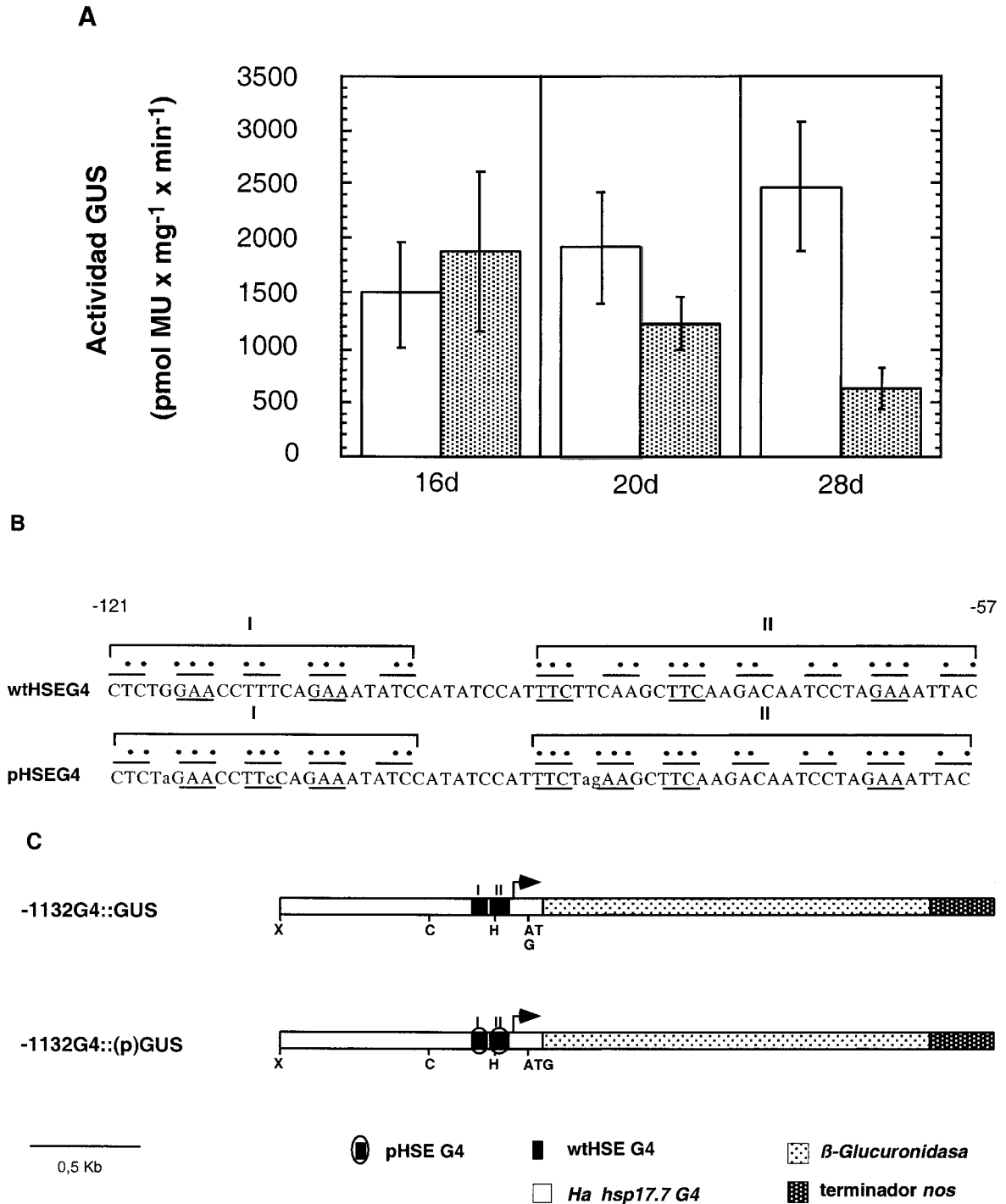
germímulas de 20 dpi de plantas -1486(p)::GUS tratadas 2 h 30 min a 42°C (figura 18, panel A) se encontró una actividad GUS comparable ( $51,4 \pm 24,8$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). Esta actividad no difería significativamente de la encontrada en plantas -1486(p)::GUS sin estresar (F= 0,001, P= 0,973).

En los ensayos histoquímicos con polen maduro de plantas de la generación T0 no detectamos diferencias de tinción entre las plantas -1486(p)::GUS y las plantas -1486::GUS (figura 15, comparar el panel B con el D). Los ensayos fluorimétricos en polen maduro de plantas -1486(p)::GUS (figura 19) mostraron una actividad GUS de  $1747 \pm 338$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> que no difería significativamente de la obtenida en los ensayos fluorimétricos de polen maduro de plantas -1486::GUS (F= 0,002, P= 0,968).

En resumen, las mutaciones del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* introducidas en la construcción -1486(m)::GUS redujeron la actividad del gen delator GUS en embriones a 24 y 28 dpa, pero no a 16 y 20 dpa (figura 17, panel A). Este resultado demostró que el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesario para activar su transcripción durante la fase de desecación de la embriogénesis. Sin embargo, al contrario de lo que ocurrió con las mutaciones del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* introducidas en la construcción -1486(m)::GUS, las mutaciones que ajustaban más este HSE al consenso [construcción -1486(p)::GUS] aumentaron la actividad en embriones del gen delator GUS a los 16 y 20 dpa sin afectar a los niveles alcanzados a 24 y 28 dpa (figura 17, panel A).

La actividad GUS en polen maduro de las plantas -1486::GUS no difirió significativamente de la encontrada en el polen de las plantas con los genes quiméricos con versiones mutadas del HSE *Ha hsp17.6 G1* (figura 19). Este resultado indica que el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* debe de ser un elemento regulador positivo específico de semillas ya que no interviene en la regulación de la actividad GUS en polen maduro. No obstante, como se discutió en el apartado 5, no se puede descartar que la actividad GUS detectada en polen maduro se deba al uso del gen *gus* como delator (Uknes *et al*, 1993).

**7. Las mutaciones que ajustan al consenso las secuencias de las regiones con HSE de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* tienen efectos distintos sobre su expresión embrionaria.**



**Figura 20.** Ensayos fluorimétricos comparativos de la actividad GUS de las plantas transgénicas -1132G4::GUS y -1132(p)::GUS durante el desarrollo embrionario. Analizamos la actividad GUS en embriones de 16, 20 y 28 dpa (edades indicadas bajo las columnas). Analizamos 15 plantas de la construcción -1132G4::GUS (columnas blancas), y 13 de la -1132G4(p)::GUS (columnas punteadas). Realizamos al menos dos extractos de proteínas correspondientes, cada uno, a embriones de dos cápsulas de cada planta T0 analizada. El panel A muestra las medias de las actividades GUS en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> y la barra que aparece sobre cada medida representa su error estándar.

En el panel B se representa un esquema de la región con el wtHSEG4 entre las posiciones -121 y -57 y la zona correspondiente del pHSEG4. Las mutaciones introducidas están escritas con minúsculas. El resto de los símbolos de este esquema están descritos en la figura 4. El panel C muestra un esquema de los genes quiméricos ensayados y sus símbolos están descritos en la figura 13.

La sustitución del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* en la construcción -1486::GUS por una versión mutada que se ajustaba a la secuencia consenso de los HSEs (pHSE) produjo un aumento en la actividad GUS en embriones de 16 y 20 dpa (figura 17). Decidimos estudiar el efecto de unas mutaciones análogas a éstas en otro gen *shsp* que se expresa durante la embriogénesis en ausencia de estrés. Para ello realizamos dichas mutaciones en las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4*. Este gen se expresa desde etapas más tempranas del desarrollo embrionario que el gen *Ha hsp17.6 G1* (Coca *et al*, 1996 y figura 9). Las dos regiones con HSEs complejos del gen *Ha hsp17.7 G4* son necesarias para su expresión durante la fase de desecación del embrión pero no en etapas más tempranas de la embriogénesis (Almoguera *et al*, 1998).

Realizamos una mutación puntual en la región con HSEs más cercana a la zona codificante y dos en la más alejada que las ajustaban a la secuencia consenso de los HSEs (figura 20, panel B). Sustituimos las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* en la fusión transcripcional -1132G4::GUS (Coca *et al*, 1996) por esta versión mutada (pHSE G4) y creamos la construcción -1132G4(p)::GUS (figura 20, panel C). Introdujimos esta construcción en tabaco y determinamos el número de copias del transgén -1132G4(p)::GUS del mismo modo que se realizó con las construcciones anteriores (datos no mostrados). De esta forma obtuvimos 13 transformantes originales con el transgén [plantas -1132G4(p)::GUS] y estudiamos su patrón de expresión mediante ensayos fluorimétricos de la actividad GUS.

En los ensayos fluorimétricos con embriones de plantas -1132G4(p)::GUS de la generación T0, (figura 20, panel A) detectamos actividad GUS a los 12, 16, 20, 24 y 28 dpa (respectivamente,  $1512 \pm 626$ ;  $1881 \pm 737$ ;  $1222 \pm 250$ ;  $715 \pm 207$  y  $634 \pm 195$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). Las actividades detectadas en los ensayos con embriones de 16 y 20 dpi de plantas -1132G4(p)::GUS no diferían significativamente de las detectadas con los embriones de esas edades de plantas -1132G4::GUS (F= 0,054, P= 0,816 y F= 1,143, P= 0,287, respectivamente). Sin embargo, en embriones de 28 dpa los niveles de

actividad GUS de las plantas -1132G4(p)::GUS mostraron una reducción respecto a los observados en las plantas -1132G4::GUS de 3,9 veces, estadísticamente significativa ( $F= 18,58$ ,  $P= 0,001$ ).

En resumen, las mutaciones realizadas en las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* no tienen efecto en el patrón de expresión embrionaria de dicho gen salvo en una disminución de la transcripción durante su fase de desecación (figura 20). Este resultado contrasta fuertemente con el obtenido con unas mutaciones análogas a éstas en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* en las que no observamos variaciones en la actividad de dicho gen durante la fase de desecación del embrión pero su actividad aumenta durante la fase de maduración temprana (figura 17).

#### **8. El gen *Ha hsp17.6 G1* contiene otros elementos en *cis*, aguas arriba de su HSE, con efectos positivos y negativos sobre su regulación.**

Aunque en el apartado 6 se demostró que el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesario para su expresión, podía haber otros elementos reguladores en *cis* que también interviniesen. Para localizar estos posibles elementos reguladores realizamos dos deleciones de ADN desde el extremo 5' del gen quimérico -1486::GUS. Utilizamos los sitios de restricción de XhoI (posición -533 respecto al sitio de inicio de la transcripción) y HindIII (posición -126) para construir los genes quiméricos -533::GUS y -126::GUS respectivamente (figura 21, esquemas). Introdujimos estas construcciones en tabaco y determinamos el número de copias de los transgenes -533::GUS y -126::GUS del mismo modo que se realizó con la construcción -1486::GUS (datos no mostrados). Estudiamos la expresión de los genes quiméricos -533::GUS y -126::GUS en 13 transformantes independientes para la construcción -533::GUS y 12 para la -126::GUS mediante ensayos fluorimétricos e histoquímicos de la actividad GUS.

En las tinciones histoquímicas de embriones y endospermos diseccionados de semillas de las plantas -533::GUS de la generación T0 detectamos actividad GUS desde los 20 dpa (figura 12 A y B, paneles J, K y L). Los ensayos fluorimétricos con semillas de las plantas -533::GUS (figura 21) mostraron una actividad GUS a los 16, 20, 24 y 28 dpa ( $147 \pm 60$ ;  $6169 \pm 1481$ ;  $13306 \pm 2824$  y  $16214 \pm 2771$  pmol MU x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>, respectivamente). Estas actividades GUS detectadas en embriones

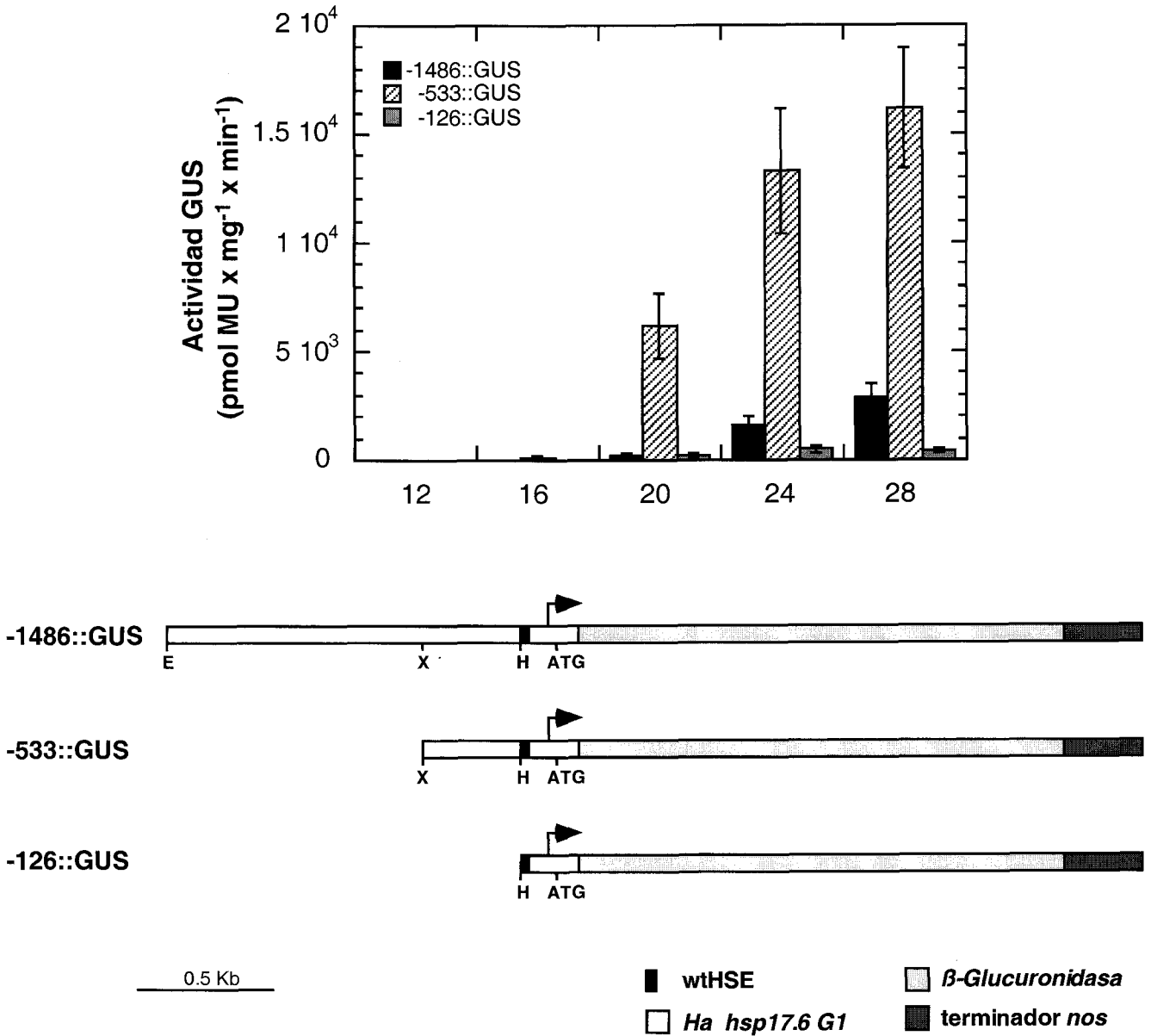


de plantas -533::GUS eran significativamente superiores a las encontradas en embriones de plantas -1486::GUS tanto a los 16 dpa ( $F=4,01$ ,  $P=0,048$ ), como a los 20 dpa ( $F=42,47$ ,  $P=0,001$ ), 24 dpa ( $F=22,69$ ,  $P=0,001$ ) y 28 dpa ( $F=13$ ,  $P=0,005$ ). Este aumento de la actividad GUS era de 25,8 veces en embriones de 20 dpa, de 7,5 veces en embriones de 24 dpa y de 5,6 veces en embriones de 28 dpa.

En cambio, en las tinciones con las semillas de las plantas -126::GUS de la generación T0 no detectamos actividad GUS en los embriones y los endospermos a ninguna de las edades ensayadas (figura 12 A y B, paneles M, N y O). Los ensayos fluorimétricos con semillas de estas plantas (figura 21) mostraron actividad GUS a los 20, 24 y 28 dpa ( $230 \pm 73,2$ ;  $520 \pm 162$  y  $454 \pm 120$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente). La actividad encontrada en embriones de 20 dpa de plantas -126::GUS no difería significativamente de la encontrada en embriones de 20 dpa de las plantas -1486::GUS ( $F=0,04$ ,  $P=0,84$ ). En cambio, en embriones de 24 y 28 dpa de las plantas -126::GUS detectamos una reducción significativa de la actividad GUS de entre 3 y 6.3 veces con respecto a los embriones correspondientes de las plantas -1486::GUS ( $F=4,51$ ,  $P=0,037$  y  $F=9,32$ ,  $P=0,003$ , respectivamente).

Los ensayos fluorimétricos con las germínulas de 20 dpi y con los tallos y las hojas de las plantas adultas -533::GUS de la generación T1 sin estresar (figura 18) mostraron una actividad GUS ( $52,6 \pm 25,4$ ;  $33,5 \pm 16,5$  y  $13,4 \pm 2,8$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  respectivamente) que no difería significativamente de la hallada en tabaco sin transformar ( $F=0,001$ ,  $P=0,977$ ;  $F=1,309$ ,  $P=0,254$  y  $F=0,045$ ,  $P=0,832$ , respectivamente). Los ensayos fluorimétricos con las germínulas y con los tallos y las hojas de las plantas -533::GUS adultas tratadas 2 h 30 min a 42°C (figura 18) tampoco mostraron una actividad GUS ( $24,2 \pm 10$ ;  $18,5 \pm 7,3$  y  $14,5 \pm 3$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  respectivamente) que difiriese significativamente de la hallada en plantas -533::GUS sin estresar ( $F=0,059$ ,  $P=0,809$ ;  $F=0,512$ ,  $P=0,475$  y  $F=0,03$ ,  $P=0,863$ , respectivamente).

Los ensayos fluorimétricos con las germínulas de 20 dpi y con los tallos y las hojas de las plantas adultas -126::GUS de la generación T1 sin estresar (figura 18) mostraron también unas actividades GUS ( $6,3 \pm 0,18$ ;  $3 \pm 1,4$  y  $7,7 \pm 1,8$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  respectivamente) que tampoco diferían significativamente de las encontradas en tabaco sin transformar ( $F=0,007$ ,  $P=0,934$ ;  $F=2,643$ ,  $P=0,106$  y  $F=7,615$ ,  $P=0,063$ , respectivamente). Los ensayos fluorimétricos con germínulas y



**Figura 21. Ensayos fluorimétricos comparativos de la actividad GUS de las plantas transgénicas -1486::GUS, -533::GUS y -126::GUS durante el desarrollo embrionario.** Analizamos la actividad GUS en embriones de 12, 16, 20, 24 y 28 dpa (edades indicadas bajo las columnas). Analizamos 12 plantas T0 de la construcción -1486::GUS, 14 de la -533::GUS y 12 de la -126::GUS. Realizamos dos extractos de proteínas correspondientes cada uno a embriones de dos cápsulas de cada planta analizada. En la figura se muestran las medias de las actividades GUS medidas en pmol de MU x mg de proteína<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> y la barra sobre cada medida representa su error estándar. Bajo la gráfica se muestra un esquema de las construcciones ensayadas y sus símbolos están descritos en la figura 13.

con tallos y hojas de plantas -126::GUS adultas tratadas 2 h 30 min a 42°C (figura 18) tampoco mostraron una actividad GUS ( $6,7 \pm 0,46$ ;  $4 \pm$

1,9 y  $7,5 \pm 2,3$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  respectivamente) que difiriese significativamente de la de las mismas plantas sin estresar ( $F= 0,001$ ,  $P= 0,998$ ;  $F= 0,782$ ,  $P= 0,378$  y  $F=0,013$ ,  $P= 0,909$ , respectivamente).

En los ensayos histoquímicos con el polen maduro de las plantas -533::GUS de la generación T0 obtuvimos un resultado similar al obtenido con el polen de las plantas -1486::GUS (figura 15: comparar el panel E con el B). Los ensayos fluorimétricos con polen maduro de las plantas -533::GUS (figura 19) mostraron una actividad GUS de  $1890 \pm 447$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$  que no difería significativamente de la obtenida con polen maduro de las plantas -1486::GUS ( $F= 0,05$ ,  $P= 0,823$ ). En cambio, en los ensayos histoquímicos con el polen maduro de las plantas -126::GUS de la generación T0 no detectamos actividad GUS (figura 15, panel F). Los ensayos fluorimétricos con el polen maduro de las plantas -126::GUS (figura 19) mostraron una actividad GUS muy baja ( $62,8 \pm 13,1$  pmol MU x  $\text{mg}^{-1}$  x  $\text{min}^{-1}$ ) que difería significativamente de la obtenida con el polen maduro de las plantas -1486::GUS ( $F= 35,9$ ,  $P= 0,001$ ).

Los resultados obtenidos con las plantas -533::GUS y -126::GUS demuestran que el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*, aunque necesario, no es suficiente para reproducir el patrón de expresión de dicho gen durante el desarrollo embrionario. Los ensayos fluorimétricos de actividad GUS realizados con las plantas -126::GUS mostraron la presencia de un elemento regulador positivo en *cis*, ubicado entre los sitios -533 y -126 del gen *Ha hsp17.6 G1*, que es necesario para su expresión durante la fase de desecación del embrión (figura 21) La delección de la región de ADN del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* desde el sitio -1486 al -126 y la mutación de su HSE (mHSE) mostraron el mismo efecto: reducción de la actividad del promotor durante la fase de desecación del embrión (figuras 17 y 21). En cambio, mediante el análisis de las plantas -533::GUS detectamos un elemento regulador negativo en *cis* del gen *Ha hsp17.6 G1*, ubicado entre los sitios -1486 y -533, que actúa exclusivamente durante el desarrollo embrionario (figura 21).

El elemento regulador negativo, localizado entre los sitios -1486 y -533 del gen *Ha hsp17.6 G1*, parece ser específico de semillas pues no encontramos diferencias significativas en los niveles de actividad GUS entre plantas -533::GUS y plantas -1486::GUS ni en germínulas y plantas adultas, ni en polen maduro (figuras 18 y 19, respectivamente). El HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* también parece ser un elemento regulador positivo específico de semillas pues la actividad GUS en polen maduro

de las plantas -1486::GUS tampoco difería significativamente de la encontrada en las plantas con las construcciones con versiones mutadas del HSE *Ha hsp17.6 G1* [figura 19: comparar columnas -1486 con -1486(m) y con -1486(p)]. Sin embargo, no podemos decir nada sobre la especificidad del elemento regulador positivo hallado entre los sitios -533 y -126 del gen *Ha hsp17.6 G1* pues encontramos diferencias significativas entre la actividad GUS en polen maduro de las plantas -533::GUS y -126::GUS (figura 19). Esta diferencia producida por esta última delección se podría deber tanto al mismo elemento regulador positivo que actúa durante la fase de desecación de la embriogénesis como a otro elemento regulador localizado en esta misma zona.

#### **IV. DISCUSIÓN.**

### 1. Evolución de la regulación de los genes *shsp*.

Los genes *hsp* vegetales forman una extensa familia multigénica con una gran variabilidad en sus patrones de expresión que van desde la expresión exclusiva en respuesta a un choque térmico en algunos genes, a la expresión constitutiva o en determinadas fases del desarrollo en otros (Vierling, 1991, Carranco *et al*, 1997, Nagao y Gurley, 1999). Esta divergencia en los patrones de expresión sugiere que han debido ocurrir cambios en los elementos reguladores responsables. Un ejemplo claro lo encontramos en la familia génica *hsp90* de *Arabidopsis*, donde aparecen miembros inducibles por choque térmico, miembros no inducibles por choque térmico pero de expresión constitutiva y miembros con características intermedias (Yabe *et al*, 1994). En esta familia se ha encontrado además una buena correlación entre el nivel de expresión de estos genes en respuesta a choque térmico y el ajuste de los HSEs de sus promotores a la secuencia consenso para estos elementos (Yabe *et al*, 1994).

En la familia de genes *shsp* vegetales también existe una divergencia en los patrones de expresión de sus miembros. En estudios previos se había demostrado la expresión de algunos genes *shsp* en respuesta a choque térmico exclusivamente y de otros en respuesta a un choque térmico y durante el desarrollo embrionario, tanto a nivel de acumulación de ARN (Coca *et al*, 1996) como a nivel de acumulación de proteínas (Hernandez y Vierling, 1993 y Coca *et al*, 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo sobre el gen de girasol *Ha hsp17.6 G1* muestran por primera vez un gen *shsp* vegetal que se transcribe durante la embriogénesis zigótica pero que no se transcribe en respuesta a un choque térmico (figura 10).

De esta forma, en nuestro laboratorio se han descrito, para la familia génica *shsp* de tipo I de girasol, un miembro que se transcribe en respuesta a choque térmico pero no durante el desarrollo embrionario (*Ha hsp18.6 G2*; figura 10 y Coca *et al*, 1996), otro que se transcribe durante la desecación del embrión pero no en respuesta a choque térmico (*Ha hsp17.6 G1*; figura 10) y un tercero que se transcribe en ambos casos (*Ha hsp17.7 G4*; figura 10; Coca *et al*, 1996 y Almoguera *et al*, 1998). Entre estos genes, como en la familia *hsp90* de *Arabidopsis*, también encontramos una buena correlación entre sus niveles de expresión en respuesta a choque térmico y el ajuste de los HSEs de sus promotores a la secuencia consenso. El gen *Ha hsp18.6 G2*,

con regiones con HSEs ajustados a dicha secuencia (figura 4), se transcribe notablemente en respuesta a choque térmico (figura 10 y Coca *et al*, 1996). En cambio, el gen *Ha hsp17.6 G1*, con una sola región con HSEs muy distal y que no se ajusta al consenso (figura 4), no se transcribe en respuesta a choques térmicos (figura 10). El gen *Ha hsp17.7 G4*, que contiene regiones con HSEs más extensas que las del gen *Ha hsp17.6 G1* pero menos perfectas que las del gen *Ha hsp18.6 G2* (figura 4), aún es capaz de responder a choque térmico (Coca *et al*, 1996 y figuras 6, 7 y 10).

Estos resultados demuestran por primera vez que en la expresión de los genes *shsp* vegetales ha ocurrido una divergencia similar a la de otras familias de genes *hsp*. El único precedente de una evolución similar en la expresión de una familia de genes relacionados con la familia *shsp* lo encontramos en los  $\alpha$ -cristalinos animales. La mayoría de los promotores de genes  $\alpha$ B-cristalinos mantienen regiones con HSEs y se activan por choque térmico pero en algunos, sus HSEs han degenerado y han perdido su capacidad de respuesta a un choque térmico (Wistow y Graham, 1995). En el caso de los genes *shsp* de girasol estudiados, esta divergencia en la expresión se correlaciona también con variaciones en las regiones con HSEs. Por esta razón, enfocamos nuestros esfuerzos en determinar el papel de los HSE y de otros posibles elementos reguladores en la divergencia de la expresión de estos genes.

## **2. El HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* es necesario para la activación transcripcional de dicho gen durante la fase de desecación de los embriones.**

El promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* contiene un único HSE que difiere de los presentes en otros genes *shsp* de plantas (Gurley y Key, 1991 y Nagao y Gurley, 1999) tanto por su bajo número de repeticiones del pentanucleótido nGAAn en la orientación adecuada, como por su gran distancia a la caja TATA. En el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* sólo aparecen tres de estas repeticiones contiguas en orientación alterna (figura 4), de las cuales la central no se ajusta al consenso en la posición más importante para la unión del HSF, la cuarta (nTTTc en lugar de nTTCT). Aguas arriba, tras cinco nucleótidos que se podrían considerar como un espaciamiento o como una repetición muy degenerada (nGTAn en lugar de nTTCn), se hallan otras dos

repeticiones imperfectas (nGTCcaGATn en lugar de nTTCtaGAAn). Por otra parte, la distancia de este HSE con respecto a la caja TATA (figura 4) es de 50 pb, más parecida a la que presentan las regiones distales con HSEs de los otros dos genes homólogos de girasol estudiados (63 pb para ambos) que a las proximales (21 pb para *Ha hsp17.7 G4* y 13 pb para *Ha hsp18.6 G2*).

A pesar de las características estructurales anómalas del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*, un fragmento de ADN que lo incluye es capaz de unirse al hHSF1 *in vitro*, aunque con menos afinidad que un fragmento del gen *Ha hsp17.7 G4*, con HSEs más extensos y perfectos (figura 5). La introducción en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* de mutaciones que impiden específicamente la unión de los HSFs (Barros *et al*, 1992) abolió la unión *in vitro* del hHSF1 (figura 16) y redujo drásticamente la actividad transcripcional de su promotor durante la fase de desecación de los embriones en plantas transgénicas (figura 17). El efecto de estas mutaciones específicas, sobre la actividad del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* demuestra que el HSE es necesario para su activación transcripcional en la fase de desecación de la embriogénesis y sugiere la participación de HSFs en dicha activación.

La participación de HSFs en la expresión del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la fase de desecación de los embriones tiene analogías con lo descrito para otros genes *shsp*, lo que sugiere un mecanismo común de regulación. En el gen de girasol *Ha hsp17.7 G4* y en el gen de soja *Gm hsp17.3-B*, las regiones que contienen sus HSEs son necesarias para la expresión de dichos genes durante la fase de desecación de las semillas, como indican los análisis por delección de sus promotores (respectivamente, Coca *et al*, 1996 y Prändl y Schöffl, 1996). Los estudios por mutagénesis dirigida de las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* muestran una evidencia más directa de la implicación de los HSFs en la expresión de dicho gen durante la desecación del embrión (Almoguera *et al*, 1998). Las mutaciones en las dos regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4*, análogas a las realizadas en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*, y que impiden específicamente la unión de los HSFs, redujeron drásticamente la activación de este gen durante la fase de desecación del embrión (Almoguera *et al*, 1998; mutante E). Este resultado demuestra la necesidad de las regiones con HSEs de este gen para su expresión durante esta fase del desarrollo y, por lo tanto, la participación en ella de HSFs. De esta forma, los resultados obtenidos en los estudios de genes *shsp* vegetales que se expresan durante la



embriogénesis zigótica, realizados hasta la fecha, sugieren que los HSFs pudieran participar en la regulación de estos genes durante la fase de desecación.

Sin embargo, la presencia de HSEs en los promotores de genes *shsp* parece no ser suficiente para la expresión de dichos genes durante el desarrollo embrionario. Fuera de contexto, repeticiones de HSEs sintéticos fusionados a las secuencias de la caja TATA del promotor *CaMV 35S*, son capaces de dirigir la expresión del gen *gus* en semillas de tabaco (Prändl y Schöffl, 1996). En cambio, en un promotor natural como el del gen de girasol *Ha hsp18.6 G2*, con regiones con alta homología con los HSEs en su promotor, no apreciamos transcripción en embriones de girasol de 20 a 24 dpa (figura 10). Durante la meiosis en *Saccharomyces* también se ha determinado que los HSE son necesarios para la expresión de genes *hsp* aunque no suficientes. El gen *hsp82* de *Saccharomyces*, que contiene tres HSEs, necesita su HSE proximal (79 pb aguas arriba de su caja TATA) para la activación de su promotor durante la meiosis, como indica el análisis de las mutaciones que lo alejan del consenso para los HSEs (Szent-Gyorgyi, 1995). Este HSE es incluso capaz de conferir expresión durante la meiosis al promotor *CYC1*, aunque a un nivel menor que en el gen *hsp82*. Sin embargo, no todos los promotores de genes *hsp* de *Saccharomyces* con HSEs se inducen durante la meiosis. En este caso, para la expresión durante la meiosis del gen *hsp82* es importante, además del HSE, el elemento regulador URS82, situado a 46 pb aguas arriba de la caja TATA y que actúa como activador durante la meiosis y represor en los demás casos (Szent-Gyorgyi, 1995). En conclusión, la presencia de otros elementos reguladores y sus interacciones con los HSEs podrían ser decisivos para la expresión de los genes *shsp* durante el desarrollo embrionario.

El hecho de que el gen *Ha hsp17.6 G1* necesite su HSE para la transcripción durante la desecación del embrión pero no responda a un choque térmico (figura 10) sugiere además que los mecanismos de activación, a través de los HSEs, durante el desarrollo embrionario y en respuesta a un choque térmico deben ser distintos. Los resultados obtenidos previamente con el gen *Ha hsp17.7 G4* apoyan esta diferenciación: algunas mutaciones en su región con HSEs proximal que la alejan del consenso para los HSEs, eliminaron su respuesta a choque térmico pero sólo redujeron parcialmente su expresión durante la desecación del embrión (mutante A; Almoguera *et al*, 1998). El

contexto y la arquitectura peculiar de estos promotores con HSEs imperfectos podrían contribuir a explicar las diferencias observadas entre estos mecanismos de acción.

Una característica de los promotores de estos genes que pudiera explicar las diferencias entre estos mecanismos de activación podría ser la presencia de HSEs que no se ajustan perfectamente al consenso de los HSE de plantas (Barros *et al.*, 1992). La estructura imperfecta de estos HSEs podrían influir, por ejemplo, en la conformación del HSF unido a él y, de esta forma, en la activación del promotor, como se ha observado en el promotor del gen *cup1* (Santoro *et al.*, 1998). Cuando se une el HSF de *Saccharomyces* con el HSE distal de este gen forma un complejo menos resistente a la digestión con quimotripsina que cuando está unido a una versión del HSE que se ajusta al consenso, lo que sugiere que el HSF adopta distintas conformaciones en cada caso (Santoro *et al.*, 1998).

Otra posibilidad es que la distancia entre los HSEs y la caja TATA en estos promotores influya en la diferencia entre los mecanismos de activación, a través de los HSEs, durante la embriogénesis y en respuesta a choque térmico. En los genes *hsp*, los HSEs proximales suelen tener un papel muy importante en su respuesta a un choque térmico y los HSEs distales una importancia menor (Gurley y Key, 1991 y Nagao y Gurley, 1999). En el caso del gen *Ha hsp17.7 G4* de girasol, la delección de la región con HSEs distal y las secuencias situadas aguas arriba no afectó a su respuesta a un choque térmico (Coca *et al.*, 1996). Sin embargo, las mutaciones puntuales que alejan las regiones con HSEs del consenso mostraron que para la expresión de este gen durante la embriogénesis son importantes tanto la región con HSEs proximal como la distal (Almoguera *et al.*, 1998). Estas observaciones encajan con los resultados obtenidos con el gen *Ha hsp17.6 G1*: su HSE, distal, no es suficiente para activar la transcripción en respuesta a un choque térmico (figura 10) pero tiene un papel esencial en su transcripción durante la desecación del embrión (figura 17).

Las diferencias entre los mecanismos de activación a través de los HSEs, durante el desarrollo embrionario y en respuesta a un choque térmico, podrían también implicar la participación de HSFs distintos en cada caso. Si los HSFs implicados en la expresión embrionaria del gen *Ha hsp17.6 G1* fuesen los implicados en la respuesta a choque térmico de otros genes *shsp*, éstos deberían unirse a este promotor de un modo específico de embriones, tal vez mediante interacciones con otros

factores transcripcionales en *trans* específicos de embriones. Alternativamente, los HSFs implicados en la regulación embrionaria de este gen podrían tener una especificidad por la secuencia de ADN distinta a la de los HSFs implicados en la respuesta a choque térmico.

En animales se ha observado una cierta especialización funcional entre los distintos HSFs (Morimoto, 1998). El HSF1 es el responsable principal de la respuesta a choque térmico y a otros tipos de estrés (Morimoto, 1998). En cambio, el HSF2, más relacionado con procesos de desarrollo, se activa durante el desarrollo embrionario temprano (Mezger *et al*, 1994) y la espermatogénesis en ratón (Sarge *et al*, 1994) y en células K562 humanas expuestas a hemina (Sistonen *et al*, 1994). En ratones se ha observado además una especialización en las secuencias a las que se unen estos dos HSFs: el mHSF1 se une preferentemente a HSEs más extensos que el mHSF2, probablemente debido a una mayor capacidad para establecer interacciones cooperativas entre trímeros (Kroeger y Morimoto, 1994).

Hasta la fecha, en todas las plantas estudiadas se han encontrado varios HSFs. Los HSFs vegetales caracterizados se han clasificado en cuatro grupos multigénicos (A1, A2, B1 y B2) en base a comparaciones entre la secuencia de aminoácidos de sus dominios de unión al ADN (Nover *et al*, 1996). A pesar de la multiplicidad de los HSFs vegetales clonados, aún no se ha hallado entre ellos un grupo implicado de forma específica en procesos de desarrollo, análogo al HSF2 de animales. No obstante, la diversificación de los HSFs vegetales podría reflejar una especialización funcional análoga a la descrita en animales. Un resultado que sugiere esta especialización es el obtenido en Prändl *et al* (1998). En este trabajo se ha comprobado que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que superproducen At HSF3 sufren un incremento en su termorresistencia basal, pero no las que superproducen At HSF4. Este resultado sugiere una especialización funcional de los HSF3 y HSF4 de *Arabidopsis* (Prändl *et al*, 1998).

En plantas la diversificación de los HSFs podría resultar aún más compleja que en animales por la posible heteroligomerización entre los distintos HSFs que cohabitan en las células. Hasta la fecha sólo se ha publicado la interacción entre los HSFs Lp HSFA1 y Lp HSFA2 para su importación al núcleo en células de tomate (Scharf *et al*, 1998) pero no se puede descartar que se den interacciones similares entre otras combinaciones de HSFs o incluso que los distintos heterolímeros formados sean capaces de unirse al ADN y activar la transcripción.

La posible especialización de los HSFs vegetales en la secuencia de los HSEs a través de la que activan podría conciliar la participación de los HSFs en la regulación de los genes *hsp* con la diversidad en los patrones de expresión de los distintos genes *hsp* durante el choque térmico y el desarrollo embrionario. Resultados preliminares de nuestro laboratorio apoyan esta hipótesis. En experimentos de expresión transitoria donde se cobombardean embriones de girasol de 21 dpa con el HSFA2 de tomate bajo el control del promotor 35S y, o bien la construcción quimérica -1486::GUS, o bien la -1486(p)::GUS, se obtuvo una fuerte actividad GUS, similar para ambas construcciones. En cambio, si el factor utilizado es el HSFA1 de tomate, se observa una fuerte actividad GUS con la construcción -1486(p)::GUS mientras que con la construcción -1486::GUS no aparece una actividad GUS significativa. Estos resultados sugieren que, en embriones, el factor Lp HSFA1 podría activar mejor a través de HSEs que se ajustasen mejor al consenso, mientras que el Lp HSFA2 no mostraría esta preferencia.

De confirmarse esta especificidad embrionaria de los distintos HSFs vegetales por la secuencia del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1*, éste sería el único caso descrito hasta el momento. Además, este promotor es el único promotor *hsp* conocido que sólo contiene una región con HSEs funcional, de poca extensión y complejidad. Por estas razones, el promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* es un sistema adecuado para el estudio de la especificidad de secuencia de los distintos HSFs. Aun así, el sistema de expresión transitoria utilizado presenta algunos inconvenientes a la hora de interpretar los resultados, como por ejemplo la existencia de HSFs endógenos en los embriones, que no podemos controlar y que tal vez formen heterooligómeros con los HSFs que se introducen mediante transformación.

Para evitar estos problemas, en nuestro laboratorio se tratará de realizar los experimentos en *Saccharomyces*. Este sistema tiene la ventaja de poseer un único HSF (Morimoto, 1998) que además puede ser reemplazado por los HSFs heterólogos de tomate Lp HSFA1 y Lp HSFA2 (Döring *et al*, 2000). De esta forma, introduciendo en este sistema el gen delator  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* y expresando los HSFs correspondientes se podrá estudiar la transactivación de dicho promotor por un único HSF o por combinaciones de ellos sin interferencias de los HSFs endógenos. Con estos estudios, además de comprobar si realmente existe una especialización de los HSFs por su secuencia de unión, se podría

determinar los nucleótidos de los HSEs que establecen esta diferencia utilizando versiones mutantes del HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*.

**3. El gen *Ha hsp17.6 G1* contiene elementos en *cis* que, junto con su HSE, activan a su promotor durante la fase de desecación del embrión.**

Independientemente de cuáles sean los HSFs que intervengan en la activación del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1*, la presencia de otros elementos reguladores en *cis* en el promotor podría ser importante para explicar las diferencias entre los mecanismos de activación de dicho promotor durante el desarrollo embrionario y en respuesta a un choque térmico. Según esta hipótesis, la diferencia en los mecanismos de activación podría deberse, por ejemplo, a la colaboración con los HSFs de otros factores en *trans*, específicos de embriones, que actúen sobre elementos reguladores en *cis* presentes en el promotor.

El estudio mediante deleciones por el extremo 5' del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* demostró que su HSE, aunque es necesario, no es suficiente para la activación de dicho gen durante la desecación del embrión (figura 21). La deleción de la región del promotor que va desde el sitio -1486 al -126 (construcción quimérica *-126::GUS*), que no afecta al HSE, eliminó la subida en la actividad GUS observada en embriones de las plantas transgénicas *-1486::GUS* a partir de 20 dpa (figura 21). Este resultado demuestra la presencia de elementos reguladores en *cis*, ubicados entre los sitios -533 y -126 (comparar las actividades de las construcciones *-533::GUS* y *-126::GUS*; figura 21), que actúan de forma sinérgica con el HSE durante esta fase del desarrollo embrionario. Este efecto sinérgico sugiere interacciones funcionales, directas o indirectas, de las proteínas que se unen a estos elementos, con los HSFs que se unen al HSE o bien con la maquinaria basal transcripcional.

En cambio la deleción de la región del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* ubicada entre los nucleótidos -1486 y -533 produjo un aumento de la actividad del promotor en la embriogénesis desde los 12 dpa (figura 21), lo que indicó la presencia de elementos reguladores negativos en *cis* en esta región. Estos elementos en *cis* deben ejercer su función negativa sobre la transcripción específicamente en semillas, pues su deleción no tiene efecto en la actividad del promotor ni en tejidos vegetativos ni en polen (figuras 18 y 19, respectivamente). Los

niveles de expresión del gen *Ha hsp17.6 G1* en semillas dependerán, por lo tanto, del balance entre el efecto de estos elementos negativos y el de los reguladores positivos descritos anteriormente. Durante la etapa anterior a la desecación del embrión, los factores negativos reducen los niveles de expresión del gen a unos niveles basales pero en la fase de desecación sólo producen una reducción moderada de la expresión del gen (figura 21).

Este trabajo demuestra por primera vez la necesidad de elementos reguladores en *cis* que actúan de forma sinérgica con el HSE, para activar la transcripción de un gen *shsp* durante el desarrollo embrionario. Una posibilidad para explicar la necesidad de este sinergismo en la activación del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la desecación del embrión sería que los HSFs implicados alcanzaran concentraciones limitantes en estos embriones. La presencia de otros factores específicos de semillas que se uniesen a este promotor sería necesaria para facilitar la ocupación de su HSE por parte de los HSFs, a pesar de su baja concentración. De esta forma, la unión de los HSFs al HSE, en presencia de los otros factores positivos, podría ser tan eficiente como para asegurar una alta ocupación del HSE *in vivo*. Esta hipótesis encajaría con la observación de que modificaciones en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* que favorecen la unión de los HSFs (construcción quimérica *-1486(p)::GUS*) no tienen un efecto significativo en la actividad del promotor durante la fase de desecación de los embriones (figura 17). Según este modelo, las modificaciones en el HSE que favorecen la unión de los HSFs deberían hacer menos necesaria la presencia de los demás factores positivos hallados, en la activación de este gen. Para comprobar esta predicción estamos introduciendo las mutaciones del HSE descritas para la construcción *-1486(p)::GUS* en la construcción *-126::GUS*. Este modelo de activación del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* también explicaría la falta de actividad de dicho promotor en tejidos vegetativos ante un choque térmico (figura 10): el HSE de este gen, muy imperfecto y distal, es incapaz de dirigir la activación de este gen en ausencia de los factores específicos de semilla implicados durante la desecación del embrión.

Los HSFs interaccionan con el factor de unión a la caja TATA (TBP) en animales (Lis y Wu, 1993 y Mason y Lis, 1997) y en plantas (Reindl y Schöffl, 1998). Sin embargo, tanto en animales (Kanei-Ishii *et al*, 1997 y Stephanou *et al*, 1999) como en plantas (Rojas *et al*, 1999), se conocen

muy pocos ejemplos de interacción entre HSFs y otros factores transcripcionales, excluidos los componentes generales de la maquinaria basal de transcripción. En vertebrados, el factor transcripcional c-Myb es capaz de transactivar el gen *hps70*, a través de sus HSEs en células CV-1 en proliferación sin estrés térmico (Kanei-Ishii *et al*, 1997). El factor c-Myb, sin embargo no interacciona directamente con el ADN de este promotor sino que forma un complejo con el HSF3 y potencia la formación de los trímeros de HSF3, su transporte al núcleo y su unión al ADN (Kanei-Ishii *et al*, 1997). En girasol, se ha demostrado una activación sinérgica del promotor *Ha hsp17.7 G4* por el HSF de tomate Lp HSFA1 y el factor de *Arabidopsis* ABI3 mediante experimentos de expresión transitoria con embriones de 21 dpa (Rojas *et al*, 1999). Como en el caso anterior, el factor ABI3 parece que no se une directamente al ADN, sino que actuaría a través de los HSFs como un coactivador.

En la regulación del gen *Ha hsp17.6 G1* no se puede descartar que los HSFs implicados y los factores en *trans* que se unan a los otros reguladores positivos en *cis* hallados interaccionen conjuntamente con la maquinaria basal transcripcional para activar la transcripción del gen durante la desecación del embrión. Este tipo de interacción entre distintos factores ya se ha descrito para el caso de la proteína  $\lambda$ cI de bacteriófago y la proteína receptora de AMP cíclico (CRP) de *E. coli*. Ambas proteínas son factores transcripcionales que activan a la ARN polimerasa de *E. coli*: la primera interacciona con su subunidad  $\sigma$  y la segunda forma un lazo en la cadena de ADN para interaccionar con la subunidad  $\alpha$  (Young *et al*, 1994). Se ha observado que un promotor artificial que contiene los sitios de unión al ADN de los dos factores se activa sinérgicamente al unirse ambos, presumiblemente mediante contactos de cada factor con una subunidad diferente de la ADN polimerasa (Young *et al*, 1994). De forma análoga, es posible que en organismos eucariotas, distintos factores contacten con distintos complejos de la maquinaria basal transcripcional y colaboren en su reclutamiento al promotor o en su activación (Ptashne y Gann, 1997).

Los modelos de regulación durante la desecación del embrión propuestos para el gen *Ha hsp17.6 G1* podrían ser también válidos para otros genes *shsp* que se expresan en embriones en ausencia de estrés exógeno. Los únicos promotores *shsp* vegetales que han sido estudiados con suficiente detalle son los de los genes *Ha hsp17.6 G1* (este trabajo) y *Ha hsp17.7 G4* (Coca *et al*, 1996, Almoguera *et al*, 1998 y Rojas *et al*,

1999). En ambos casos la activación por HSFs, a través de HSEs, es necesaria para la expresión durante la fase de desecación del embrión (figura 17 y Almoguera *et al.*, 1998). Aunque en los análisis por delección del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* no se han detectado otros elementos en *cis* necesarios para su expresión durante la fase de desecación embrionaria (Coca *et al.*, 1996), no se puede descartar su presencia en la zona adyacente a las regiones con HSEs o incluso solapando con ellas.

La presencia en los promotores de genes *shsp* de distintos elementos reguladores específicos de determinados tejidos o estadios del desarrollo podría explicar la diversidad en los patrones de expresión de los genes *shsp* durante el choque térmico y el desarrollo embrionario. Así, por ejemplo, a pesar de los elementos comunes en la regulación de los genes *Ha hsp17.6 G1* y *Ha hsp17.7 G4* durante la desecación del embrión, existen también elementos diferentes. En la activación del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* se ha observado una acción sinérgica de los factores Lp HSFA1 y ABI3, como se ha descrito anteriormente (Rojas *et al.*, 1999). Esta acción sinérgica requiere la integridad de las dos regiones con HSEs del promotor, lo que sugiere una interacción cooperativa entre los HSFs unidos a ambas. Los resultados obtenidos con el gen *Ha hsp17.6 G1* indican que de participar el factor ABI3 en su regulación, éste debería actuar por un mecanismo distinto del que emplea en la regulación del gen *Ha hsp17.7 G4*: la falta de HSEs proximales en el gen *Ha hsp17.6 G1* (figuras 3 y 4) haría imposible una interacción cooperativa entre los HSFs unidos a distintas regiones con HSEs, análoga a la observada con el gen *Ha hsp17.7 G4*.

Los resultados obtenidos en este trabajo representan la primera evidencia experimental de la necesidad de una cooperación entre los HSFs y otros factores para la expresión embrionaria de un gen *shsp* vegetal. Basándonos en estos resultados hemos propuesto que los HSFs y otros factores de regulación embrionarios actúan de forma sinérgica en la activación del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la desecación del embrión. Esto nos permite explicar la activación embrionaria de genes *shsp* y las diferencias en la activación a través de HSFs durante el desarrollo embrionario y en respuesta a choque térmico. Además, la participación en la activación de estos genes de factores específicos permitiría un control muy preciso de la expresión de determinados genes *shsp* en determinados tejidos o estadios del desarrollo.



Este trabajo supone el primer paso hacia la identificación de los elementos que colaboran con los HSFs en la expresión del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la desecación del embrión. En nuestro laboratorio se está tratando de acotar de forma más precisa los elementos reguladores positivos en *cis* descubiertos en este trabajo para, posteriormente, determinar sus secuencias. Una vez obtenidas estas secuencias podremos determinar la presencia de estos elementos en otros promotores de genes *shsp* como el *Ha hsp17.7 G4*, en el que los análisis por delección no nos han permitido su identificación.

Por otra parte, el conocimiento preciso de estas secuencias reguladoras nos podría conducir al clonaje y la caracterización de los factores en *trans* que se unen a ellos mediante la técnica del híbrido sencillo. Esta técnica consiste en identificar plásmidos de una genoteca de ADNc fusionados al dominio de activación del factor GAL4, que expresan proteínas capaces de dirigir la expresión de un gen delator que contiene en su promotor varias copias de la secuencia de ADN a la que se unen los factores en *trans* que queremos identificar (Vidal y Legrain, 1999). En nuestro caso, los ADNc de la genoteca procederán de embriones de girasol y el gen delator que se utilizará será el gen *his3*, que complementa una auxotrofia de la levadura que vamos a utilizar. Los ADNc que codifiquen proteínas capaces de unirse al regulador en *cis* en estudio, dirigirán la transcripción del gen *his3* y se seleccionarán con facilidad en un medio que carezca de histidina. Esta técnica se ha usado con éxito para el clonaje de los factores embrionarios de girasol DPBF1 y DPBF2, que se unen al promotor del gen *Dc3* de zanahoria (Kim *et al*, 1997).

El clonaje y la caracterización de estos factores en *trans* serán de gran utilidad para estudiar su naturaleza y la de sus interacciones con los HSFs. Así mismo, también se podrá determinar si estos nuevos factores muestran o no una especificidad por los distintos HSFs vegetales.

#### **4. Regulación del gen *Ha hsp17.6 G1* en etapas anteriores a la desecación del embrión.**

Los ARNm *Ha hsp17.6 G1* ya se detectan en embriones de girasol de 12 y 15 dpa, aunque a niveles de acumulación muy bajos (figura 9). Los ensayos con los embriones de las plantas transgénicas de tabaco -1486::GUS (figura 13) confirmaron la actividad del promotor del gen

*Ha hsp17.6 G1* en la etapa de maduración temprana del embrión (16 y 20 dpa). Estos resultados indican que este promotor posee una actividad baja durante la maduración temprana del embrión (16 y 20 dpa en tabaco) que se dispara durante la fase de desecación del embrión (entre 24 y 28 dpa en tabaco).

Las modificaciones en el HSE del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* que lo alejan del consenso para los HSEs (Barros *et al*, 1992), no afectaron significativamente a su actividad en etapas más tempranas (figura 17, plantas -1486(m)::GUS). Las modificaciones que alejan en las dos regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7 G4* de la secuencia consenso para los HSEs, análogas a las realizadas en el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1*, provocaron resultados similares: una reducción de la actividad del promotor durante la fase de desecación de la semilla sin afectar a la expresión en etapas más tempranas de la embriogénesis (Almoguera *et al*, 1998). Además, las modificaciones en las dos regiones con HSE de dicho gen que las ajustan al consenso para los HSEs tampoco tuvieron efecto sobre la actividad del promotor en la embriogénesis temprana (figura 20). Por lo tanto, los resultados obtenidos con los dos únicos promotores de genes *shsp* suficientemente estudiados, que se expresan durante la embriogénesis, indican que la expresión de estos genes en las etapas tempranas de la embriogénesis no depende de los HSEs y, consecuentemente, de HSFs.

Sin embargo, el efecto de las modificaciones en el HSE del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* que lo ajustan al consenso para los HSEs resulta más difícil de interpretar. Hemos observado una subida significativa en la actividad del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* durante la maduración temprana de los embriones de las plantas -1486(p)::GUS respecto a las plantas con la versión del HSE sin mutar (figura 17). Este aumento de actividad podría deberse a que al ajustar el HSE del gen *Ha hsp17.6 G1* al consenso de los HSEs se forzase una unión de los HSFs presentes en los embriones de estas edades. Esta situación, que no ocurriría de manera natural, provocaría una activación adelantada del promotor.

La delección de la región del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* entre los sitios -1486 y -533 (plantas -533::GUS) produjo una subida considerable de su actividad en la maduración temprana del embrión (figura 21), lo que sugiere la presencia de elementos reguladores negativos en *cis* en esta región, a los que se unirían represores transcripcionales. Alternativamente, este efecto negativo sobre la



regulación se podría deber a la organización de la cromatina entre los sitios -1486 y -533. En organismos eucariotas la cromatina ejerce frecuentemente un efecto negativo sobre la transcripción génica ya que los nucleosomas dificultan el acceso de la maquinaria transcripcional a los promotores (Ptashne y Gann, 1997; Singh, 1998 y Struhl, 1999). Entre los genes *hsp*, por ejemplo, el gen *hsp70* se transcribe constitutivamente en oocitos de *Xenopus* si no está organizado en cromatina, pero sólo lo hace tras un choque térmico cuando lo está (Landsberger *et al*, 1995). También encontramos ejemplos de regulación negativa debida a la organización del ADN en cromatina en genes de plantas que se transcriben específicamente en semillas. En plantas transgénicas de tabaco sólo se detecta actividad del promotor de *Phaseolus vulgaris*, *phas*, en las semillas (Frisch *et al*, 1995). En cambio, se ha observado actividad de dicho promotor en hojas de tabaco transformadas transitoriamente, donde el ADN introducido no está organizado en cromatina (Frisch *et al*, 1995). Este último resultado indica que, en plantas, la organización de un promotor en cromatina puede ser importante para limitar su patrón de transcripción.

La eliminación adicional de la región comprendida entre los nucleótidos -533 y -126 (plantas -126::GUS) redujo la actividad GUS observada en la maduración temprana del embrión en las plantas -533::GUS hasta los niveles hallados en las plantas -1486::GUS (figura 21). Este resultado indica la presencia, entre los sitios -533 y -126 del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1*, de elementos reguladores en *cis* necesarios para la activación de la transcripción de dicho gen durante la maduración temprana del embrión. La pequeña actividad GUS observada en las plantas -126::GUS durante esta fase podrían ser los niveles basales de dicho promotor o bien deberse a la presencia de elementos reguladores positivos en *cis* adicionales situados aguas abajo del sitio -126, que actuaran en dichos embriones.

En esta fase del desarrollo embrionario, la actividad del promotor del gen *Ha hsp17.6 G1* dependerá, por lo tanto, del balance entre el efecto de estos elementos reguladores negativos y positivos, de forma que sólo detectamos una actividad pequeña (figura 21). En cambio, en los análisis por deleciones del extremo 5' del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* no se detectó la presencia de ningún elemento negativo (Coca *et al*, 1996). La ausencia de elementos negativos explicaría los altos niveles de actividad del promotor del gen *Ha hsp17.7 G4* observada en embriones de 16 dpa (figura 20, Almoguera *et al*, 1998).

En nuestro laboratorio se están realizando nuevas deleciones por el extremo 5' del gen *Ha hsp17.6 G1* para ubicar de forma más precisa los elementos reguladores negativos detectados (figura 21). Por otra parte, se están realizando deleciones por el extremo 5' de la construcción -533::GUS. Los altos niveles de actividad GUS hallados en la embriogénesis temprana de las plantas -533::GUS nos facilitará la localización de los principales elementos en *cis* responsables de la activación de dicho gen durante esta etapa. La posterior determinación de la secuencia de estos elementos nos permitirá determinar la presencia de secuencias análogas en otros genes *shsp* que se expresen durante esta fase de la embriogénesis.

#### **5. El estudio del gen *Ha hsp17.6 G1* podría ayudar determinar el papel de las sHSPs durante la desecación de los embriones.**

En el trabajo realizado en esta tesis hemos estudiado la regulación del gen *Ha hsp17.6 G1* durante el desarrollo embrionario. Las conclusiones obtenidas en este trabajo y los trabajos propuestos a partir de él podrían desvelarnos los mecanismos de regulación de la transcripción de las sHSPs durante la fase de desecación del embrión. Pero el conocimiento de estos mecanismos podría ayudar a resolver otra cuestión de sumo interés: la función de las sHSPs durante el desarrollo embrionario.

Se ha encontrado una gran cantidad de sHSPs en plantas (Vierling, 1991). Todas ellas muestran un dominio carboxilo terminal conservado (dominio de choque térmico) pero, en cambio, presentan una gran variabilidad en su región amino terminal (Waters *et al*, 1996). Atendiendo a la homología entre sus secuencias y a su localización celular, la familia sHSPs vegetales se clasifica en, al menos, cinco grupos: dos grupos se localizan en el citosol (clases I y II), otro en las mitocondrias, otro en los cloroplastos y el último en el sistema de endomembranas (Waters y Vierling, 1999). La enorme diversidad de los genes *shsp* vegetales ha venido acompañada por la expresión diferencial de estos genes en determinados estadios del desarrollo de la planta (Waters *et al*, 1996) o en determinados tejidos (Coca *et al*, 1994 y zur Nieden *et al*, 1995). Esta diversificación en las sHSP de plantas y sus patrones de expresión sugiere una diversificación en sus funciones o, por lo menos, en los sustratos sobre los que actúan (Vierling, 1991). De

esta manera las plantas podrían expresar en determinadas situaciones una batería de sHSP y evitar la expresión de otras que resultarían innecesarias o incluso perjudiciales.

Una estrategia usada frecuentemente para averiguar la función de las sHSPs ha sido el estudio del efecto fenotípico de las modificaciones en los niveles de acumulación de dichas proteínas. Esta estrategia ha resultado efectiva para algunos genes esenciales, como es el caso del gen *hsp17.7* de zanahoria: las plantas transgénicas de zanahoria que superproducen HSP17.7 son más termotolerantes mientras que las que presentan una reducción en sus niveles ven reducida también su termotolerancia (Malik *et al*, 1999). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el solapamiento de las funciones de las proteínas sHSPs o la redundancia entre ellas hace muy difícil que la modificación en los niveles de acumulación de una única de estas proteínas tenga efectos fenotípicos evidentes. Así, por ejemplo, en las plantas que superproducen la proteína cloroplástica HSP21 no se ha observado un efecto fenotípico claro (Osteryoung *et al*, 1994). En estos casos, una estrategia que ha dado buenos resultados es la modificación de elementos reguladores que afecten específicamente a un grupo determinado de sHSPs. Así por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis*, la superproducción del factor CBF1 provoca la sobreexpresión de algunos genes *cor* e incrementa la tolerancia de estas plantas al frío (Jaglo-Ottosen *et al*, 1998) o la superproducción del factor DREB1A produce la sobreexpresión de diversos genes de estrés (como *kin1*, *cor15a* o *erd10*) y conduce a una mayor tolerancia a la congelación o a altas concentraciones de sal (Kasuga *et al*, 1999). Esta estrategia también ha tenido éxito para modificar los niveles de sHSPs. Así, las plantas de *Arabidopsis* que expresan el factor At HSF1, activado por su fusión traduccional con el gen *gus* (Lee *et al*, 1995 B), o las que superproducen At HSF3 (Prandl *et al*, 1998), sobreexpresan HSPs a temperaturas normales de crecimiento y ven incrementada su termotolerancia.

El gen *Ha hsp17.6 G1* es el único gen *shsp* conocido que se expresa exclusivamente durante la embriogénesis zigótica (figuras 6, 7, 8, 9 y 10). Por lo tanto, la proteína HA HSP17.6 debe ejercer su función exclusivamente en embriones y nos podría conducir a comprender la función de las sHSPs durante la embriogénesis. Con el fin de determinar su función, en nuestro laboratorio se va a estudiar el efecto de la superproducción de esta proteína introduciendo en plantas de tabaco el

ADNc *Ha hsp17.6* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Entre los efectos fenotípicos que se van a estudiar se hará hincapié en la eficiencia de germinación pues en *Brassica* se ha observado una correlación entre el nivel de acumulación de algunas sHSPs de tipo I y la capacidad de germinación de las semillas (Bettey y Finch-Savage, 1998).

No obstante, es posible que, como se ha discutido anteriormente, la manipulación de los niveles de acumulación de la proteína HA HSP17.6 no tenga efectos fenotípicos claros. En este caso, en nuestro laboratorio se tratará de modificar los niveles de expresión de los factores que regulan el gen *Ha hsp17.6 G1* para, de este modo, tratar de modificar los niveles de expresión de los genes *shsp* que se expresan durante el desarrollo embrionario. Para ello, la determinación de los HSFs implicados en la regulación embrionaria de dicho gen y la clonación y caracterización de los otros elementos reguladores en *trans* implicados en ella (descritas en los apartados anteriores) serán esenciales.

## **V. CONCLUSIONES.**

## CONCLUSIONES

1. Hemos clonado el gen *Ha hsp 17.6 G1*, que codifica una sHSP de clase I, y es el primer gen *shsp* vegetal conocido que se expresa durante la fase de desecación de la embriogénesis zigótica pero no se transcribe en respuesta a un choque térmico.

2. El promotor del gen *Ha hsp 17.6 G1* posee un HSE, imperfecto y distal, que es necesario, aunque no suficiente, para la expresión de dicho gen durante la fase de desecación del embrión, y no es necesario para la regulación de la expresión durante la maduración temprana.

3. La región del promotor del gen *Ha hsp 17.6 G1* comprendida entre las posiciones -533 y -126 contiene elementos en *cis* necesarios para la expresión de dicho gen durante las fases temprana y tardía de la desecación embrionaria.

4. La región del promotor del gen *Ha hsp 17.6 G1* situada entre las posiciones -1486 y -533 contiene elementos reguladores negativos, específicos de embriones, que reducen la actividad de dicho promotor.



## **VI. BIBLIOGRAFIA.**

**Almoguera, C., M. A. Coca, y J. Jordano** (1993). Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *The Plant Journal* , **4**:947-958.

**Almoguera, C., M. A. Coca, y J. Jordano** (1995). Differential accumulation of sunflower tetraubiquitin mRNAs during zygotic embryogenesis and developmental regulation of their heat-shock response. *Plant Physiology* , **107**:765-773.

**Almoguera, C., y J. Jordano** (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Mol Biol* , **19**:781-792.

**Almoguera, C., P. Prieto-Dapena, y J. Jordano** (1998). Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *The Plant Journal* , **13**:437-446.

**Amin, J., J. Ananthan, y R. Voellmy** (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* , **8**:3761-3769.

**Arrigo, A. P., y J. Landry.** (1994). Expression and function of the lower-molecular-weight heat shock proteins., p. 335-373. *En* "The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones". Morimoto R.I. y Georgopoulos C. (ed.). Cold spring Harbor Laboratory Press.

**Barros, M. D., E. Czarnecka, y W. B. Gurley** (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol Biol* , **19**:665-675.

**Betty, M., y W. E. Finch-Savage** (1998). Stress protein content of mature Brassica seeds and their germination performance. *Seed Science Research* , **8**:347-355.

**Bevan, M.** (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* , **12**:8711-8721.

**Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* , **72**:248-254.

- Bullock, W. O., J. M. Fernández, y J. M. Short** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotech.* , **5**:376-379.
- Carranco, R., C. Almoguera, y J. Jordano** (1997). A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J Biol Chem* , **272**:27470-27475.
- Coca, M. A., C. Almoguera, y J. Jordano** (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol Biol* , **25**:479-492.
- Coca, M. A., C. Almoguera, T. L. Thomas, y J. Jordano** (1996). Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Mol Biol* , **31**:863-876.
- Cotto, J. J., y R. I. Morimoto** (1999). Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem Soc Symp* , **64**:105-118.
- Czarnecka, E., L. Edelman, F. Schoffl, y J. L. Key** (1984). Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. *Plant Mol Biol* , **3**:45-58.
- Chen, B. W., y A. E. Przybyla** (1994). An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotech* , **17**:657-659.
- Chisholm, D.** (1989). A convenient moderate-scale procedure for obtaining DNA from bacteriophage lambda. *Biotech* , **7**:21-23.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, y J. B. Hicks** (1985). Maize DNA miniprep, *En "Molecular Biology of Plants: A Laboratory Course Manual"*. R. Malmberg, J. Messing, y I. Sussex (ed.). Cold Spring Harbor Press, New York.
- DeRocher, A., y E. Vierling** (1995). Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs. *Plant Mol Biol* , **27**:441-456.

- DeRocher, A. E., K. W. Helm, L. M. Lauzon, y E. Vierling** (1991). Expression of a Conserved Family of Cytoplasmic Low Molecular Weight Heat Shock Proteins during Heat Stress and Recovery. *Plant Physiology*, **96**:1038-1047.
- Devereux, J., P. Haeberli, y O. Smithies** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.*, **12**:387-395.
- Dodeman, V. L., G. Ducreux, y M. Kreis** (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, **48**:1493-1509.
- Feinberg, A. P., y B. Vogelstein** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**:6.
- Fernandes, M., T. O'Brien, y J. T. Lis** (1994 A). Structure and regulation of Heat shock promoters., p. 375-393. En "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones". Morimoto R.I. y Georgopoulos C. (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fernandes, M., H. Xiao, y J. T. Lis** (1994 B). Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucl Acids Res*, **22**:167-173.
- Fiorenza, M. T., T. Farkas, M. Dissing, D. Kolding, y V. Zimarino** (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucl Acids Res*, **23**:467-474.
- Frisch, D. A., A. van der Geest, K. Dias, y T. C. Hall** (1995). Chromosomal integration is required for spatial regulation of expression from the beta-phaseolin promoter. *The Plant Journal*, **7**:503-512.
- Frischauf, A. M., H. Lehrach, A. Poustka, y N. Murray** (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.*, **170**:827-842.
- Galau, G. A., K. S. Jakobsen, y D. W. Hughes** (1991). The controls of late dicot embryogenesis and early germination. *Physiol. Plant.*, **81**:280-288.

- Giraudat, J., F. Parcy, N. Bertauche, F. Gosti, J. Leung, P. C. Morris, M. Bouvier-Durand, y N. Vartanian** (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* , **26**:1557-1577.
- Goldberg, R. B., G. de Paiva, y R. Yadegari** (1994). Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* , **266**:605-614.
- Gurley, W. B., y J. L. Key** (1991). Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry* , **30**:1-12.
- Hall, T. C., Y. Ma, B. U. Buchbinder, J. W. Pyne, S. M. Sun, y F. A. Bliss** (1978). Messenger RNA for G1 protein of french bean seeds: cell-free translation and product characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , **75**:3196-3200.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* , **166**:557-580.
- Hernandez, L., y E. Vierling** (1993). Expression of Low Molecular Weight Heat-Shock Proteins under Field Conditions. *Plant Physiology* , **101**:1209-1216.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, y R. A. Schilperoot** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* , **303**:179.
- Holdsworth, M., S. Kurup, y R. McKibbin** (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science* , **4**:275-280.
- Holsters, M., D. d. Waele, A. Depicker, E. Messens, M. v. Montagu, y J. Schell** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* , **163**:181-187.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Elchholtz, S. G. Rogers, y R. T. Fraley** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* , **227**:1229-1231.

- Hubel, A., y F. Schoffl** (1994). Arabidopsis heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Mol Biol* , **26**:353-362.
- Jaglo-Ottosen, K. R., S. J. Gilmour, D. G. Zarka, O. Schabenberger, y M. F. Thomashow** (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* , **280**:104-106.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, y M. W. Bevan** (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* , **6**:3901-3907.
- Joshi, C. P.** (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl Acids Res* , **15**:6643-6653.
- Joshi, C. P., y H. T. Nguyen** (1995). 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucl Acids Res* , **23**:541-549.
- Joung, J. K., D. M. Koepp, y A. Hochschild** (1994). Synergistic activation of transcription by bacteriophage lambda cI protein and E. coli cAMP receptor protein. *Science* , **265**:1863-1866.
- Kanei-Ishii, C., J. Tanikawa, A. Nakai, R. I. Morimoto, y S. Ishii** (1997). Activation of heat shock transcription factor 3 by c-Myb in the absence of cellular stress. *Science* , **277**:246-248.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi Shinozaki, K. Shinozaki, y Q. Liu** (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* , **17**:287-291.
- Kim, S. Y., H. J. Chung, y T. L. Thomas** (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. *The Plant Journal* , **11**:1237-1251.
- Kroeger, P. E., y R. I. Morimoto** (1994). Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* , **14**:7592-7603.

- LaFayette, P. R., R. T. Nagao, K. O'Grady, E. Vierling, y J. L. Key** (1996). Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Mol Biol* , **30**:159-169.
- Landsberger, N., M. Ranjan, G. Almouzni, D. Stump, y A. P. Wolffe** (1995). The heat shock response in *Xenopus* oocytes, embryos, and somatic cells: a regulatory role for chromatin. *Dev Biol* , **170**:62-74.
- Lee, G. J., N. Pokala, y E. Vierling** (1995 A). Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem* , **270**:10432-10438.
- Lee, J. H., A. Hubel, F. Schoffl** (1995 B). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *The Plant Journal* , **8**:603-612.
- Lis, J., y C. Wu** (1993). Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* , **74**:1-4.
- Luthe, D. S., y R. S. Quatrano** (1980). Transcription in isolated wheat nuclei: I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiology* , **65**:305-308.
- Malik, M. K., J. P. Slovin, C. H. Hwang, y J. L. Zimmerman** (1999). Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *Hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal* , **20**:89-99.
- Mascarenhas, J. P., y D. E. Crone** (1996). Pollen and the heat shock response. *Sex Plant Reprod* , **9**:370-374.
- Mason, P. B. J., y J. T. Lis** (1997). Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem* , **272**:33227-33233.
- Mathew, A., S. K. Mathur, y R. I. Morimoto** (1998). Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* , **18**:5091-5098.

**McCarty, D. R.** (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**:71-93.

**McMillan, D. R., X. Xiao, L. Shao, K. Graves, y I. J. Benjamin** (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor I abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **273**:7523-7528.

**Mezger, V., M. Rallu, R. I. Morimoto, M. Morange, y J. P. Renard** (1994). Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol*, **166**:819-822.

**Mittler, R., y A. Zilinskas** (1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal.*, **5**:397-405.

**Morimoto, R. I.** (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, **12**:3788-3796.

**Murashige, Y., y F. Skoog** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, **15**:473-497.

**Nagao, R. T., y W. B. Gurley.** (1999). Use of Heat-shock Promoters to Control Gene Expression in Plants., p. 97-126. *En "Inducible Gene Expression in Plants"*. P. H. S. Reynolds (ed.). CABI Publishing, Wellington.

**Nakai, A., M. Tanabe, Y. Kawazoe, J. Inazawa, R. I. Morimoto, K. Nagata** (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol*, **17**:469-481.

**Nap, J. P., P. Keizer, y R. Jansen** (1993). First-generation transgenic plants and statistics. *Plant Mol Biol Rep*, **11**:156-164.

**Nover, L., y K. D. Scharf** (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *CMLS. Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**:80-103.



- Nover, L., K. D. Scharf, D. Gagliardi, P. Vergne, E. Czarnecka-Verner, y W. B. Gurley** (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* , **1**:215-223.
- Nover, L., K. D. Scharf, y D. Neumann** (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* , **9**:1298-1308.
- Osteryoung, K. W., B. Pipes, N. Whemeyer, y E. Vierling** (1994). Studies of a chloroplast-localized small heat shock protein in *Arabidopsis*., p. 97-113. En "Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants". J. Cherry (ed.). NATO ASI Series H, Cell Biology, Springer Verlag, Berlin.
- Parcy, F., C. Valon, A. Kohara, S. Misera, y J. Giraudat** (1997). The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *The Plant Cell* , **9**:1265-1277.
- Parcy, F., C. Valon, M. Raynal, P. Gaubier-Comella, M. Delseny, y J. Giraudat** (1994). Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *The Plant Cell* , **6**:1567-1582.
- Parsell, D. A., y S. Lindquist** (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetic* , **27**:437-496.
- Prandl, R., K. Hinderhofer, G. Eggers-Schumacher, y F. Schoffl** (1998). HSF3, a new heat shock factor from Arabidopsis thaliana, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol Gen Genet* , **258**:269-278.
- Prandl, R., y F. Schoffl** (1996). Heat shock elements are involved in heat shock promoter activation during tobacco seed maturation. *Plant Mol Biol* , **31**:157-162.
- Ptashne, M., y A. Gann** (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* , **386**:569-577.

- Quatrano, R. S., D. Bartels, T. H. D. Ho, y M. Pagés** (1997). New insights into ABA-mediated processes. *The Plant Cell* , **9**:470-475.
- Rabindran, S. K., G. Giorgi, J. Clos, y C. Wu** (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **88**:6906-6910.
- Reindl, A., y F. Schoffl** (1998). Interaction between the Arabidopsis thaliana heat shock transcription factor HSF1 and the TATA binding protein TBP. *Febs Letters* , **436**:318-322.
- Rojas, A., C. Almoguera, y J. Jordano** (1999). Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. *The Plant Journal* , **20**:601-610.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold. Spring. Harbor. Laboratory. Press, New York*
- Sanger, F., A. R. Coulson, F. Hong, D. F. Hill, y G. B. Peterson** (1982). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , **162**:729-773.
- Santoro, N., N. Johansson, y D. J. Thiele** (1998). Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* , **18**:6340-6352.
- Sarge, K. D., O. K. Park-Sarge, J. D. Kirby, K. E. Mayo, y R. I. Morimoto** (1994). Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* , **50**:1334-1343.
- Scharf, K. D., H. Heider, I. Hohfeld, R. Lyck, E. Schmidt, y L. Nover** (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol* , **18**:2240-2251.
- Schöffl, F., R. Prandl, y A. Reindl** (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology* , **117**:1135-1141.

- Schwechheimer, C., y M. Bevan** (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in plant science* , **3**:378-383.
- Singh, K. B.** (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiology* , **118**:1111-1120.
- Sistonen, L., K. D. Sarge, y R. I. Morimoto** (1994). Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* , **14**:2087-2099.
- Southern, E.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* , **98**:503-517.
- Stephanou, A., D. A. Isenberg, K. Nakajima, y D. S. Latchman** (1999). Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90beta gene promoters. *J Biol Chem* , **274**:1723-1728.
- Struhl, K.** (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* , **98**:1-4.
- Szent-Gyorgyi, C.** (1995). A bipartite operator interacts with a heat shock element to mediate early meiotic induction of *Saccharomyces cerevisiae* HSP82. *Mol Cell Biol* , **15**:6754-6769.
- Tanabe, M., Y. Kawazoe, S. Takeda, R. I. Morimoto, K. Nagata, y A. Nakai** (1998). Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J* , **17**:1750-1758.
- Taylor, C. B.** (1997). Promoter fusion analysis: an insufficient measure of gene expression. *The Plant Cell* , **9**:273-275.
- Thomas, T. L., H. J. Chung, y A. N. Nunberg** (1997). ABA signalling in plant development and growth., p. 23-43. *En "Signal Transduction in Plants"*. P. Aducci (ed.). Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.

**Uknes, S., S. Dincher, L. Friedrich, D. Negrotto, S. Williams, T. H. Thompson, S. Potter, E. Ward, y J. Ryals** (1993). Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *The Plant Cell* , **5**:159-169.

**Vidal, M., y P. Legrain** (1999). Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucl Acids Res* , **27**:919-929.

**Vieira, J., y J. Messing** (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* , **153**:3.

**Vierling, E.** (1991). The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* , **42**:579-620.

**Waters, E. R., J. L. Garrett, y E. Vierling** (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* , **47**:325-338.

**Waters, E. R., y E. Vierling** (1999). The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol Evol* , **16**:127-139.

**Wehmeyer, N., L. D. Hernandez, R. R. Finkelstein, y E. Vierling** (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* , **112**:747-757.

**Wistow, G., y C. Graham** (1995). The duck gene for alpha B-crystallin shows evolutionary conservation of discrete promoter elements but lacks heat and osmotic shock response. *Biochim Biophys Acta* , **1263**:105-113.

**Wobus, U., y H. Weber** (1999). Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr Opin Plant Biol* , **2**:33-38.

**Wu, C.** (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual Review of Cellular Dev Biol* , **11**:441-469.

**Xiao, H., O. Perisic, y J. T. Lis** (1991). Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* , **64**:585-593.

Yabe, N., T. Takahashi, y Y. Komeda (1994). Analysis of tissue-specific expression of Arabidopsis thaliana HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol*, **35**:1207-1219.

zur Nieden, U., D. Neumann, A. Bucka, y L. Nover (1995). Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta*, **196**:530-538.

## UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. RAUL CARRANCO GALIÀ

titulada REQUERIMIENTO DE UN HSE IMPERFECTO Y OTROS ELEMENTOS EN CUS PARA LA EXPRESIÓN EMBRIONARIA DEL GEN Ha hsp17.6 G1 UN GEN HSP VEGETAL QUE NO SE INDUCE EN RESPUESTA AL CALOR acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CON LAUDE POR UNANIMIDAD

Sevilla, 22 de SEPTIEMBRE 2000

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672171